



Quantification des pools de nucléotides à l'aide de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem : applications à l'étude de la progression tumorale

Christelle Machon

► **To cite this version:**

Christelle Machon. Quantification des pools de nucléotides à l'aide de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem : applications à l'étude de la progression tumorale. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. <NNT : 2015LYO10217>. <tel-01276679>

HAL Id: tel-01276679

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01276679>

Submitted on 19 Feb 2016

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE EDISS

DIPLOME DE DOCTORAT

MACHON Christelle

Quantification des pools de nucléotides à l'aide de la chromatographie liquide
couplée à la spectrométrie de masse en tandem.
Applications à l'étude de la progression tumorale

Soutenue le 13 novembre 2015

*Directeurs de thèse : Pr Guitton Jérôme
Dr Jordheim Lars Petter*

**Jury : Pr Agrofoglio Luigi (rapporteur)
Dr Lipka Emmanuelle (rapporteur)
Pr Lefebvre-Tournier Isabelle
Pr Randon Jérôme
Pr Guitton Jérôme
Dr Jordheim Lars-Petter**

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé

Les nucléotides, terme regroupant les nucléosides monophosphate, diphosphate et triphosphate, sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires. Ils représentent les éléments constitutifs des acides nucléiques, fournissent de l'énergie à des réactions métaboliques, jouent le rôle de transporteurs et seconds messagers... L'exploration des pools nucléotidiques apparaît indispensable afin de connaître leur rôle précis dans des situations physiologiques ou pathologiques.

Nous avons développé une méthode de dosage des nucléotides endogènes (formes mono-, di- et triphosphate) par extraction en ligne sur colonne WAX couplée à la LC-MS/MS. La séparation analytique est réalisée sur colonne Hypercarb, sans agent de paire d'ions dans la phase mobile. Grâce à l'utilisation d'un triple quadripôle et une ionisation en mode positif, les nucléotides endogènes sont identifiés sans équivoque, y compris ceux possédant la même masse molaire. L'extraction et la séparation des nucléotides sont réalisées en 20 min. L'ensemble de la méthode, en comptant la ré-équilibration des colonnes, dure 37 min. La méthode de dosage a été validée pour les formes mono- et triphosphate et est applicable à des séries d'une vingtaine d'échantillons biologiques.

D'autre part, dans une étude pré-analytique basée sur les plans d'expériences, nous avons comparé les conditions de préparation d'échantillons en vue du dosage de nucléotides intracellulaires dans 4 lignées cellulaires : 2 adhérentes (Messa et NCI-H292) et 2 en suspension (RL et L1210). Nous avons montré que les conditions pré-analytiques optimales dépendent de la lignée cellulaire soulignant ainsi l'importance de cette phase dans l'analyse des nucléotides.

Enfin, l'expérience et les connaissances acquises lors du développement de la méthode de dosage des nucléotides ainsi que la large palette de molécules analysables avec cette méthode (nucléosides, nucléotides sucrés, autres métabolites), nous ont permis de développer des collaborations dans le domaine de la cancérologie avec différentes équipes de recherche. Par exemple, nous avons étudié l'implication des pools nucléotidiques dans le stress réplicatif induit par le stress oxydant et dans la reprogrammation cellulaire observée dans les cellules cancéreuses. Ainsi, les informations apportées par notre approche analytique, complémentaires des autres approches utilisées, ont montré l'implication des pools nucléotidiques dans la tumorigénèse.

En conclusion, ce travail a permis de développer une technique analytique et de mettre en place une méthode de travail pour le dosage des nucléotides endogènes dans différents milieux biologiques.

Mots clés : nucléotides endogènes, extraction en ligne, LC-MS/MS, pré-analytique, plans d'expériences, cancérologie

Intitulé et adresse du laboratoire de recherche :
EA3738 – Ciblage Thérapeutique en Oncologie
UFR Faculté de Médecin Lyon-Sud-Charles Mérieux BP12
165 Chemin du Grand Revoyet
69921 OULLINS Cedex

**Quantification of nucleotides pools with liquid chromatography coupled
with tandem mass spectrometry.
Applications in cancer research.**

Abstract

Nucleotides, term including nucleoside mono-, di- and triphosphates, are endogenous compounds playing various roles in biology. They are components of nucleic acids, provide energy to metabolic reactions and act as carriers or second messenger. The study of endogenous nucleotides has become of great interest in physiological and pathological conditions.

We developed a method for the quantification of endogenous nucleotides, using an on-line extraction on a WAX column coupled with LC-MS/MS. Analytical separation is performed on a Hypercarb column, without ion pairing agent in the mobile phase. The use of a triple quadrupole mass spectrometer following positive mode ionization allows the unambiguous identification of nucleotides presenting the same mass. Extraction and separation of nucleotides are achieved within 20 min and the method including re-equilibration of the two columns within 37 min. The method was validated for the quantification of nucleoside mono- and triphosphates, and could be applied to series of more than twenty biological samples.

Secondly, in a study based on design of experiments, pre-analytical parameters influencing results of intracellular nucleotides were compared in four cell lines. We demonstrated that optimal pre-analytical parameters depend on cell lines. This clearly highlights the importance of pre-analytical conditions for the quantification of intracellular nucleotides to be as representative as possible of the real levels in cells.

Then, thanks to experience acquired during the development and the validation of the analytical method, scientific collaborations have been established with several cancer research teams. For example, implication of nucleotide metabolism in replicative stress induced by oxidative stress or in the metabolic reprogramming in cancer cells was studied. Results obtained by our analytical approach were complementary to those obtained by other techniques.

To conclude, our work consisted on the study of the entire workflow for the analysis of endogenous nucleotides in various biological samples.

Keywords: endogenous nucleotides, on-line extraction, LC-MS/MS, preanalytical steps, design of experiments, cancer

Remerciements

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mes directeurs de thèse,

Le Professeur Jérôme Guitton

Vous m'avez accordé votre confiance pour mener à bien ce projet, et je vous en remercie. Votre disponibilité et votre soutien aussi bien au sujet du travail de thèse que de mon projet professionnel m'ont grandement aidée. Travailler avec vous est très enrichissant.

Le Docteur Lars Petter Jordheim

Tu as su te rendre toujours disponible tout au long de ce travail. Ton aide et ton esprit critique m'ont été précieux. Nous avons appris à nous connaître depuis 3 ans à-travers l'encadrement de ma thèse et les enseignements en chimie analytique. Travailler avec toi est très agréable.

J'exprime ma profonde reconnaissance aux membres du jury,

Le Professeur Luigi Agrofoglio

Pour avoir accepté de juger mon travail, pour votre lecture attentive et vos remarques constructives sur mon manuscrit.

Le Docteur Emmanuelle Lipka,

Pour avoir accepté de juger mon travail, pour votre lecture attentive et votre disponibilité lors de la finalisation du manuscrit.

Le Professeur Isabelle Lefebvre,

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury et de nous faire partager son expertise sur l'analyse des nucléotides.

Le Professeur Jérôme Randon,

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury et d'en accepter la présidence.

Je remercie les membres de mes Comités de Suivi de Thèse, les Professeurs Joëlle Goudable et Léa Payen, pour l'intérêt porté à l'avancement de mon travail.

J'associe à ces remerciements l'ensemble des personnes avec qui je travaille depuis 3 ans dans le cadre de mes fonctions d'AHU et de ma thèse,

Mes collègues du laboratoire de Biochimie du CBS, les techniciens du poste LC-MS/MS, mes « co-locataires » de bureau, mes « copines » de thé,

Mes collègues enseignants de Chimie Analytique de la faculté de Pharmacie de Lyon,

Le personnel de l'équipe du Pr Charles Dumontet, et tout particulièrement Emeline,

Les équipes du CRCL avec lesquelles nous avons développé des collaborations : Arnaud Vigneron, Serge Manié et son équipe, Christine Caux et Nicolas Gourdin,

Les équipes des Docteurs Pierre-Marie Girard (Institut Gustave Roussy) et Bernard Lopez (Institut Curie).

Enfin, je remercie vivement mes proches et mes amis pour m'avoir soutenue tout au long de ces années. Je n'ai pas l'impression d'avoir été trop pénible...

Table des matières

Liste des tableaux.....	9
Liste des figures.....	10
Liste des annexes	12
Abréviations.....	13
INTRODUCTION AU TRAVAIL DE THESE	14
1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'ANALYSE DES NUCLEOTIDES.....	26
1.1. Méthodes analytiques	27
1.1.1. Techniques séparatives	28
1.1.1.1. Méthodes chromatographiques.....	28
1.1.1.2. Méthodes électrophorétiques	35
1.1.2. Détection.....	36
1.1.2.1. Ionisation	36
1.1.2.2. Spectromètre de masse	37
1.2. Préparation des échantillons en vue du dosage de nucléotides.....	40
1.2.1. Matrices étudiées	40
1.2.2. Etapes pré-analytiques	43
1.2.3. Etudes comparatives des protocoles pré-analytiques	49
1.3. Méthodes de quantification des nucléotides	54
2. PARTIE EXPERIMENTALE.....	55
2.1. Développement et validation d'une méthode de dosage des nucléotides par extraction en ligne couplée à la LC-MS/MS.....	57
2.1.1. Objectifs	57
2.1.2. Résultats.....	58
2.1.3. Discussion.....	59
2.2. Optimisation des étapes pré-analytiques.....	63
2.2.1. Objectifs	63
2.2.2. Résultats.....	63
2.2.3. Discussion.....	64

3. APPLICATIONS	66
3.1. Applications directes de la méthode développée pour les nucléotides	68
3.1.1. Applications dans le cadre de l’instabilité génomique	68
3.1.1.1. Inhibition de la progression des fourches de réplication par le stress oxydant induit par des UVA	68
3.1.1.2. Inhibition de la progression des fourches de réplication par le stress oxydant dans des cellules déficientes en recombinaison homologue	70
3.1.2. Etude du rôle de la modulation de cN-II dans les cellules cancéreuses	72
3.2. Applications nécessitant une phase de développement analytique	75
3.2.1. Applications dans le cadre de la reprogrammation cellulaire	75
3.2.1.1. Implication des nucléotides de la voie des hexosamines dans le stress du réticulum endoplasmique	75
3.2.1.2. Etude du contrôle de l’homéostasie de cellules cancéreuses présentant des marqueurs de cellules souches	83
3.2.2. Régulation de la production d’adénosine extracellulaire	90
3.2.2.1. Introduction – Objectifs	90
3.2.2.2. Dosages d’ATP, d’AMP, d’adénosine et d’inosine dans des milieux de culture	91
CONCLUSION - PERSPECTIVES	99
ANNEXES	102
ARTICLES RELATIFS A LA PARTIE APPLICATIONS DE LA THESE	112
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	116

Liste des tableaux

Tableau 1. Nomenclature de nucléosides mono-, di- et triphosphate.	16
Tableau 2. Quantités intracellulaires de nucléotides au sein de différentes lignées cellulaires.	19
Tableau 3. Méthodes chromatographiques par paire d'ions utilisées pour l'étude des nucléotides et/ou analogues nucléotidiques.	30
Tableau 4. Méthode utilisant un agent de paire d'ions uniquement dans la solution de reprise des extraits secs.	30
Tableau 5. Méthodes chromatographiques en phase inverse utilisées pour l'étude des nucléotides.	31
Tableau 6. Méthodes chromatographiques utilisant une colonne PGC pour l'étude des nucléotides et/ou analogues nucléos(t)idiques.	32
Tableau 7. Méthodes chromatographiques utilisant la chromatographie par échange d'anions pour l'étude des nucléotides et/ou analogues nucléos(t)idiques.	34
Tableau 8. Méthodes chromatographiques utilisant le mode HILIC pour l'étude des nucléotides.	35
Tableau 9. Méthodes utilisant l'électrophorèse capillaire pour l'étude des nucléotides.	35
Tableau 10. Transitions d'ATP et dGTP rapportées par Cohen et al. après ionisation en mode négatif et en mode positif.	38
Tableau 11. Travaux (publiés depuis 2005) relatifs aux nucléotides et/ou analogues nucleot(s)idiques dans des matrices biologiques.	42
Tableau 12. Procédures de préparation des PBMC comparées par Derissen et al. en vue du dosage d'UTP intracellulaire.	50
Tableau 13. Protocoles d'extraction de métabolites intracellulaires comparés par Dietmair et al.	52
Tableau 14. Description des 5 protocoles d'extraction comparés par Canelas et al.	53
Tableau 15. Gammes d'étalonnage de dATP, TTP, dCTP et dGTP utilisées pour les dosages dans les cellules MRC5.	69
Tableau 16. Gammes d'étalonnage de dATP, TTP, dCTP et dGTP utilisées pour les dosages dans les lignées cellulaires V79 et VC8.	71
Tableau 17. Transitions identifiées pour l'UDPGlcNAc, la NAcGlc-6-phosphate et le ribose-5-phosphate et l'IMP.	78
Tableau 18. Mode d'ionisation, transition et temps de rétention des molécules d'intérêt.	84
Tableau 19. Rendements d'extraction d'ATP, AMP, adénosine, inosine, ACP et ARL67156 pour différents pourcentages de NH ₄ OH 0,25% pH 10 dans la solution d'élution.	93
Tableau 20. Conditions expérimentales appliquées pour l'étude de la dégradation d'ATP en AMP, d'ATP ou AMP en adénosine et inosine.	94
Tableau 21. Gammes d'étalonnage réalisées en vue du dosage d'ATP, AMP, adénosine et inosine dans les milieux de culture.	95
Tableau 22. Transitions respectives des molécules suivies en spectrométrie de masse.	95

Liste des figures

Figure 1. Structure des nucléotides. Les bases présentées dans la figure sont les bases constituant les acides nucléiques.	15
Figure 2. Synthèse <i>de novo</i> des nucléotides puriques et pyrimidiques (schéma simplifié).....	17
Figure 3. Incorporation des nucléotides dans les acides nucléiques.	20
Figure 4. Structures de l'AMP cyclique et du GMP cyclique.	21
Figure 5. Formules de nucléotides sucrés : UDP-glucose (A), UDP-N-acétylglucosamine (B) et GDP-mannose (C).	22
Figure 6. Formules du NADP ⁺ et du FAD	22
Figure 7. Exemples d'analogues nucléosidiques et nucléotidiques et leurs modifications par rapport aux molécules endogènes.	23
Figure 8. Modèle proposé par Bester et al. pour décrire les évènements aboutissant à une instabilité génomique dès les stades précoces de cancer.	24
Figure 9. Valeurs des pKa des nucléosides monophosphate (adapté de (Rodríguez-Gonzalo et al., 2014)).	28
Figure 10. Fragmentation des nucléosides triphosphate (exemple de l'ATP) et des nucléosides monophosphate (exemple de l'AMP) après ionisation en mode négatif.	38
Figure 11. Différenciation de l'aza-CTP, de l'UTP et de l'isotope [13C]-CTP par LTQ-Orbitrap.....	39
Figure 12. Etapes pré-analytiques réalisées en vue du dosage des nucléotides dans des matrices biologiques. Les étapes encadrées par des pointillés ne sont pas effectuées systématiquement.....	44
Figure 13. Surfaces relatives de l'UTP (la surface la plus grande observée correspond au 100%) avec les différents protocoles d'extraction sur des PBMC.	50
Figure 14. Etude de la stabilité de l'AMP, du GMP et de l'ATP sur le passeur à 5 °C.	60
Figure 15. Comparaison de la stabilité de l'AMP, du GMP et de l'ATP sur le passeur à 5 °C, après extraction hors ligne ou non	61
Figure 16. Etude de la stabilité de l'AMP sur le passeur à 5 °C.	61
Figure 17. Evolution des taux de dNTP dans des cellules MRC5 irradiées par UVA, en l'absence (A) ou en présence (B) d'azide de sodium.	69
Figure 18. Quantités de dNTP dans les cellules VC79 "contrôle", après traitement par hydroxyurée ou peroxyde d'hydrogène.	71
Figure 19. Exemple de chromatogrammes obtenus avec des échantillons de la lignée ADF.	73
Figure 20. Stress du RE et réponse UPR.	75
Figure 21. Voie des hexosamines. La voie des hexosamines proprement dite s'arrête au niveau de l'UDPGlcNAc.	76
Figure 22. Relations voie des hexosamines, stress du RE et réponse UPR.	77
Figure 23. Comparaison des fragments formés (nature et abondance) par le NAcGlc-6-phosphate et le NAcGlc-1-phosphate.	79
Figure 24. Comparaison des chromatogrammes obtenus pour la NAcGlc-6-phosphate, l'UDPHexNAc et l'IMP dans un couple « tumeurs / tissus sains ».	81
Figure 25. Comparaison des quantités d'UDPHexNAc, NAcGlc-6-phosphate, IMP et ribose-5-phosphate dans des tumeurs et tissus sains adjacents.	82
Figure 26. Western-blot obtenu pour des marqueurs protéiques de la réponse UPR et des enzymes de la voie des hexosamines.....	82
Figure 27. Exemple de chromatogrammes obtenus après analyse d'un échantillon cellulaire.....	85

Figure 28. Formation de l'UDPGlc et de l'UDPGlcNAc à partir du glucose. Les carbones provenant du glucose marqué sont signalés par un point rouge.	86
Figure 29. Chromatogrammes de l'UDPGlc et de l'UDPGlcNAc à T0 et T2h après incubation des cellules dans un milieu contenant du glucose ¹³ C ₆	87
Figure 30. Cinétique de formation d'UDPGlc et UDPGlcNAc marqué après ajout de glucose marqué dans le milieu de culture. Exemple de la lignée cellulaire Twist1.....	88
Figure 31. Mécanisme proposé pour expliquer l'adaptation des cellules présentant un marqueur de cellules souches en réponse à un oncogène.	89
Figure 32. Effets pro-tumoraux et immunosuppresseurs de l'adénosine (d'après (Spychala, 2000))..	90
Figure 33. Production d'adénosine dans le milieu extracellulaire.	90
Figure 34. Formules développées de l'ATP, l'AMP, l'adénosine et l'inosine.	91
Figure 35. Formules développées de l'APCP et de l'ARL67156.....	91
Figure 36. Concentrations en ATP, AMP, adénosine et inosine dans les milieux de culture après incubation avec ATP et avec AMP.	96
Figure 37. Concentrations en ATP, AMP et adénosine dans les milieux de culture après incubation avec ATP.	97
Figure 38. Intensité d'expression de lymphocytes exprimant CD39 purifiés à partir de sang périphérique et d'une tumeur mammaire.....	97
Figure 39. Concentrations en ATP, AMP et adénosine dans les milieux de culture après incubation avec ATP des lymphocytes Treg provenant d'une tumeur mammaire ou de sang périphérique.	98

Liste des annexes

Annexe 1 : Quantités de nucléosides triphosphate (en pmol/million de cellules) au sein de la lignée cellulaire L1210.

Annexe 2 : Stratégie de préparation du MIP développée par Breton et al. pour l'extraction de l'AMP en solution aqueuse.

Annexe 3 : Comparaison des chromatogrammes provenant d'une colonne neuve et de la même colonne après 800 injections.

Annexe 4 : Poster présenté au 16th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man (Juin 2015, New-York).

Annexe 5 : Schémas de fragmentation des nucléotides, nucléosides et autres molécules analysées avec la méthode développée pour les nucléotides.

Annexe 6 : Lignées cellulaires utilisées dans la partie Applications.

Annexe 7 : Place de la voie des hexosamines dans le métabolisme du glucose.

Annexe 8 : Composition complète du milieu de culture RPMI1640 (ThermoFisher).

Abréviations

ACN	acétonitrile
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
DEA	diéthylamine
dNDP	désoxyribonucleosides diphosphate
dNMP	désoxyribonucleosides monophosphate
dNTP	désoxyribonucleosides triphosphate
HA	hexylamine
HBP	hexosamine biosynthetic pathway
HILIC	hydrophilic interaction chromatography
LAL	leucémie aiguë lymphoïde
LMC	leucémie myéloïde chronique
MIP	molecularly imprinted polymers
MRM	multiple reaction monitoring
NDP	ribonucleosides diphosphate
NMP	ribonucleosides monophosphate
NTP	ribonucleosides triphosphate
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PGC	porous graphitic carbon
PPi	pyrophosphate
PRPP	phosphoribosylpyrophosphate
RE	réticulum endoplasmique
RNR	ribonucléotide réductase
ROS	espèces réactives de l'oxygène
SPE	solid phase extraction
THF	tétrahydrofurane
UDPGlcNAc	UDP-N-acétylglucosamine
UPR	unfolded protein response
WAX	weak anion exchange

INTRODUCTION AU TRAVAIL DE THESE

Les nucléotides sont des molécules endogènes indispensables au fonctionnement des cellules. Ils sont présents dans toutes les cellules nucléées de l'organisme, ainsi que dans les érythrocytes, les plaquettes et les fluides biologiques.

Du point de vue structural, les nucléotides sont constitués de trois éléments :

- Une base azotée : soit purique (adénine, guanine, hypoxanthine), soit pyrimidique (cytosine, uracile, thymine)
- Un pentose : ribose ou désoxyribose
- Un, deux ou trois groupements phosphates

L'ensemble base azotée + pentose constitue le nucléoside. La liaison se fait entre le carbone 1' du pentose et l'azote 9 des bases puriques ou l'azote 1 des bases pyrimidiques (Figure 1).

L'addition en 5' du pentose d'un, deux ou trois groupements phosphates conduit respectivement à la formation des nucléosides monophosphate, diphosphate ou triphosphate (Figure 1).

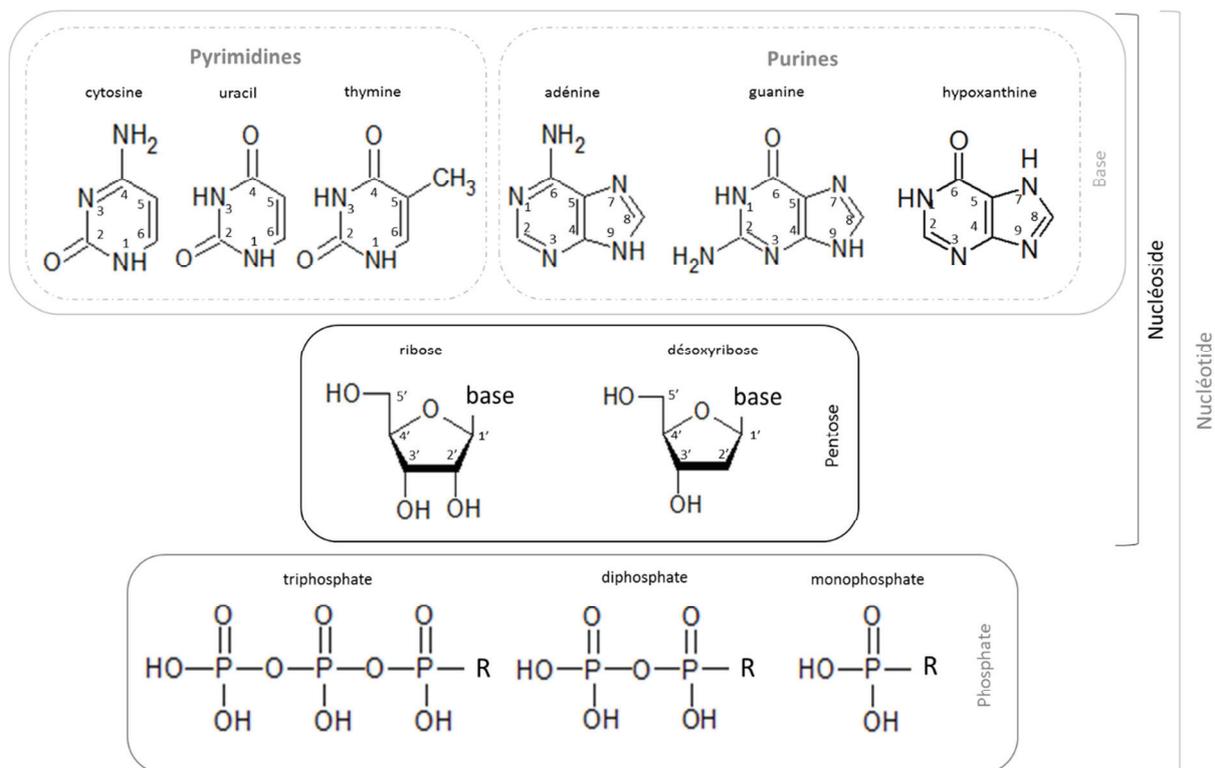


Figure 1. Structure des nucléotides. Les bases présentées dans la figure sont les bases constituant les acides nucléiques.

Le terme général de nucléotides regroupe les nucléosides monophosphate, diphosphate et triphosphate. Lorsque le pentose est le ribose, on parle de ribonucléotides. Lorsque qu'il s'agit du désoxyribose, on parle de désoxyribonucléotides.

Base	Nucléoside	Nucléotide		
		Mono-	Di-	Triphosphate
Adénine	Adénosine	AMP	ADP	ATP
	Désoxyadénosine	dAMP	dADP	dATP
Guanine	Guanosine	GMP	GDP	GTP
	Désoxyguanosine	dGMP	dGDP	dGTP
Cytosine	Cytidine	CMP	CDP	CTP
	Désoxycytidine	dCMP	dCDP	dCTP
Uracil	Uridine	UMP	UDP	UTP
Thymine	Thymidine	TMP	TDP	TTP
Hypoxanthine	Inosine	IMP	IDP	ITP
	Désoxyinosine	dIMP	dIDP	dITP

Tableau 1. Nomenclature de nucléosides mono-, di- et triphosphate.

- **Synthèse des nucléotides**

Les nucléotides sont principalement synthétisés soit par les voies de synthèse *de novo*, c'est-à-dire à partir de précurseurs métaboliques (acides aminés, ribose-5-phosphate, CO₂, NH₃), soit par les voies de récupération, c'est-à-dire par recyclage des bases et des nucléosides issus de la dégradation des acides nucléiques.

Le point de départ de la synthèse *de novo* est le phosphoribosylpyrophosphate (PRPP), formé à partir de ribose-5-phosphate et d'ATP (donneur de pyrophosphate). Le PRPP constitue un carrefour métabolique car il est à l'origine de la synthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques (Figure 2). La synthèse *de novo* comprend de nombreuses étapes, fait intervenir un grand nombre d'enzymes et d'acides aminés (glutamine, glycine, acide aspartique) et a besoin d'ATP et de GTP comme fournisseurs d'énergie. Du côté de la synthèse des nucléotides puriques, l'IMP constitue un embranchement car il peut être transformé en AMP ou GMP.

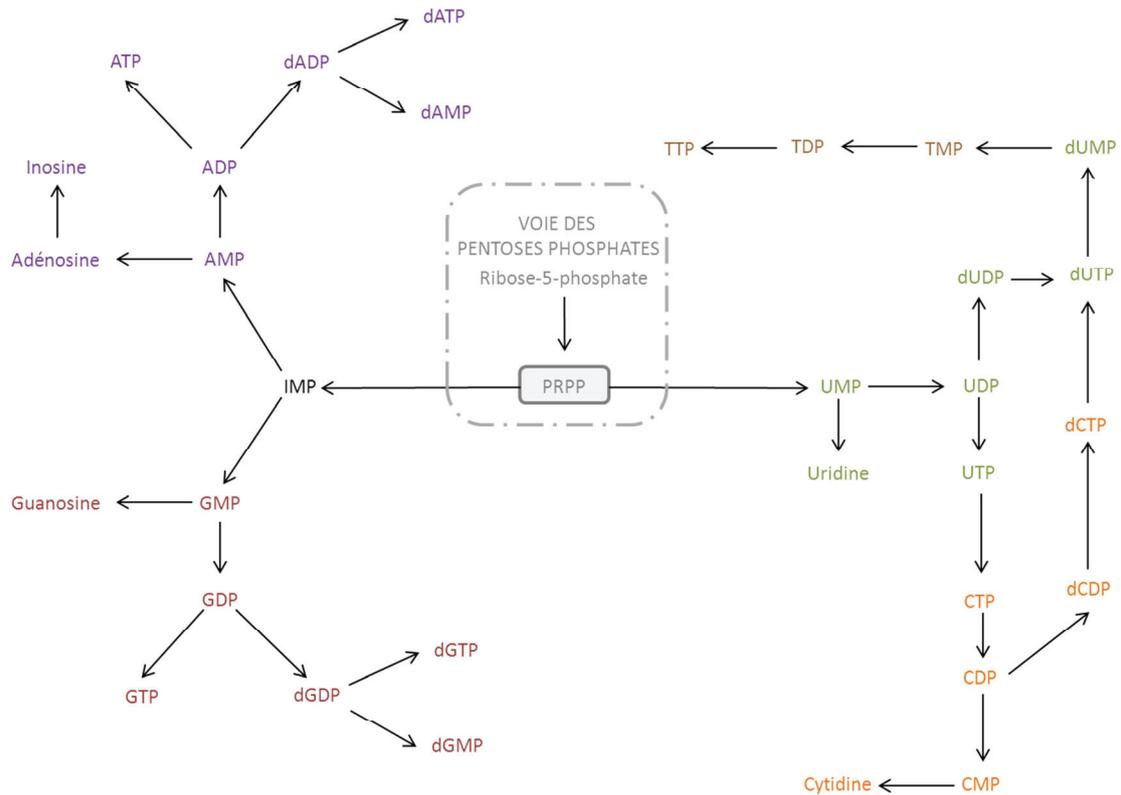


Figure 2. Synthèse *de novo* des nucléotides puriques et pyrimidiques (schéma simplifié). PRPP : phosphoribosylpyrophosphate.

La synthèse par les voies de récupération se fait en une étape par réaction entre une base purique et le PRPP ou entre un nucléoside et un donneur de phosphate, catalysée par une enzyme. Par exemple, l'AMP est synthétisée à partir de l'adénine selon la réaction suivante :



- **Quantités et répartition intracellulaire**

Les quantités intracellulaires de nucléotides varient selon la nature du nucléotide et du type cellulaire (tableau 2). Une différence importante au niveau des quantités intracellulaires est observée. Par exemple, les quantités intracellulaires d'ATP sont de l'ordre du nmol / million de cellules, alors qu'elles sont de l'ordre du pmol / million de cellules pour les désoxyribonucléotides. Le tableau 2 montre également une grande hétérogénéité dans les quantités de nucléotides intracellulaires entre lignées cellulaires. Zhang et al. ont ainsi rapporté des quantités intracellulaires de NTP trois à huit fois plus faibles dans la lignée cellulaire HepG2 par rapport à la lignée cellulaire H1975. Au sein d'une même lignée cellulaire (L1210), les résultats rapportés par Cohen et al. et Van Moorsel et al. montrent une forte variabilité des quantités intracellulaires de nucléosides triphosphate (Cohen et al., 2009; van Moorsel et al., 2000).

Différentes explications à ces variations peuvent être avancées :

- Une réelle variabilité inter-lignée des quantités intracellulaires de nucléotides
- L'hétérogénéité des méthodes d'analyse employées, et leur absence de standardisation

- Les conditions pré-analytiques différentes d'une publication à l'autre
- Une variabilité intercellulaire au sein d'une même lignée cellulaire. Cohen et al. ont montré une différence dans les résultats de dosages de nucléosides triphosphate au sein de la lignée cellulaire L1210 entre différentes cultures (mêmes conditions de culture à chaque expérience) (Annexe 1) (Cohen et al., 2009).

Lignée	pmol / million de cellules (écart-type)									
	ATP	UTP	CTP	GTP	dATP	TTP	dCTP	dGTP	ATP + dGTP	
MV411		315,6 (17,3)	165,0 (11,8)	607,8 (20,4)	1,53 (0,34)	7,56 (0,63)	1,93 (0,58)		2642,9 (219,3)	n = 3 (Chen et al., 2009)
K562		1184,7 (67,6)	329,6 (46,2)	1045,0 (58,4)	2,7 (0,96)	17,6 (7,23)	4,8 (0,77)		3532,1 (123,6)	
NB4		302,1 (26,4)	137,2 (19,3)	582,7 (67,8)	6,98 (0,62)	5,04 (0,98)	2,21 (0,39)		2767,4 (271,0)	
L1210	4910 (571)	827 (20)	211 (7)	461 (11)	8,85 (0,56)	15,9 (1,0)	8,84 (0,55)	3,54 (0,48)		n = 17 (Cohen et al., 2009)
L1210	387 (172)	187 (48)	73 (13)	135 (33)						n = 3 (van Moorsel et al., 2000)
H322	2563 (398)	1209 (150)	247 (45)	560 (33)						
SW1573	5028 (546)	2586 (416)	780 (158)	1491 (132)						
pmol / million de cellules										
	ATP	UTP	CTP	GTP	AMP	UMP	CMP			
CHO	890	130	50	80	50	30	30			(Cordell et al., 2008)
pmol / million de cellules (écart-type)										
	ATP	UTP	CTP	GTP	AMP	UMP	CMP	GMP		
PBMC	2660 (558)	452 (105)	216 (60)	459 (95)	256 (83)					n = 10 (Daxecker et al., 2001)
PANC1	6190 (536)	3980 (111)	3221 (275)	2464 (128)	132 (201)	54 (5)	340 (33)	25 (2)		
H1975	10157 (476)	7608 (375)	3791 (71)	4920 (153)	167 (12)	120 (10)	586 (39)	31 (1)		
HepG2	3159 (75)	1971 (244)	427 (44)	1246 (106)	355 (56)	259 (27)	256 (36)	125 (19)		
H23	4434 (275)	3143 (70)	2200 (75)	2496 (139)	60 (8)	29 (3)	368 (31)	13 (2)		

Tableau 2. Quantités intracellulaires de nucléotides au sein de différentes lignées cellulaires.

La répartition du pool nucléotidique à l'intérieur d'une cellule est également hétérogène. Une compartimentation dans des organites intracellulaires tels que les mitochondries, des granulations intra-cytoplasmiques ou le noyau a été rapportée (Moyer and Henderson, 1985). Par exemple, le rapport ATP/ADP est différent entre le cytoplasme et les mitochondries d'une même cellule, en faveur du cytoplasme ou de la mitochondrie selon la nature des cellules (Matuszczyk et al., 2015; Moyer and Henderson, 1985). Il a également été décrit une fixation des nucléotides à des protéines (par exemple : l'ATP à l'hémoglobine, l'ADP à l'actine, le GTP à la tubuline) (Moyer and Henderson, 1985). Le pourcentage d'ADP total lié à l'actine varie de 5% à 80% selon les études (Moyer and Henderson, 1985). Cela montre que la répartition intracellulaire du pool nucléotidique est dépendante de la lignée cellulaire.

- **Rôles physiologiques des nucléotides**

En plus des nucléotides présentés précédemment, il existe différentes formes modifiées de nucléotides : nucléotides méthylés, hydroxylés. Un ou plusieurs motifs caractéristiques des nucléotides (base azotée, ribose) sont également retrouvés dans d'autres molécules : nucléotides cycliques, nucléotides sucrés, NAD, NADP, FAD... Cette grande diversité de structure permet aux nucléotides d'exercer de nombreuses fonctions physiologiques au sein du métabolisme cellulaire : constitution des acides nucléiques (éléments dépositaires de l'information génétique), fournisseurs d'énergie aux réactions chimiques du métabolisme, messagers intracellulaires, co-facteurs enzymatiques.

- **Éléments constitutifs des acides nucléiques**

Les nucléotides, sous forme de nucléosides monophosphate, constituent des unités monomériques des acides nucléiques. Les désoxyribonucléotides sont les constituants de l'ADN, et les ribonucléotides de l'ARN.

Pour former les brins d'acide nucléique, les nucléotides sont reliés entre eux par des ponts phosphodiester entre l'hydroxyle en 3' d'un nucléotide et l'hydroxyle en 5' du nucléotide voisin. Les nucléosides triphosphate servent de précurseurs à la synthèse d'acides nucléiques. Les deux groupements phosphates terminaux sont clivés lors de l'intégration du nucléotide dans l'acide nucléique (Figure 3).

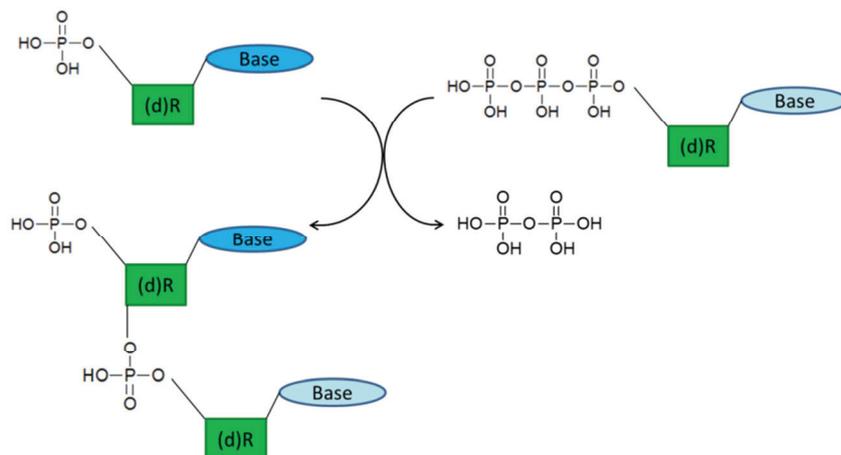


Figure 3. Incorporation des nucléotides dans les acides nucléiques.

○ Source d'énergie – Métabolisme énergétique

Les nucléosides triphosphate, principalement l'ATP, sont utilisés comme source d'énergie chimique pouvant servir à de nombreux processus métaboliques. L'énergie est fournie par l'hydrolyse des liaisons anhydrides entre les groupements phosphates (environ 30 kJ/mol pour l'hydrolyse de l'ATP en ADP). Des réactions impliquant des nucléotides autres que l'ATP permettent de libérer des groupements phosphates :

- CTP dans la synthèse des phospholipides
 $\text{CTP} + \text{choline} \rightarrow \text{CDP-choline} + \text{phosphate}$
- GTP lors de l'étape de traduction de l'ARNm en protéine au cours de la synthèse protéique

○ Messagers intracellulaires : rôle de second messenger

L'AMP cyclique (AMPC) est le plus connu des seconds messagers. Il joue un rôle de régulateur dans pratiquement toutes les cellules. Le GMP cyclique (GMPC) possède également des fonctions régulatrices.

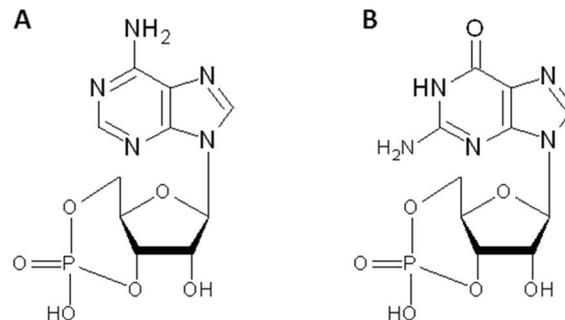


Figure 4. Structures de l'AMP cyclique (A) et du GMP cyclique (B).

○ Transporteur – Donneur de substrats

Certains nucléotides interviennent comme transporteurs dans des voies métaboliques. Par exemple, les nucléotides sucrés (UDP-glucose, UDP-galactose, UDP-N-acétylglucosamine, GDP-mannose) jouent le rôle de donneurs de groupement glycosyl dans les réactions de glycosylation.

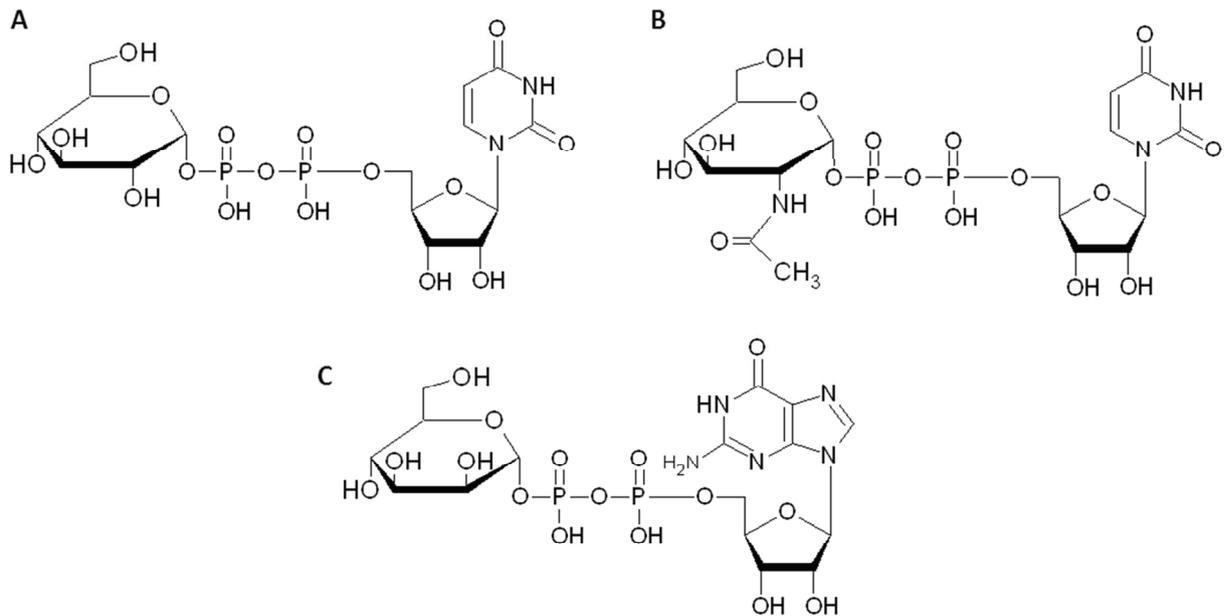


Figure 5. Formules de nucléotides sucrés : UDP-glucose (A), UDP-N-acétylglucosamine (B) et GDP-mannose (C).

○ Cofacteurs de réactions enzymatiques

Un certain nombre de cofacteurs enzymatiques possèdent l'adénosine dans leur structure (Figure 6). Par exemple, le FAD (flavine adénine dinucléotide) participe à des transferts d'électrons ; le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) et le NADP (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) à des transferts d'hydrures.

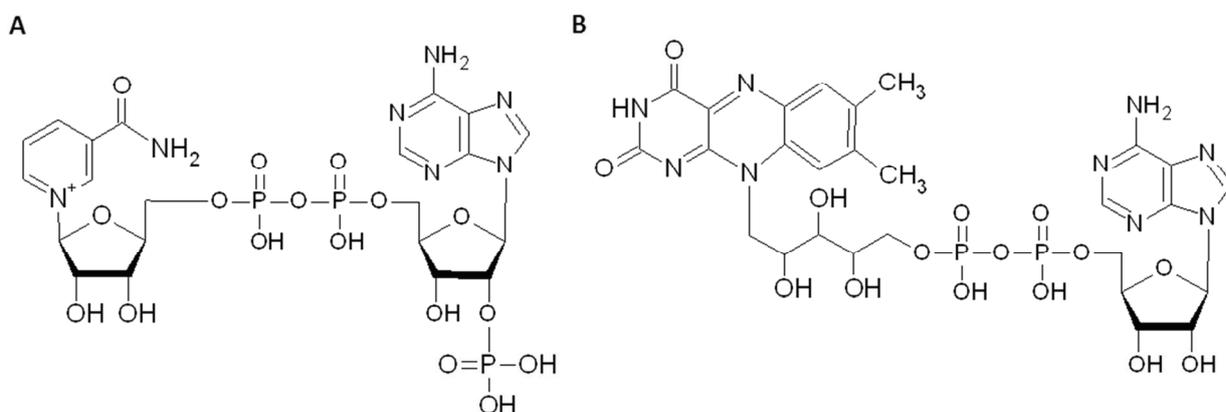


Figure 6. Formules du NADP⁺ (A) et du FAD (B).

● Analogues nucléosidiques et analogues nucléotidiques

Compte-tenu de l'implication des nucléotides dans le métabolisme cellulaire, des molécules interagissant avec le métabolisme nucléotidique ont été développées pour une utilisation thérapeutique comme anti-cancéreux, anti-viraux et immunosuppresseurs. Ces molécules, appelées analogues nucléosidiques et analogues nucléotidiques sont des médicaments ayant une structure proche des nucléotides. Ils présentent des modifications au niveau de la base ou du sucre (Figure 7).

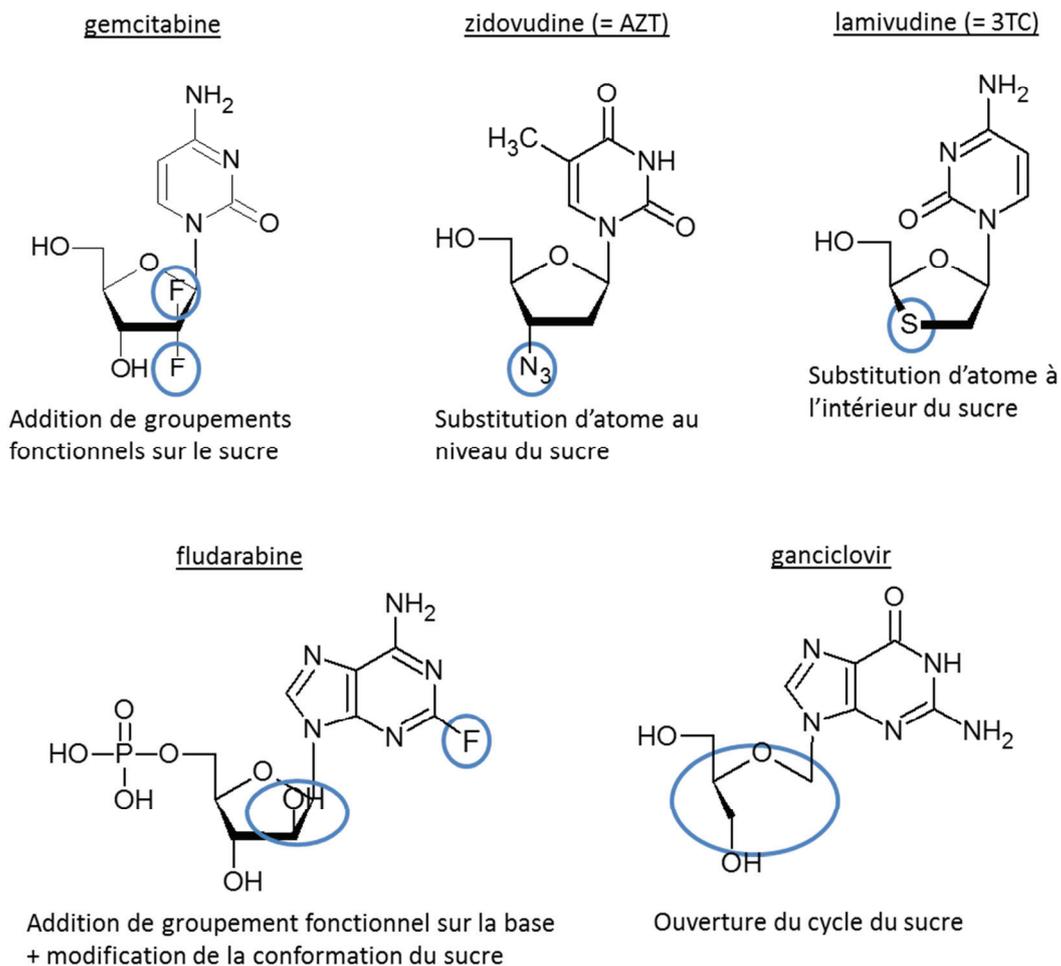


Figure 7. Exemples d'analogues nucléosidiques et nucléotidiques et leurs modifications par rapport aux molécules endogènes.

Pour être actifs, ils doivent être métabolisés selon les mêmes voies métaboliques que les nucléotides endogènes : ils sont ainsi transformés en dérivés mono-, di- et triphosphate. Les formes actives agissent par différents mécanismes tels que la compétition avec les nucléotides endogènes pour l'incorporation dans les acides nucléiques et l'inhibition d'enzymes intervenant dans le métabolisme des nucléotides.

- **Nucléotides et cancer**

L'instabilité génomique, une des caractéristiques du cancer décrites par Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011), peut être causée par un stress répliatif, c'est-à-dire par des anomalies au niveau de la réplication de l'ADN. Plusieurs auteurs ont étudié la relation entre les variations du pool nucléotidique intracellulaire et la réplication de l'ADN. Ainsi, des modifications des ratios entre les différents dNTP ont été associées à un taux d'erreur par les ADN polymérases plus élevé et par conséquent à un risque plus élevé de mutations dont l'accumulation peut initier l'oncogénèse (Mathews, 2006; Musk et al., 1996). Plus récemment, Anglana et al. ont rapporté que le pool nucléotidique intracellulaire est un facteur influençant largement la dynamique de réplication (Anglana et al., 2003). En effet, le traitement de cellules par un agent inhibant la ribonucléotide

réductase, enzyme impliquée dans le métabolisme des nucléotides, a entraîné une diminution de la vitesse de progression des fourches de réplication. La principale étude démontrant l'importance cruciale de la régulation du pool nucléotidique intracellulaire dans le processus de cancérogenèse est présentée par Bester et al. (Bester et al., 2011). Les auteurs ont montré que des kératinocytes humains exprimant un oncogène (protéines E6 et E7 du papillomavirus humain ou la cycline E) présentent des erreurs au niveau de la réplication et des dommages à l'ADN. Conjointement au stress réplcatif, une diminution d'un facteur 2 à 5 des quatre dNTP a été observée dans ces cellules. De façon remarquable, un apport exogène en nucléosides (ajout dans le milieu de culture des cellules) a entraîné une augmentation du pool nucléotidique et a protégé les cellules contre les dommages à l'ADN. De même, une activation de la biosynthèse des nucléotides a permis de retrouver une réplication normale. Cette étude a donc montré le rôle d'une déficience en nucléotides dans la génération d'un stress réplcatif et d'une instabilité génomique dès les stades précoces de cancer (figure 8).

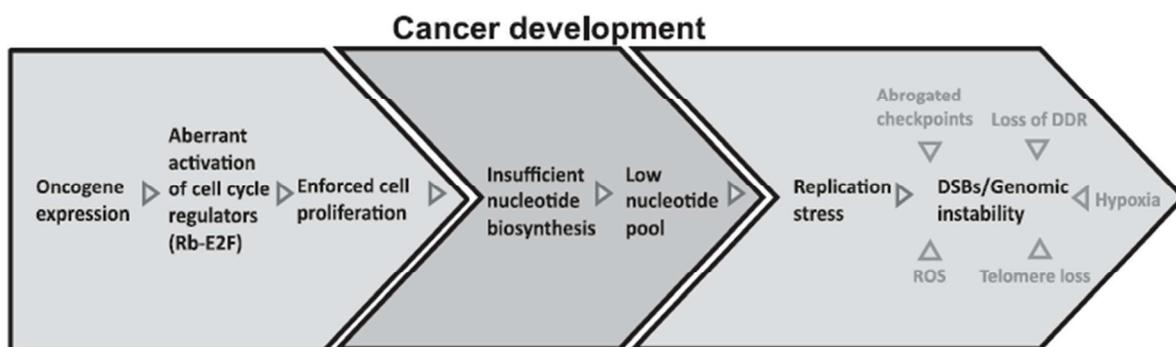


Figure 8. Modèle proposé par Bester et al. pour décrire les événements aboutissant à une instabilité génomique dès les stades précoces de cancer (Bester et al., 2011). ROS: reactive oxygen species, DDR: DNA damage response, DSBs: double-strand breaks.

Ainsi, l'étude du métabolisme nucléotidique est devenue un sujet important de la recherche sur le cancer.

L'étude des pools nucléotidiques intéresse également des équipes travaillant sur les hémopathies malignes. Un déséquilibre du pool nucléotidique a ainsi été rapporté dans des lignées cellulaires leucémiques et dans des cellules du sang périphérique de patients atteints de leucémie aiguë lymphoïde (LAL) ou de leucémie myéloïde chronique (LMC) (Baranowska-Bosiacka et al., 2005; De Korte et al., 1986, 1987). Dans une étude incluant 29 patients atteints de LAL, De Korte et al. ont montré une augmentation significative de la plupart des nucléotides dans les cellules blastiques du sang périphérique des patients par rapport aux lymphocytes des sujets sains. Ces perturbations concernaient aussi bien les formes mono-, di- et triphosphate des nucléotides (De Korte et al., 1987). Un déséquilibre du pool nucléotidique a également été mis en évidence à-travers la diminution significative des rapports purine/pyrimidine, adénine/guanine et uracil/cytosine. Aucune perturbation n'a été retrouvée chez des patients en rémission de LAL; suggérant que les modifications du pool nucléotidique sont associées au processus leucémique (De Korte et al., 1986). Le traitement des hémopathies malignes fait appel aux analogues nucléos(t)idiques. Les dérivés phosphorylés des analogues nucléos(t)idiques exercent leur activité cytotoxique par interaction avec les enzymes du métabolisme des nucléotides et par incorporation dans l'ADN et l'ARN; induisant ainsi la mort cellulaire par apoptose (Jordheim and Dumontet, 2007). Différents auteurs ont mis en

avant l'influence du pool nucléotidique sur l'activité des analogues nucléos(t)idiques (Chen et al., 2011; Grem and Allegra, 1990; Yoshio et al., 2005). Sur des cellules de cancer du colon, Grem et al. ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur de la CTP synthétase augmentait la toxicité de l'ara-C (1- β -D-arabinosyl-5-azacytosine) et de l'ara-AC (arabinosyl-5-azacytosine) ainsi que leur incorporation dans l'ADN en diminuant significativement les taux de CTP (Grem and Allegra, 1990). L'apport de désoxycytidine simultanément au traitement par ara-AC a protégé en partie les cellules de la toxicité de l'ara-AC. Dans les hémopathies malignes, Yoshio et al. ont étudié le pool nucléotidique de 2 lignées cellulaires leucémiques de souris : une lignée cellulaire hautement résistante à la fludarabine (F-ara-A), l'autre faiblement résistante. Une augmentation significative des dNTP ainsi qu'une diminution de l'incorporation de F-ara-A dans l'ADN ont été retrouvées dans les cellules hautement résistantes (Yoshio et al., 2005). L'étude du pool nucléotidique intracellulaire pourrait donc présenter un intérêt en vue du choix thérapeutique après diagnostic de leucémie.

Les nucléotides sont des molécules endogènes présentes dans les milieux biologiques, possédant de nombreuses fonctions essentielles au métabolisme cellulaire. Leur rôle comme élément constitutif des acides nucléiques rend l'étude des dNTP intracellulaires indispensable pour comprendre les mécanismes aboutissant à l'instabilité génomique dans les cancers. L'étude des pools nucléotidiques présente également de l'intérêt dans l'exploration de la biochimie cellulaire des cellules cancéreuses. Enfin, le métabolisme nucléotidique étant une cible des thérapeutiques par agents nucléos(t)idiques, la compréhension des relations de « compétition » entre nucléotides endogènes et analogues est essentielle, notamment dans les cas de résistance aux thérapeutiques.

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'ANALYSE DES NUCLEOTIDES

Sur la base de cette introduction, il semble évident qu'il existe un besoin de pouvoir étudier et quantifier les différents nucléotides dans divers milieux biologiques. La littérature concernant les méthodes de dosage des nucléotides est assez riche (plus de 100 publications). La principale technique rapportée est la chromatographie liquide (HPLC ou UPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Les matrices analysées sont quant à elles très diverses et les protocoles de préparation d'échantillons présentent une grande hétérogénéité.

L'analyse du pool nucléotidique se révèle difficile car :

- Il existe de nombreux nucléotides, présentant des structures proches.
- De grandes différences de concentrations entre nucléotides sont observées dans les milieux biologiques.
- Les matrices étudiées sont complexes.

De par les similitudes de structure entre analogues nucléos(t)idiques et nucléotides endogènes, des protocoles analytiques développés pour les analogues peuvent convenir à l'analyse des nucléotides endogènes, et inversement.

Dans cette partie bibliographique, sont abordées les méthodes d'analyse des nucléotides, avec les présentations successives des méthodes séparatives et des méthodes de détection utilisées. Ensuite, les différents protocoles de préparation d'échantillons en vue du dosage de nucléotides dans des matrices biologiques sont exposés.

1.1. Méthodes analytiques

Les nucléotides endogènes représentent un grand nombre de composés : au minimum 8 monophosphates, 8 diphosphates, 8 triphosphates, plus les nucléotides cycliques et des dérivés des nucléotides. Les nucléotides sont recherchés dans des matrices biologiques ou alimentaires (lait, soupes, légumes, boissons...) donc en présence d'autres composés endogènes pouvant interférer lors de l'analyse. De ce fait, une méthode séparative est quasiment toujours utilisée. Seuls Quinn et al. ont analysé 9 nucléosides monophosphate, sans séparation préalable, en injectant directement l'échantillon dans la source du spectromètre de masse (Quinn et al., 2013). Cependant, les échantillons analysés dans cette publication étaient uniquement des solutions aqueuses de nucléotides donc une matrice simple.

En plus des méthodes faisant appel aux techniques séparatives, il existe des kits d'analyse commercialisés pour l'analyse de certains nucléotides. Deux techniques sont utilisées dans ces kits :

- Technique basée sur la bioluminescence
- Techniques colorimétriques ou fluorescentes

Les principes de ces techniques ainsi que leurs applications ne seront pas développés dans ce travail.

1.1.1. Techniques séparatives

La méthode séparative la plus utilisée pour les dosages de nucléotides est la chromatographie liquide. Quelques auteurs travaillent en électrophorèse capillaire.

Les principales difficultés de la méthode séparative sont dues aux structures relativement proches des différents nucléotides, et à leur polarité. Les nucléotides possèdent de nombreux groupements fonctionnels ionisables donc plusieurs pKa (Figure 9). Selon le pH, les nucléotides seront ionisés positivement ou négativement, et présenteront une ou plusieurs charges.

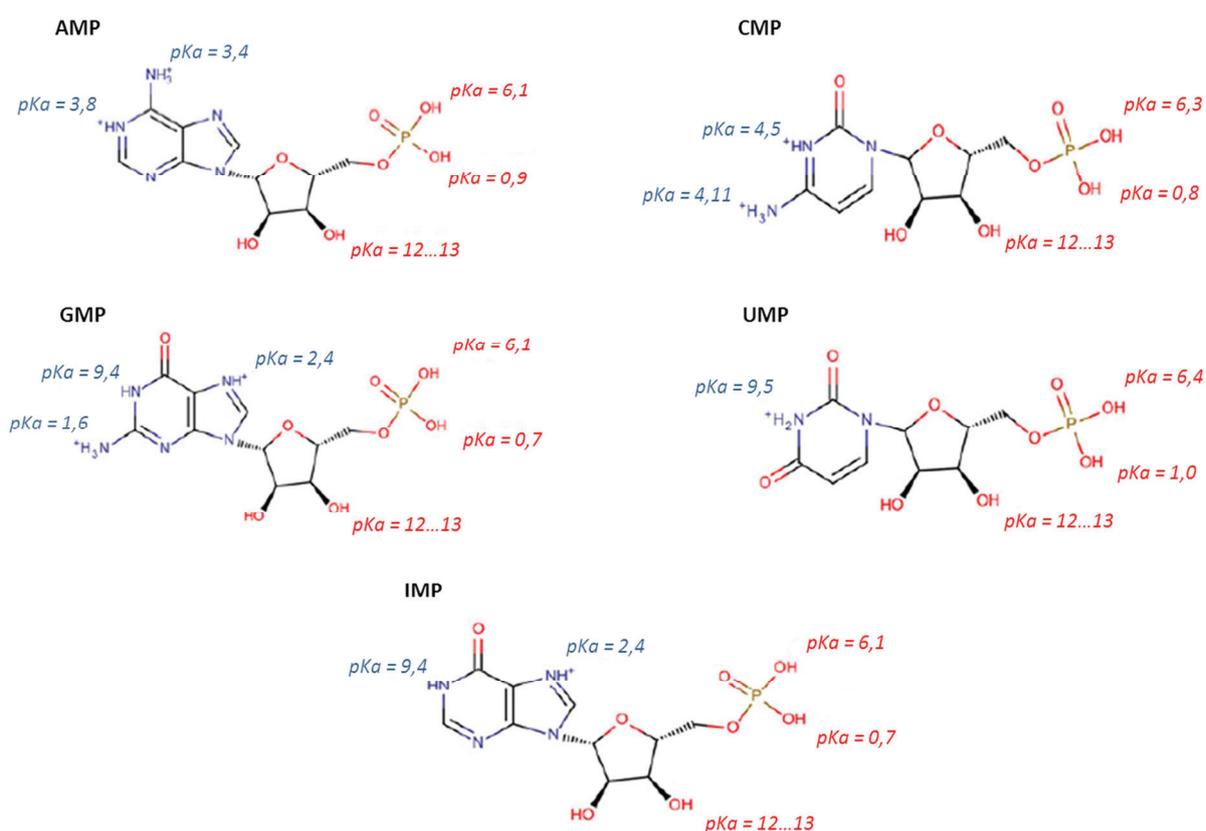


Figure 9. Valeurs des pKa des nucléosides monophosphate (adapté de (Rodríguez-Gonzalo et al., 2014)).

1.1.1.1. Méthodes chromatographiques

Dans cette partie, seront présentées uniquement des méthodes publiées d'HPLC ou UHPLC depuis les revues de Cohen et al. sur les nucléotides et analogues nucléotidiques et de Jansen et al. sur les analogues nucléotidiques (Cohen et al., 2010; Jansen et al., 2011).

Compte tenu de leur polarité, les nucléotides sont peu retenus sur des phases stationnaires greffées C18. Pour pallier à ce problème, un agent de paire d'ions est ajouté dans la phase mobile pour permettre leur rétention sur les colonnes C18. Ainsi, le mode chromatographique le plus utilisé est la chromatographie par paire d'ions. Cependant, les agents de paire d'ions endommagent les colonnes et pour la plupart ne sont pas volatiles donc perturbent l'ionisation en spectrométrie de masse (Quinn et al., 2013). Des auteurs ont donc cherché d'autres méthodes chromatographiques pour, soit réduire la quantité d'agent de paire d'ions utilisée, soit s'en passer.

Ainsi, cinq modes chromatographiques sont utilisés pour la séparation des nucléotides et/ou analogues nucléot(s)idiques : paire d'ions, phase inverse, carbone graphite, échange d'anions et HILIC.

- **Chromatographie par paire d'ions**

La chromatographie par paire d'ions est la méthode « historique » et reste la plus publiée. Un ou plusieurs agents de paire d'ions sont présents dans la phase mobile afin de permettre la rétention des nucléotides, surtout les triphosphates, sur la phase stationnaire. Les conditions utilisées dans les méthodes chromatographiques par paire d'ions sont présentées dans le tableau 3. De nombreux composés font office d'agent de paire d'ions.

Nucléotides analysés	Colonne	Phase mobile	Temps d'analyse	Auteurs - Année Validation
NTP, dNTP, métabolite triphosphorylé d'un AN	Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 µm)	A : hexylamine 5 mM + DEA 0,5% dans eau ; pH 10 B : ACN/eau (50/50)	68 min	(Kamčeva et al., 2015) Validation complète
NMP, NDP, NTP, dNMP, dNDP, dNTP	Acquity UPLC HSS T3 (100 x 2,1 mm ; 1,8 µm)	A : formiate d'ammonium 10 mM + DBAA 1,25 mM dans eau ; pH 5,2 B : formiate d'ammonium 10 mM + DBAA 1,25 mM dans eau/ACN (10/90)	15 min	(Laourdakis et al., 2014) Validation partielle
AMP, ADP, ATP, GDP, GTP	C18 Supelco Discovery (250 x 4,6 mm ; 5 µm)	A : phosphate de potassium 36 M + TBAHS 8 mM + ACN 2% ; pH 7 B : phosphate de potassium 36 M + TBAHS 8 mM + ACN 15% ; pH 7	90 min	(Graven et al., 2014) Validation partielle
dNTP, métabolite triphosphorylé d'un AN	XBridge C18 (100 x 3 mm ; 3,5 µm)	A : hexylamine 5 mM dans eau ; pH 6,3 B : hexylamine 5 mM + acétate d'ammonium 10 mM dans eau/ACN (10/90) ; pH 8,5	9 min	(Coulier et al., 2011) Validation partielle
NMP, NDP, NTP, dNMP, dNDP, dNTP	X-Terra MS C18 (150 x 2x1 mm ; 3,5 µm)	A : hexylamine 5 mM + DEA 0,5% dans eau ; pH 10 B : ACN/eau (50/50)	70 min	(Zhang et al., 2011) Pas de validation
NMP, NDP, NTP	Acquity UPLC HSS T3 (100 x 2,1 mm ; 1,8 µm)	A : formiate d'ammonium 10 mM + DHAA 1,25 mM dans eau ; pH 5 B : DHAA 1,25 mM dans ACN	85 min 85 min	(Yamaoka et al., 2010, 2011) Validation complète
NMP	Zorbax SB Aq (250 x 4,6 mm ; 5 µm)	A : PDFOA 0,25 mM dans eau B : ACN	70 min	(Yang et al., 2010) Validation partielle

Nucléotides analysés	Colonne	Phase mobile	Temps d'analyse	Auteurs - Année Validation
dNTP, métabolite triphosphorylé d'un AN	Hypersil Gold C18 (100 x 1 mm ; 3 µm)	A : phosphate d'ammonium + hexylamine 3 mM B : ACN	30 min	(Fromentin et al., 2010) Validation partielle
NMP, NDP, NTP, dCMP, dNTP	Poroshell 120 PhenylHexyl (100 x 2,1 mm ; 2,7 µm)	A : tributylamine 10 mM + acide acétique 10 mM ; pH 5,5 B : tributylamine 10 mM + acide acétique 10 mM dans eau / méthanol (10/90)	36 min	(Magdenoska et al., 2013) Validation partielle
NMP, NDP, NTP	HILIC XBridge Amide (100 x 2,1 mm ; 3,5 µm)	A : DEA 50 mM + HFIP 100 mM dans eau ; pH 9 B : DEA 50 mM + HFIP 100 mM dans acetonitrile	Non renseigné	(Mateos-Vivas et al., 2015) Pas de validation
AMP, ADP, ATP, dGMP, dGDP, dGTP	Luna NH ₂ (50 x 2,0 mm ; 3 µm)	A : DEA 0,5% + HFIP 100 mM dans eau ; pH 8,9 B : DEA 0,5% + HFIP 100 mM dans ACN ; pH 8,9	7,5 min	(Zhang et al., 2014) Validation complète

Tableau 3. Méthodes chromatographiques par paire d'ions utilisées pour l'étude des nucléotides et/ou analogues nucléotidiques. Les agents de paire d'ions sont présentés en gras.

AN : analogue nucléos(t)idique, DBAA : acétate de dibutylamine, TBAHS : sulfate d'ammonium tétrabutylhydrogène, DEA : diéthylamine, DHAA : acétate de dihexylammonium, PDFOA : acide pentadecafluorooctanoïque, HFIP : hexafluoro-2-isopropanol

La plupart des phases stationnaires sont de type C18. Zhang et al. ainsi que Mateos-Vivas et al. utilisent un agent de paire d'ion, le DEA, avec un mode chromatographique de type (Mateos-Vivas et al., 2015; Zhang et al., 2014). La présence du DEA dans la phase mobile est présentée comme indispensable pour réduire les temps de rétention des nucléotides et éviter l'élargissement des pics chromatographiques.

Dans le but de diminuer la quantité d'agent de paire d'ions présent dans la colonne et dans la source du spectromètre de masse, Zhao et al. ont ajouté l'agent de paire d'ions uniquement dans la solution de reprise des extraits cellulaires secs (Zhao et al., 2013). Cette technique est utilisée pour le dosage d'un métabolite triphosphorylé d'un analogue nucléotidique, avec séparation sur phase stationnaire C18 (tableau 4).

Nucléotides analysés	Colonne	Phase mobile	Temps d'analyse	Auteurs - Année Validation
Métabolite triphosphorylé d'un AN	Luna C18 (50 x 2 mm ; 5 µm)	A : bicarbonate d'ammonium 5 mM + dans eau B : ACN/isopropanol (90/10) Rq : DMHA dans solution de reprise des échantillons	5 min	(Zhao et al., 2013) Validation partielle

Tableau 4. Méthode utilisant un agent de paire d'ions uniquement dans la solution de reprise des extraits secs.

AN : analogue nucléos(t)idique, DMHA : dimethylhexylamine

La publication de Zhao et al. (Zhao et al., 2013) apparaît comme une évolution des méthodes précédemment décrites utilisant un agent de paire d'ions dans la phase mobile.

Les modes chromatographiques présentés dans la suite de la partie bibliographique n'utilisent pas d'agent de paire d'ions.

- **Chromatographie en phase inverse**

Plusieurs auteurs ont recours à la chromatographie en phase inverse sans agent de paire d'ions (tableau 5).

Nucléotides analysés	Colonne	Phase mobile	Temps d'analyse	Auteurs - Année
NMP, NDP, NTP,	Hypersil Gold AQ C18 (150 x 4,6 mm ; 3 µm)	Acétate d'ammonium 2 mM dans eau ; pH 10 Mode isocratique	10 min	(Wang et al., 2014a) Validation complète
NMP, dNMP	Comparaison de plusieurs colonnes : C18, NH ₂ , phényl, alkylamide	Selon colonne utilisée	> 25 min selon colonne utilisée	(Studzińska and Buszewski, 2013) Pas de validation
NMP	Gemini (250 x 4,6 mm ; 5 µm)	A : acétate d'ammonium 10 M + bicarbonate d'ammonium 5 mM ; pH 5,6 B : méthanol	35 min	(Gill et al., 2013) Validation partielle
NMP	Symmetry C18 (150 x 2,1 mm ; 3,5 µm)	A : acide formique 0,1% dans eau B : ACN	10 min	(Ren et al., 2011) Pas de validation
AMP, GMP, IMP	Kinetex PFP (100 x 2,1 mm ; 2,6 µm)	A : acide formique 0,1% dans eau B : acide formique 0,1% dans ACN	25 min	(Peifer et al., 2012) Validation complète

Tableau 5. Méthodes chromatographiques en phase inverse utilisées pour l'étude des nucléotides.

Ces méthodes présentent l'avantage de ne plus utiliser d'agent de paire d'ions. Néanmoins, les nucléosides triphosphate sont peu retenus sur les phases stationnaires C18 donc il est très difficile d'appliquer une méthode en phase inverse pour les nucléosides triphosphate. La littérature le confirme avec une majorité de méthodes en phase inverse dédiées uniquement aux nucléosides monophosphate (Tableau 5). Seuls Wang et al. séparent les nucléosides mono-, di- et triphosphate en phase inverse (Wang et al., 2014a). Pour cela, une colonne dont la phase stationnaire C18 possède un endcapping polaire est utilisée.

- **Chromatographie sur carbone graphite**

Une autre alternative au mode phase inverse, sans utilisation d'agent de paire d'ions, est la colonne avec phase stationnaire en carbone graphite (PGC = porous graphitic carbon). Les phases stationnaires PGC sont constituées de feuilles planes de carbone, agencées de manière hexagonale. Elles présentent également l'avantage de résister à des pH allant de 1 à 14. Seule la société Thermo® commercialise une phase stationnaire PGC, il s'agit de la colonne Hypercarb.

Les mécanismes d'interactions au niveau de la phase stationnaire PGC sont multiples (Jansen et al., 2009a) :

- interactions hydrophiles/hydrophobes : la surface de carbone graphite est apolaire, et la phase mobile polaire.
- interactions ioniques : les analytes polaires ou polarisables induisent un dipôle à la surface du carbone graphite permettant la rétention de composés chargés négativement.
- interactions stériques avec la surface plane des feuilles de carbone graphite : cela peut permettre la séparation de stéréoisomères.
- interactions redox : la phase stationnaire peut agir comme réducteur ou oxydant selon les analytes. L'état redox de la phase stationnaire peut donc influencer la rétention.

Ainsi, les colonnes PGC peuvent s'appliquer à des composés pour lesquels les colonnes « classiques » (par exemple colonne de phase inverse) ne conviennent pas. Depuis 2010, seuls quatre auteurs ont présenté une méthode chromatographique avec colonne PGC et sans agent de paire d'ions pour l'analyse des nucléotides ou d'analogues nucléos(t)idiques (tableau 6).

Nucléotides analysés	Colonne	Phase mobile	Temps d'analyse	Auteurs - Année
Métabolite triphosphorylé de la fludarabine	Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 3 µm)	A : acétate d'ammonium 100 mM dans eau ; pH 9,8 B : ACN	9,5 min	(Huang et al., 2013) Validation complète
AMP, ADP, ATP	Hypercarb (150 x 2,1 mm ; 5 µm)	A : acétate d'ammonium 2 mM dans eau ; pH 10 B : acétate d'ammonium 2 mM dans ACN ; pH 10	20 min	(Jiang et al., 2012) Validation partielle
Métabolites phosphorylés de la gemcitabine	Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 µm)	A : acétate d'ammonium 10 mM dans eau ; pH 10 B : ACN	15 min	(Bapiro et al., 2011) Validation complète
NMP, NDP, NTP, dNMP, dNTP	Hypercarb (100 x 0,32 mm)	A : acide formique + ammoniac dans eau ; pH 9 B : ACN	26 min sans ré-équilibrage	(Pabst et al., 2010) Pas de validation

Tableau 6. Méthodes chromatographiques utilisant une colonne PGC pour l'étude des nucléotides et/ou analogues nucléos(t)idiques.

Les méthodes présentées dans le tableau 6 n'utilisent pas d'agent de paire d'ions. L'acétate ou la formate d'ammonium sont présents dans la phase mobile pour permettre la rétention (Jansen et al., 2009a). Cependant, les auteurs rapportent un manque de robustesse de la méthode avec une mauvaise reproductibilité des chromatogrammes liée à une variation des temps de rétention des

nucléotides (Bapiro et al., 2011; Huang et al., 2013; Jansen et al., 2009a; Pabst et al., 2010). Ainsi, une augmentation des temps de rétention est observée au fur et à mesure des injections. Ce problème est rapporté comme la principale limite à l'utilisation des colonnes PGC par les auteurs. Pabst et al. rapportent également un élargissement des pics des nucléosides triphosphate au fur et à mesure des injections (Pabst et al., 2010).

Différentes solutions sont proposées pour pallier à ces problèmes, avec des mises en application plus ou moins aisées :

- Rinçage de la colonne toute une nuit avec ACN/eau (80/20) (Huang et al., 2013)
- Régénération de la colonne en « back flush » : 25 mL de THF/eau (50/50) contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique, puis 25 mL de THF/eau (50/50) contenant 0,1% d'hydroxyde de sodium, suivi de 25 mL de THF/eau (Bapiro et al., 2011).
- Traitement de la colonne avec du sulfite de sodium 100 mM pendant plusieurs heures (Pabst et al., 2010). Ce traitement joue sur les propriétés redox de la phase stationnaire PGC et est appliqué aux colonnes neuves, avant leur 1^{ère} utilisation, et aux anciennes colonnes après un lavage (avec acide trifluoroacétique, puis HCl).
- Pré-conditionnement de la colonne PGC avec H₂O₂ 0,05% + acétate d'ammonium 1 mM dans acétonitrile/eau (15/85, v/v) pH 4 pendant 30 min, puis régénération des capacités de séparation de la colonne PGC par injection de 100 µl d'acide formique 10% dans de l'eau (v/v; 2,65 M) après analyse de l'échantillon (Jansen et al., 2009a). Ces deux étapes sont réalisées systématiquement, à chaque analyse. Selon les auteurs, l'ajustement du pH à 4 lors du pré-conditionnement est indispensable pour permettre une stabilité des temps de rétention au fil des injections. Malgré tous ces traitements, les auteurs évoquent la nécessité d'attendre une dizaine d'analyses avant d'obtenir des temps de rétention stables.

Tous ces protocoles proposés pour améliorer la répétabilité de la méthode d'analyse sont consommateurs de temps, avec pour certains un allongement considérable du temps d'analyse.

- **Chromatographie par échange d'anions**

Dans les méthodes chromatographiques par échange d'anions, la séparation des nucléotides est réalisée en appliquant un gradient de pH ; diminuant ainsi les capacités d'échange d'anions de la phase stationnaire.

Nucléotides analysés	Colonne	Phase mobile	Temps d'analyse	Auteurs - Année
2'-méthylGTP	Luna NH ₂ (30 x 2,0 mm ; 5 µm)	A : acétate d'ammonium 1 mM dans eau / ACN (70/30) ; pH8 B : acétate d'ammonium 20 mM dans eau / ACN (70/30) ; pH 10	10 min	(Rashidzadeh et al., 2015) Validation partielle
NTP, dNTP	Biobasic AX (150 x 2,1 mm ; 5 µm)	A : acétate d'ammonium 10 mM dans eau / ACN (60/40) ; pH 5,6 B : formiate d'ammonium 1 mM dans eau / ACN (70/30) ; pH 10,6	15 min	(Thomas et al., 2015) Validation complète
Metabolites phosphorylés d'AN	Biobasic AX (50 x 2,1 mm ; 5 µm)	A : acétate d'ammonium 10 mM dans ACN/eau (30/70) ; pH6 B : acétate d'ammonium 1 mM dans ACN/eau (30/70) ; pH 10,5	10 min 10 min 7 min	(Jansen et al., 2010) Validation complète (Derissen et al., 2014) Pas de validation (Derissen et al., 2015) Validation complète

Tableau 7. Méthodes chromatographiques utilisant la chromatographie par échange d'anions pour l'étude des nucléotides et/ou analogues nucléos(t)idiques.

La phase stationnaire des colonnes Biobasic AX (ThermoScientific) est constituée de groupements polyéthylèneimine, correspondant à une colonne de type WAX (Weak Anion Exchange). Actuellement, aucune méthode basée sur l'échange d'anions et permettant l'analyse simultanée des nucléosides mono-, di- et triphosphate n'est publiée.

- **Chromatographie HILIC**

La chromatographie HILIC est un mode chromatographique se rapprochant de la chromatographie en phase normale. En mode HILIC, la rétention augmente avec la polarité de l'analyte et diminue avec la polarité de la phase mobile. Ainsi, l'eau possède le pouvoir le plus éluant en chromatographie en mode HILIC.

Ce mode chromatographique est actuellement peu utilisé pour l'analyse des nucléotides, alors qu'il permet l'analyse simultanée des nucléosides mono-, di- et triphosphate (tableau 8).

Nucléotides analysés	Colonne	Phase mobile	Temps d'analyse	Auteurs - Année
AMP, ADP, ATP, IMP, GMP, GDP, GTP	Acquity BEH Amide (100 x 2,1 mm ; 1,7 µm)	A : acétate d'ammonium dans eau/ACN (10/90) ; pH 9 B : acétate d'ammonium dans eau/ACN (90/10) ; pH 9	12 min sans ré-équilibration	(Zhao et al., 2015) Pas de validation
dAMP, dCMP, AMPc	Acquity UPLC BEH Amide (100 x 2,1 mm ; 1,7 µm)	A : acide acétique 1% + acétate d'ammonium 10 mM dans eau B : acide acétique 0,1% dans ACN	3,5 min sans ré-équilibration	(Zhou et al., 2015) Validation complète
dAMP, CMP, AMPc, GMPc	Acquity UPLC BEH Amide (100 x 2,1 mm ; 1,7 µm)	A : acide acétique 0,8% + acétate d'ammonium 10 mM dans eau B : acide acétique 0,1% dans ACN	18 min	(Guo et al., 2013) Validation partielle
AMP, ADP, ATP, CDP, CTP	Luna NH ₂ (150 x 2 mm ; 3 µm)	A : TEAAc 20 mM + NH ₄ OH 20 mM dans eau/ACN (95/5) B : ACN	31 min	(Vo Duy et al., 2012) Validation complète

Tableau 8. Méthodes chromatographiques utilisant le mode HILIC pour l'étude des nucléotides.
TEAAc : acétate de triéthylammonium

1.1.1.2. Méthodes électrophorétiques

L'électrophorèse capillaire est une méthode de séparation adaptée aux molécules chargées, ce qui en fait une méthode séparative applicable à l'analyse des nucléotides. Elle est couplée à une détection par spectrométrie de masse ou UV à l'aide de barrettes de diodes (DAD). Les principaux sels utilisés sont l'acétate d'ammonium (Bezy et al., 2006), l'acétate de sodium (Zinellu et al., 2008), le formate d'ammonium (Rodríguez-Gonzalo et al., 2014), le bicarbonate d'ammonium (Liu et al., 2014).

Nucléotides analysés	Capillaire	Tampon de séparation	Temps d'analyse	Auteurs - Année
AMP, CMP, GMP, UMP, IMP	silice (87,5 cm ; 50 µm i.d.) ou (20 cm ; 100 µm i.d.)	Formate d'ammonium 30 mM, pH 9,6	14 min	(Rodríguez-Gonzalo et al., 2014) Validation complète
NMP, NDP, NTP	silice (60 cm ; 40 µm i.d. ; 100 µm o.d.)	Bicarbonate d'ammonium 20 mM	40 min	(Liu et al., 2014) Validation partielle
NMP, NDP, NTP	silice (108 cm ; 75 µm i.d. ; 375 µm o.d.)	Acide citrique 40 mM + bromure d'hexadécyltriméthylammonium 0,3 mM ; pH 4,4	Non renseigné	(Allegrini et al., 2013) Pas de validation

Tableau 9. Méthodes utilisant l'électrophorèse capillaire pour l'étude des nucléotides.
i.d. : diamètre interne, o.d. : diamètre externe

L'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse apporte une bonne résolution et constitue une méthode alternative à la chromatographie liquide pour l'analyse des nucléotides. Cette technique reste néanmoins peu utilisée, vraisemblablement par manque d'appareils d'électrophorèse capillaire dans les laboratoires d'analyse.

Historiquement, les nucléotides étaient séparés chromatographiquement sur phase stationnaire C18 en utilisant un tampon phosphate dans la phase mobile. L'arrivée de la détection par spectrométrie de masse a entraîné le remplacement du tampon phosphate par des agents de paire d'ions. D'autres méthodes chromatographiques existent et permettent d'éviter l'utilisation d'agent de paire d'ions : PGC, HILIC, échange d'anions. Le mode en phase inverse avec agents de paire d'ions dans la phase mobile reste néanmoins le mode le plus publié actuellement.

Parmi les méthodes publiées, les temps d'analyse varient de 5 min à 90 min selon que les auteurs analysent un seul composé ou la plupart des nucléotides. Dans les méthodes présentant des temps d'analyse courts, tous les composés présents dans la matrice sont élués dans la source du spectromètre de masse quasiment en même temps. Une interrogation sur la qualité de l'ionisation peut donc être posée.

Parmi les méthodes publiées sur l'analyse de nucléotides et/ou analogues nucléos(t)idiques, seulement quelques-unes sont validées complètement : répétabilité, fidélité intermédiaire, contamination, effet matrice, stabilité, rendement d'extraction. La plupart des validations sont partielles et les paramètres les plus souvent absents sont l'effet matrice et la stabilité.

Actuellement, seuls Vo Duy et al. et Wang et al. ont présenté une méthode validée complètement permettant l'analyse simultanée des nucléosides mono-, di- et triphosphate, sans utilisation d'agent de paire d'ions (Vo Duy et al., 2012; Wang et al., 2014a).

1.1.2. Détection

Toutes les bases puriques et pyrimidiques absorbent dans l'ultraviolet (UV), avec une bande d'absorption proche de 260 nm. Pendant longtemps, les méthodes publiées avaient recours à une détection UV. Depuis une vingtaine d'années, les méthodes de détection utilisées ont évolué vers la spectrométrie de masse. L'analyse des nucléotides en spectrométrie de masse apporte de meilleures sensibilité et sélectivité, mais présente des difficultés au niveau des étapes d'ionisation et d'analyse par le spectromètre de masse.

1.1.2.1. Ionisation

Les sources d'ionisation utilisées sont des sources électrospray. L'ionisation est effectuée soit en mode négatif, soit en mode positif. Le nombre d'auteurs rapportant une ionisation en mode négatif (Derissen et al., 2015; Huang et al., 2013; Jiang et al., 2012; Pabst et al., 2010; Yamaoka et al., 2010; Zhang et al., 2014) est peu différent du nombre travaillant avec une ionisation en mode positif (Gill et al., 2013; Guo et al., 2013; Jansen et al., 2010; Peifer et al., 2012; Thomas et al., 2015; Yang et al., 2010; Zhao et al., 2015). La présence de groupements phosphates dans la structure des nucléotides favorise l'ionisation négative, notamment pour les formes triphosphates. La présence de

groupements amines substitués au niveau de la base favoriserait l'ionisation en mode positif par rapport aux nucléotides possédant uniquement des atomes d'azote (Pruvost et al., 2008). Pour les nucléotides de la famille de l'uridine et de la thymidine, la basicité de leur base apporte une meilleure ionisation en mode négatif (Fung et al., 2001; Quinn et al., 2013). La présence d'agent de paire d'ion dans la phase mobile peut favoriser l'ionisation en mode positif, avec la formation d'adduits [nucléotide-agent de paire d'ion] (Cohen et al., 2009). En revanche, un bruit de fond plus important est rapporté (Cordell et al., 2008).

Comme indiqué précédemment, la présence d'agent de paire d'ions non volatils dans la phase mobile perturbe l'ionisation au sein de la source. Les sels de type acétate d'ammonium ajouté à la phase mobile à la place des agents de paire d'ion peuvent également perturber l'ionisation. Jiang et al. rapportent une diminution du signal lors d'essais avec des phases mobiles contenant de 2,5 à 10 mmol/l d'acétate d'ammonium (Jiang et al., 2012). Une phase mobile contenant 2 mmol/l d'acétate d'ammonium a été retenue par les auteurs.

1.1.2.2. Spectromètre de masse

Parmi les publications récentes, seuls Yamaoka et al. utilisent un spectromètre de masse simple (Yamaoka et al., 2010, 2011). Les autres auteurs travaillent avec des spectromètres de masse en tandem en mode MRM, c'est à dire en fragmentant l'ion parent et en suivant des transitions. Encore peu de publications utilisent des spectromètres de masse haute résolution (également appelés masse exacte).

Le mode MRM est indispensable pour différencier les nucléotides ayant la même masse (ATP et dGTP, ADP et dGDP, AMP et dGMP). En effet, seule une fragmentation différente pour chaque nucléotide permet d'identifier sans équivoque, en spectrométrie de masse, deux nucléotides présentant la même masse.

- Triple quadripôles et trappes à ions

Avec ce type d'analyseurs, le mode MRM est utilisé. L'ion parent est ainsi fragmenté pour former un ou plusieurs ions fils. Le suivi de transitions apporte ainsi une plus grande sélectivité à l'analyse par rapport un simple quadripôle.

Après ionisation en mode négatif, les nucléosides triphosphate se fragmentent en donnant principalement l'ion pyrophosphate de m/z égal à 159, alors que pour les nucléosides monophosphate l'ion fils de m/z égal à 79 est prépondérant (Cohen et al., 2010; Cordell et al., 2008; Coulier et al., 2011; Tuytten et al., 2002). Seul le dAMP peut donner un fragment principal différent : le fragment correspondant à la base adénine avec un m/z égal à 144 (Petroselli et al., 2007).

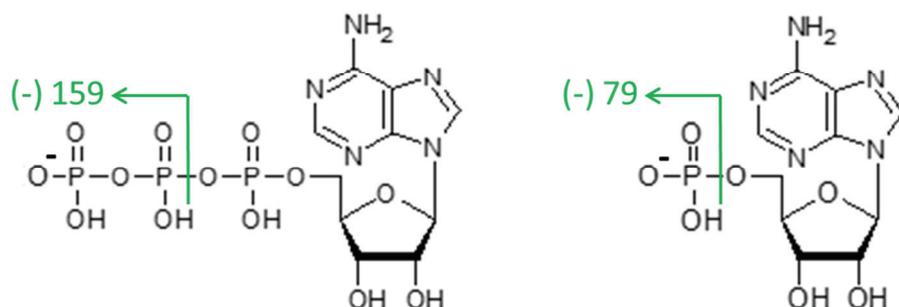


Figure 10. Fragmentation des nucléosides triphosphate (exemple de l'ATP) et des nucléosides monophosphate (exemple de l'AMP) après ionisation en mode négatif.

Dans ces conditions, la spectrométrie de masse ne permet pas de différencier l'ATP du dGTP, ou l'AMP du dGMP. Il a été rapporté un moyen pour différencier l'ATP du dGTP grâce à la présence d'un ion fils de m/z égal à 257 après fragmentation spécifique du dGTP (Wenkui Li et al.). Cependant, la sensibilité est faible car ce fragment est très minoritaire.

Après ionisation en mode positif, les principaux ions fils rapportés correspondent aux bases puriques ou pyrimidiques (Peifer et al., 2012; Yang et al., 2010). La coupure de la liaison entre la base et le sucre s'accompagne du transfert d'un H du sucre vers l'azote de la base. Les fragments formés présentent des m/z de 112, 136 et 152 pour respectivement [cytidine + H]⁺, [adénine + H]⁺ et [guanidine + H]⁺. L'ionisation en mode positif et l'utilisation du mode MRM permettent ainsi de différencier en spectrométrie de masse les nucléotides ayant la même masse molaire.

Par exemple, pour différencier l'ATP du dGTP (masse molaire de 507,18 g/mol pour les deux composés), Cohen et al. utilisent les fragmentations différentes des adduits [nucléotide – agent de paire d'ions] formés dans la phase mobile (Cohen et al., 2009). Le DEA forme un adduit avec les nucléotides et permet une fragmentation conduisant à un ion fils correspondant au [M+H] de la base. L'ATP et le dGTP présente ainsi des fragments différents.

	Masse molaire	Ionisation négative [nucléotide] ⁻	Ionisation positive [nucléotide – DEA] ⁺
ATP	507 g/mol	506 → 159	581 → 136,1
dGTP	507 g/mol	506 → 159	581 → 152,1

Tableau 10. Transitions d'ATP et dGTP rapportées par Cohen et al. après ionisation en mode négatif et en mode positif (Cohen et al. 2009).

Si la différenciation des nucléotides ayant la même masse molaire n'est pas possible en spectrométrie de masse, la séparation de ces composés par chromatographie est indispensable.

- Spectromètre de masse haute résolution

Les analyseurs haute résolution apporte une sélectivité plus grande que les analyseurs de type triples quadripôles et les trappes à ions. Avec ce type d'analyseurs (LTQ-Orbitrap, Thermo®), Derissen et al. ont rapporté la quantification du métabolite triphosphorylé de l'azacytidine (aza-CTP) dans des PBMC (Derissen et al., 2014). Les auteurs différencient l'aza-CTP, l'UTP et l'isotope [¹³C]-CTP. Pour cela, une sélection des ions parents de m/z égal à 485 est effectuée au niveau du quadripôle. Puis les

molécules sont fragmentées dans la cellule de collision et un scan des ions fils de m/z compris entre 105 et 114 est effectué au niveau de l'Orbitrap.

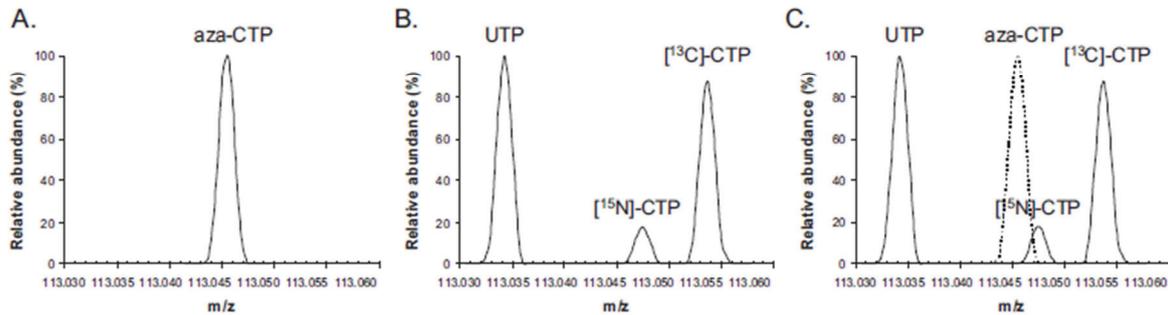


Figure 11. Différenciation de l'aza-CTP, de l'UTP et de l'isotope $[^{13}\text{C}]$ -CTP par LTQ-Orbitrap. Scan des ions fils (m/z de 105 à 114) après sélection des ions parents de m/z égal à 485 de 3,90 à 4,15 min. A) aza-CTP ; B) extraits de PBMC ; C) superposition de A et B.

La figure 11C montre que les fragments identifiés pour les 4 composés présentent des m/z très proche (de l'ordre de 113). Seule la spectrométrie de masse haute résolution permet de les différencier. Une superposition d'une partie des pics d'aza-CTP et $[^{15}\text{N}]$ -CTP est observée (figure 11C). L'isotope $[^{15}\text{N}]$ -CTP étant présent en très faible quantité, les auteurs considèrent l'erreur sur le résultat de l'aza-CTP négligeable.

Pour l'analyse des nucléotides en spectrométrie de masse, le choix du mode d'ionisation est important. L'ionisation en mode positif paraît être à privilégier afin de différencier les nucléotides de même masse ou de masses proches. La spectrométrie de masse en tandem ou la spectrométrie de masse haute résolution sont indispensables pour apporter la sélectivité nécessaire. Actuellement, peu de publications rapportent l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse des nucléotides.

1.2. Préparation des échantillons en vue du dosage de nucléotides

1.2.1. Matrices étudiées

L'ubiquité des nucléotides dans l'organisme entraîne une hétérogénéité des matrices étudiées lors des dosages (Tableau 11).

- **Milieu intracellulaire**

Les nucléotides sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires. L'exploration des pools nucléotidiques dans le milieu intracellulaire apparaît alors indispensable pour la compréhension de l'implication des nucléotides en physiologie et dans des processus pathologiques.

Le milieu intracellulaire est également le lieu d'action des formes phosphorylées des analogues nucléos(t)idiques. La pharmacocinétique intracellulaire des analogues nucléos(t)idiques phosphorylés étant différente de celle de la molécule mère dans le sang, il est préférable de doser les formes phosphorylées dans le milieu intracellulaire. De plus, les dérivés phosphorylés des analogues nucléos(t)idiques entrent en compétition avec les nucléotides endogènes pour exercer leur activité. Ainsi, l'influence des analogues nucléos(t)idiques sur le pool nucléotidique intracellulaire a été étudiée par différents auteurs (Chen et al., 2011; Grem and Allegra, 1990; Yoshio et al., 2005).

Parmi les prélèvements biologiques humains, les principales cellules étudiées sont les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) et, dans une moindre mesure, les érythrocytes. De nombreuses activités de recherche étant réalisées sur des cellules en culture, les dosages dans cette matrice sont fréquents.

PBMC

Les PBMC regroupent les lymphocytes, cellules impliquées dans les défenses immunitaires, et les monocytes, cellules impliquées dans le processus de phagocytose. Un déséquilibre du pool nucléotidique a été rapporté dans des lignées cellulaires leucémiques et dans les PBMC de patients atteints de leucémie aiguë lymphoïde (LAL) ou de leucémie myéloïde chronique (LMC) avant traitement (De Korte et al., 1986, 1987).

Les PBMC constituent également les cellules cibles de certains traitements par analogues nucléos(t)idiques. Ils représentent donc une matrice intéressante pour l'étude de l'effet des analogues nucléos(t)idiques sur le pool nucléotidique intracellulaire.

Erythrocytes

La connaissance des quantités de nucléotides présents dans les érythrocytes a permis d'évaluer l'influence de la contamination par des érythrocytes lors des dosages de nucléotides dans des PBMC (Durand-Gasselin et al., 2007). Lors de dosages de dNTP et d'analogues nucléos(t)idiques dans des PBMC, Durand *et al.* ont montré une surestimation des résultats en cas de contamination des prélèvements par des érythrocytes. Les auteurs conseillent donc d'ajouter une étape de lyse des érythrocytes lors de la préparation de PBMC.

Les érythrocytes représentent également une matrice d'intérêt pour connaître le métabolisme intra-érythrocytaire d'analogues nucléos(t)idiques, avec recherche des formes mono-, di-, et triphosphates, car une toxicité érythrocytaire (de type anémie hémolytique) de certains analogues nucléos(t)idiques a été rapportée (Homma et al., 2004; Saito et al., 2006). Par exemple, l'accumulation intra-érythrocytaire des formes phosphorylées de la ribavirine entraîne une

diminution de l'ATP, induisant un stress oxydant et provoquant ainsi des dommages à la membrane érythrocytaire (De Franceschi et al., 2000).

Cellules en culture

Afin d'étudier les mécanismes biochimiques de régulation des nucléotides et l'implication des pools nucléotidiques dans diverses situations physiologiques et pathologiques, de nombreuses expérimentations sont effectuées sur des cellules en culture. Au sein de cette matrice, les nucléosides ainsi que les formes mono-, di-, et triphosphates des nucléotides sont retrouvés. Les cellules en culture représentent donc une matrice fréquente pour le dosage des nucléotides.

- **Autres matrices**

Milieux de culture

Les nucléotides présents dans le milieu extracellulaire exercent un rôle de médiateurs inter-cellulaires locaux telles les molécules de signalisation que sont les neurotransmetteurs et les hormones. Pour cela, ils sont libérés dans le milieu extracellulaire par lyse cellulaire, exocytose ou efflux. Ensuite, ils sont dégradés par des ectonucléotidases, puis agissent via des récepteurs membranaires (récepteurs P2X et P2Y) (Stagg and Smyth, 2010). Par ce mécanisme, les nucléotides jouent un rôle dans l'hémostase et la thrombose et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire hépatique (Fausther and Sévigny, 2011).

Pour exercer leur activité cytotoxique, les analogues nucléos(t)idiques sont phosphorylés dans le milieu intracellulaire. Il a été mis en évidence un système d'efflux des formes phosphorylées qui serait un des mécanismes de résistance aux analogues nucléos(t)idiques (Jordheim et al., 2003). Afin de l'étudier, le dosage d'analogues nucléos(t)idiques dans des milieux de culture est intéressant.

Les milieux de culture présentent la particularité d'être riche en glucose (concentration de l'ordre du g/l) et en sels non volatils (chlorure de calcium, sulfate de magnésium, phosphate de sodium...); ce qui en fait une matrice particulière nécessitant une phase pré-analytique différente des autres matrices.

Tissus - Tumeurs

La quantification de nucléotides et analogues nucléos(t)idiques dans des tissus ou tumeurs peut être utile pour l'étude du métabolisme intracellulaire de cellules tumorales ou pour des études pharmacocinétiques d'analogues nucléos(t)idiques.

Fluides biologiques

Les principaux fluides biologiques dans lesquels sont quantifiés les nucléotides et les analogues nucléos(t)idiques et leurs métabolites sont le sang total, le plasma et l'urine.

Cellules en culture			PBMC			Sang total			Plasma			Erythrocytes			Moëlle osseuse		
Auteurs	N	AN	Auteurs	N	AN	Auteurs	N	AN	Auteurs	N	AN	Auteurs	N	AN	Auteurs	N	AN
(Vela et al., 2007)	✓	✓	(Pruvost et al., 2008)	✓	✓	(Kirchherr et al., 2013)	✓	✓	(Vainchtein et al., 2010)	✓	✓	(Durand-Gasselín et al., 2007)	✓	✓	(Chen et al., 2009)	✓	✓
(Carli et al., 2009)	✓	✓	(Kuklenyik et al., 2009)	✓	✓	(Zhang et al., 2014)	✓	✓	(Zhang et al., 2014)	✓	✓	(Laourdakís et al., 2014)	✓	✓			
(Chen et al., 2009)	✓	✓	(Jansen et al., 2009b)	✓	✓												
(Crauste et al., 2009)	✓	✓	(Jansen et al., 2010)	✓	✓												
(Cohen et al., 2009)	✓	✓	(Fromentin et al., 2010)	✓	✓												
(Wang et al., 2009)	✓	✓	(Hawkins et al., 2011)	✓	✓												
(Cordell et al., 2008)	✓	✓	(Coulíer et al., 2011)	✓	✓												
(Zhang et al., 2011)	✓	✓	(Zhao et al., 2013)	✓	✓												
(Pabst et al., 2010)	✓	✓	(Huang et al., 2013)	✓	✓												
(Yamaoka et al., 2011)	✓	✓	(Derissen et al., 2014)	✓	✓												
(Rehberg et al., 2014)	✓	✓	(Derissen et al., 2015)	✓	✓												
(Graven et al., 2014)	✓	✓															

Urine			Salive			Tissus - tumeurs		
Auteurs	N	AN	Auteurs	N	AN	Auteurs	N	AN
(Hartmann et al., 2006)	✓	✓	(Al-Shehri et al., 2013)	✓	✓	(Bapiro et al., 2011)	✓	✓
						(Jiang et al., 2012)	✓	✓
						(Rashidzadeh et al., 2015)	✓	✓

Tableau 11. Travaux (publiés depuis 2005) relatifs aux nucléotides (N) et/ou analogues nucléot(s)idiques (AN) dans des matrices biologiques.

La diversité des matrices biologiques étudiées pour le dosage des nucléotides et/ou analogues nucléos(t)idiques est donc importante : cellules en culture, PBMC, érythrocytes, plasma, tissus... Les cellules en culture et les PBMC sont les matrices les plus présentes dans la littérature. La matrice PBMC apparaît surtout pour l'étude d'analogues nucléot(s)idiques.

1.2.2. Etapes pré-analytiques

La préparation de l'échantillon constitue une étape critique dans le processus analytique des nucléotides. Afin d'éviter toute dégradation ou modification des nucléotides (déphosphorylation, métabolisme) et de rendre un résultat le plus proche possible de la réalité, il est primordial de travailler sur glace afin de limiter les activités métaboliques présentes dans le milieu de travail tant que le métabolisme n'a pas été bloqué chimiquement.

La complexité des matrices biologiques (milieu intracellulaire, présence de nombreux autres composés endogènes) impliquent de suivre une préparation d'échantillons comprenant plusieurs étapes :

- Isolement des cellules si dosage intracellulaire
- Lyse cellulaire si dosage intracellulaire
- Blocage du métabolisme par le froid, puis par des solvants
- Extraction des nucléotides

Une étape de purification peut ensuite être ajoutée.

Ces étapes ne sont pas toujours réalisées dans le même ordre et certaines sont groupées.

La nature des étapes pré-analytiques effectuées est adaptée à la matrice étudiée (Figure 12). Les étapes de blocage du métabolisme et d'extraction des nucléotides sont communes à toutes les matrices.

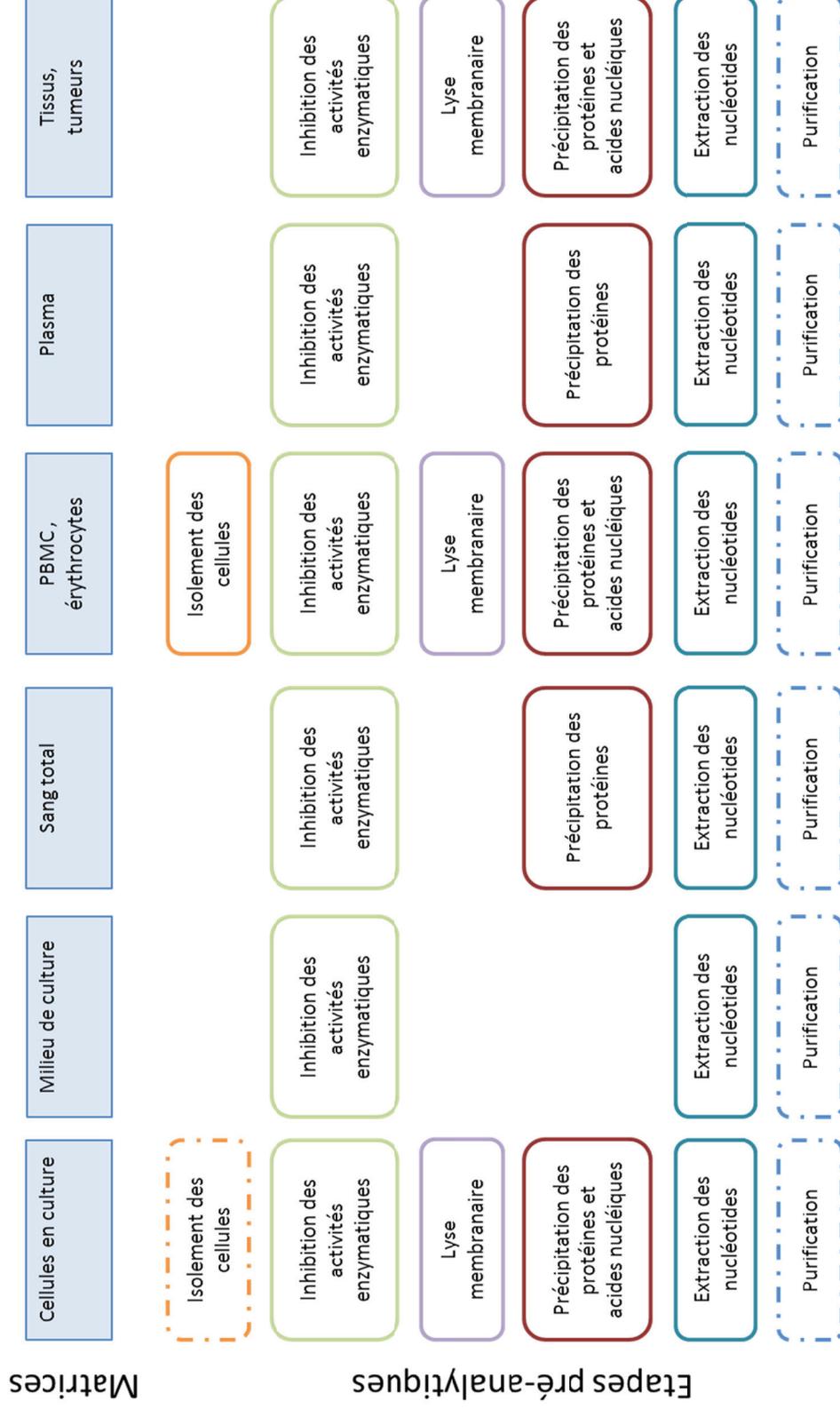


Figure 12. Etapes pré-analytiques réalisées en vue du dosage des nucléotides dans des matrices biologiques. Les étapes encadrées par des pointillés ne sont pas effectuées systématiquement.

Les protocoles existant pour chaque étape diffèrent selon les nucléotides étudiés, la matrice et les équipes. Ainsi, la littérature révèle une grande diversité de protocoles pré-analytiques pour une même matrice.

ISOLEMENT DES CELLULES

Cellules en culture

✓ Cellules en suspension :

- soit par **centrifugation** des cellules dans leur milieu de culture, puis élimination du surnageant

- soit par **filtration sur membrane** : Dietmair et al. ont déposé l'échantillon sur une membrane PTFE (Omnipore) ayant des pores de 5 µm de diamètre, puis ont lavé la membrane 2 fois avec du NaCl. Enfin, le contenu de la membrane a été transféré dans le solvant d'extraction (Dietmair et al., 2010). Wittmann et al. ont utilisé des membranes en nitrate de cellulose ayant des pores de 0,45 µm de diamètre. Quatre lavages avec du NaCl froid ont été effectués après dépôt (Wittmann et al., 2004).

La technique utilisant la filtration est plus rapide (estimé à 30-45 secondes pour filtration + lavage + transfert des cellules) que la centrifugation (Dietmair et al., 2010; Wittmann et al., 2004). Pour une membrane de 47 mm de diamètre, la quantité de cellules pouvant être filtrées sans colmater les pores de la membrane a été estimée à 15 millions (Dietmair et al., 2010). Cependant, la comparaison des quantités de nucléotides extraites de cellules centrifugées ou filtrées a montré des quantités de nucléotides beaucoup plus faibles (seulement 9%) dans les cellules filtrées par rapport aux cellules centrifugées (Dietmair et al., 2010).

L'isolement des cellules en suspension par centrifugation est la technique la plus répandue.

✓ Cellules adhérentes

Les cellules adhérentes peuvent être isolées soit par **grattage** (Wang et al., 2009), soit par **trypsination** (van Moorsel et al., 2000; Rehberg et al., 2014; Zhang et al., 2011). De nombreux auteurs n'effectuent pas cette étape et réalisent l'extraction des nucléotides directement dans la boîte de culture (Cordell et al., 2008; Vela et al., 2007).

Aucune étude comparant grattage et trypsination n'a été publiée. Le grattage paraît plus agressif et pourrait peut-être abîmer les cellules par son effet mécanique. Lors de la trypsination, les cellules sont incubées 5 min à 37°C pour permettre l'action de la trypsinase. Ceci fait craindre une modification du métabolisme intracellulaire au cours de cette phase par rapport au métabolisme de la cellule en culture.

PBMC

Les PBMC sont séparées des autres cellules sanguines et du plasma par **gradient de densité**. Cette étape est réalisée soit à l'aide d'un Ficoll (Derissen et al., 2015), soit à l'aide de tubes spéciaux type CPT (van Kampen et al.,

2010), Percoll (De Korte et al., 1986) ou Histopaque 1077 (Fromentin et al., 2010). L'utilisation des tubes prêts à l'emploi permet de gagner du temps et offre une meilleure reproductibilité que la technique Ficoll qui est entièrement manuelle.

BLOPAGE DU METABOLISME – INHIBITION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

L'étape de blocage du métabolisme peut être couplée avec les étapes de lyse cellulaire, précipitation des protéines et extraction des nucléotides.

Cellules, sang, plasma - à l'aide d'**acides** : acide perchlorique (Kirchherr et al., 2013), acide trichloroacétique (Graven et al., 2014).

L'utilisation d'acide impose ultérieurement une étape de neutralisation à l'aide d'une base.

- à l'aide de **solvants organiques** :

Le **méthanol** est le solvant organique le plus utilisé dans la littérature, soit pur, soit mélangé avec de l'eau (Canelas et al., 2009; Cohen et al., 2009; Derissen et al., 2015; Dietmair et al., 2010; Kuklennyik et al., 2009; Zhang et al., 2014). En cas de mélange méthanol/eau, le pourcentage de méthanol varie de 50% à 80% selon les auteurs.

Le blocage du métabolisme à l'aide du méthanol est la technique la plus utilisée. Cependant, il a été montré que le contact des cellules avec le méthanol endommage les membranes cellulaires. Lors d'une étude sur la préparation de bactéries (*Corynebacterium glutamicum*) en vue du dosage d'acides aminés intracellulaires, Wittmann et al. ont rapporté une fuite des acides aminés dans le milieu extracellulaire lors du contact des bactéries avec du méthanol froid (Wittmann et al., 2004). Par exemple, les dosages de glutamate intra- et extracellulaire après blocage du métabolisme par du méthanol froid ont montré une répartition du glutamate de 15% dans le milieu intracellulaire et de 85% dans le milieu extracellulaire. Cette fuite de métabolites intracellulaires lors du blocage avec du méthanol a été confirmée par Dietmair et al. (Dietmair et al., 2010). Lors du contact de cellules CHO avec du méthanol/eau froid (60/40, v/v), une fuite des nucléotides dans le milieu extracellulaire a été démontrée. La proportion de métabolites intracellulaires relâchés dans le milieu extracellulaire est dépendante du temps de contact, mais intervient dès un contact bref (Dietmair et al., 2010; Wittmann et al., 2004). La perte de contenu intracellulaire peut être évitée en couplant l'étape de blocage du métabolisme avec les étapes de lyse cellulaire et extraction des nucléotides.

Milieux de culture - par chauffage : ébullition pendant 2 min (Schuler et al., 2014) ou 5 min à 60°C (Helenius et al., 2012).

Le passage des extraits contenant les nucléotides dans l'azote liquide et leur congélation à -80 °C entre la fin de la préparation d'échantillons et l'analyse renforce l'inhibition des activités enzymatiques (Cohen et al., 2009).

LYSE MEMBRANAIRE

L'étape, à effectuer si le dosage des nucléotides ou analogues nucléos(t)idiques est intracellulaire, est commune aux étapes de précipitation des protéines et d'extraction des nucléotides.

- Cellules, PBMC
- à l'aide d'**acides** : acide perchlorique 60% (Kirchherr et al., 2013), acide trichloroacétique 5% ou 10% (Graven et al., 2014; van Moorsel et al., 2000).
 - à l'aide de **solvants organiques** : méthanol, éthanol, acétonitrile. Les solvants sont utilisés purs ou dans un mélange avec de l'eau.
 - à l'aide d'**eau bouillante** (Bolten et al., 2007)
- Erythrocytes
- ajout de Tris-HCl 0,05 M (pH 7,4) / méthanol (30/70, v/v) sur le culot globulaire froid (Durand-Gasselin et al., 2007).
 - ajout d'acide perchlorique 0,5 M sur le culot globulaire dans une proportion 1/7 (v/v, culot globulaire/acide perchlorique) (Laourdakos et al., 2014).

PRECIPITATION DES PROTEINES ET DES ACIDES NUCLEIQUES

La précipitation des protéines et des acides nucléiques est réalisée à l'aide de solvants organiques (méthanol, acétonitrile) ou d'acides. Cette étape est couplée avec l'étape d'extraction des nucléotides puisque les solvants utilisés sont communs.

Une étape de sonication (15 min à froid) est ajoutée après la lyse cellulaire avec méthanol/eau (60/40, v/v) par Chen et al. pour améliorer la précipitation des protéines (Chen et al., 2009).

EXTRACTION DES NUCLEOTIDES

Cette étape est couplée avec la lyse cellulaire, la précipitation des protéines et éventuellement avec le blocage du métabolisme

- Cellules, sang, PBMC
- à l'aide d'**acides** : acide perchlorique 60% (Kirchherr et al., 2013), acide trichloroacétique 10% (van Moorsel et al., 2000).
L'utilisation d'un acide présente l'inconvénient d'ajouter une étape de neutralisation de l'acidité à l'aide d'une base forte avant analyse.
 - à l'aide de **solvants organiques** : méthanol ou acétonitrile pur (van Kampen et al., 2010; Zhang et al., 2014), mais un problème de solubilité des formes triphosphates a été évoquée (Dietmair et al., 2010). Sous forme d'un

mélange méthanol/eau ou acétonitrile/eau, différentes proportions sont retrouvées dans la littérature : 50/50, 60/40, 70/30, 80/20 (v/v) (Chen et al., 2009; Cohen et al., 2009; Crauste et al., 2009; Kuklenyik et al., 2009).

- à l'aide d'**éthanol bouillant** (Gonzalez et al., 1997)

- à l'aide d'**eau bouillante** (Bolten et al., 2007)

Erythrocytes

- extraction couplée avec la lyse cellulaire pour Durand et al. : Tris-HCl 0,05 M (pH 7,4) / méthanol (30/70, v/v) (Durand-Gasselien et al., 2007).

- extraction couplée avec la lyse cellulaire pour Laourdakis et al. : acide perchlorique 0,5 M dans une proportion 1/7 (v/v, culot globulaire/acide perchlorique), puis neutralisation de l'acidité par hydroxyde de potassium 5 M (proportion 10/1, v/v, acide perchlorique/KOH) (Laourdakis et al., 2014).

Lors du choix de la technique d'extraction des nucléotides, il est indispensable de se poser la question de la stabilité des nucléotides dans les conditions de travail choisies. Par exemple, est-ce que les conditions acides de l'extraction par acide perchlorique ou acide trichloroacétique entraînent une dégradation des nucléotides ?

PURIFICATION

Cette étape n'est pas effectuée par tous les auteurs, elle est même majoritairement absente. Plusieurs techniques sont possibles :

Extraction liquide/liquide

- A l'aide de **chloroforme** : Parmi 5 techniques pré-analytiques testées, Canelas et al. retiennent l'extraction par méthanol/eau (50/50, v/v) suivie d'une purification par le chloroforme (volume équivalent à l'extrait) comme une technique de préparation adaptée pour le dosage de nucléotides dans des cellules de *Saccharomyces cerevisiae*. (Canelas et al., 2009) Lors de l'étape de purification, le temps d'agitation est relativement long : 45 min à -40 °C. Le chloroforme est utilisé pour extraire des interférents. Les nucléotides restent dans la phase aqueuse.

- A l'aide de tri-n-octylamine 20% dans du pentane (Graven et al., 2014)

- A l'aide du mélange octylamine + 1,1,2-trichlorofluoroéthane (1/4) (van Moorsel et al., 2000)

Dans les protocoles d'extraction liquide/liquide présentés ci-dessus, les nucléotides ne sont pas extraits et restent dans la phase aqueuse, qui sera ensuite analysée.

Extraction liquide/solide

- par interactions ioniques sur support Oasis **WAX** : SPE hors ligne pour l'extraction des nucléosides triphosphate (Cohen et al., 2009), SPE on-line pour l'extraction de métabolites triphosphorylés d'inhibiteurs de la transcriptase inverse (Kuklenyik et al., 2009).

- sur support de type **Hypercarb** (Pabst et al., 2010)

- sur support de type **MIP** (Molecularly Imprinted Polymer) : les MIP sont des supports solides combinant interactions stériques et interactions chimiques ; ce qui les rend plus sélectifs que les supports conventionnels. La sélectivité est apportée lors de la préparation du MIP par mise en contact du polymère avec un modèle (molécule d'intérêt ou molécule de structure proche de la molécule d'intérêt). Le complexe ainsi formé va créer une empreinte moléculaire caractérisée par la forme et les fonctions chimiques du composé d'intérêt ou d'une famille de composés d'intérêt (Annexe 2). Breton et al. ont développé des MIPs spécifiques de l'AMP (Breton et al., 2008, 2009). Plusieurs MIPs ont été développés pour l'extraction de nucléosides ou analogues nucléosidiques (Jégourel et al., 2008; Krstulja et al., 2014; Scorrano et al., 2010; Wu et al., 2013).
- par charbon activé : Magdenoska et al. rapportent une préparation d'échantillon à l'aide du charbon activé pour l'extraction de 28 nucléotides présents dans des échantillons bactériens (Magdenoska et al., 2013).

Elimination des érythrocytes - les érythrocytes contaminant les échantillons de PBMC sont lysés par une solution hypotonique (ex : NH_4Cl 3,5 g + NaHCO_3 0,036 g dans 500 ml d'eau). Le lysat est ensuite éliminé après centrifugation (Durand-Gasselien et al., 2007).

La préparation des échantillons en vue du dosage des nucléotides comprend une succession d'étapes, dont certaines sont communes à toutes les matrices (blocage du métabolisme, extraction des nucléotides). Pour chaque étape, de nombreux protocoles sont décrits dans la littérature. Face à cette grande variabilité de processus pré-analytique, le choix d'un protocole plutôt qu'un autre paraît difficile.

1.2.3. Etudes comparatives des protocoles pré-analytiques

Devant la diversité des protocoles pré-analytiques rapportés dans la littérature pour l'étude de nucléotides, certains auteurs ont réalisé des études comparatives (Cordell et al., 2008; Derissen et al., 2015). Des études de métabolomique incluant les nucléotides parmi les métabolites étudiés apportent également des éléments de comparaison pour la préparation d'échantillons en vue du dosage de nucléotides intracellulaires (Canelas et al., 2009; Dietmair et al., 2010).

Des protocoles utilisés dans les études comparatives et leurs conclusions sont présentés ci-dessous.

Derissen et al. ont comparé 3 solvants (méthanol, éthanol, acétonitrile) et l'acide perchlorique 1,35 M pour la lyse cellulaire et l'extraction de l'UTP dans des PBMC (Derissen et al., 2015). Les auteurs ont choisi l'UTP comme élément de comparaison car il est de structure proche de leurs molécules

d'intérêt (métabolites phosphorylés du 5-Fluorouracil). En plus de la nature et du volume du solvant servant à la lyse et l'extraction, les auteurs ont comparé 3 procédures différentes (Tableau 12).

Procédure n°1	Procédure n°2	Procédure n°3
Ajout solvant de lyse + extraction sur la suspension de PBMC	Ajout solvant de lyse + extraction sur la suspension de PBMC	Congélation de la suspension de PBMC à -70°C
Vortex	Vortex	Avant analyse, ajout solvant de lyse + extraction.
Centrifugation	Centrifugation	Vortex
Congélation du surnageant à -70°C jusqu'à analyse	Congélation de l'ensemble de l'échantillon (extrait + débris cellulaires) à -70°C jusqu'à analyse	Centrifugation
		Récupération du surnageant

Analyse par LC-MS/MS

Tableau 12. Procédures de préparation des PBMC comparées par Derissen et al. en vue du dosage d'UTP intracellulaire.

Les résultats montrent que les surfaces d'UTP les plus importantes ont été obtenues avec le méthanol, quels que soient le volume et la procédure testés (Figure 13). Les auteurs retiennent donc le méthanol et la procédure 1 pour la préparation des PBMC en vue du dosage de métabolites intracellulaires du 5Fu.

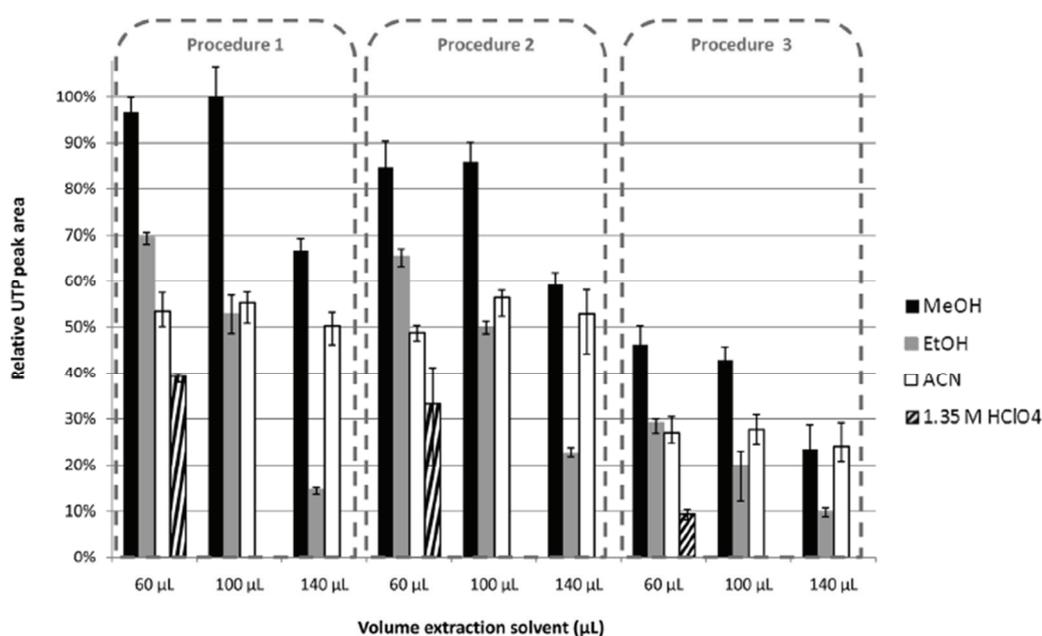


Figure 13. Surfaces relatives de l'UTP (la surface la plus grande observée correspond au 100%) avec les différents protocoles d'extraction sur des PBMC. Un seul volume d'acide perchlorique a été testé. Chaque protocole a été effectué 5 fois (Derissen et al., 2015).

Cordell et al. ont comparé 7 solvants et 2 acides pour la lyse cellulaire et l'extraction de nucléosides mono-, di- et triphosphate dans des cellules CHO en culture (Cordell et al., 2008). Les produits testés sont : acétonitrile, éthanol, méthanol, acétonitrile/eau (80/20, v/v), éthanol/eau (80/20, v/v),

méthanol/eau (80/20, v/v), acide formique 0,1 M dans de l'eau, acide perchlorique 0,5 M dans de l'eau et acide formique 0,1 M dans du méthanol. Les auteurs montrent que le méthanol apporte des quantités de nucléotides extraites supérieures à l'éthanol et à l'acétonitrile. L'acétonitrile apparaît comme le solvant organique présentant le plus faible rendement d'extraction. Il est important de noter que i) aucun résultat n'est donné pour les mélanges solvant organique/eau à cause de la présence de pics interférents sur le chromatogramme dans ces conditions, ii) l'acide perchlorique n'était pas compatible avec la LC/MS à cause de la formation d'un précipité lors de l'évaporation de l'extrait neutralisé par une base, iii) les résultats obtenus avec l'acide formique présentent une grande variabilité suggérant aux auteurs une mauvaise inhibition du métabolisme cellulaire par l'acide formique. Dans cette étude, le méthanol apparaît être le solvant le plus adapté pour le dosage intracellulaire des nucléotides. Néanmoins, des difficultés lors de l'analyse par LC-MS ont été rencontrées par les auteurs. Cela rend l'interprétation de certaines conditions de préparation impossible.

Dietmair et al. ont étudié l'ensemble du processus de préparation d'échantillons en comparant différentes techniques pour isoler des cellules en suspension, extraire les analytes intracellulaires et arrêter le métabolisme (Dietmair et al., 2010). Comme nucléotides, CMP, UMP, GMP, AMP, GDP, ADP, CTP, ATP, ainsi que NAD, NADP, UDP-glucose, acide UDP-glucuronique ont été dosés. Pour l'étape d'extraction des analytes intracellulaires, douze protocoles sélectionnés dans la littérature ont été comparés (Tableau 13).

Méthode d'extraction	Protocole
Acétonitrile (ACN)	Re-suspension du culot cellulaire dans ACN/eau 50/50, vortex, incubation dans la glace pendant 10 min
Méthanol congelé	Re-suspension du culot cellulaire dans 1 ml de méthanol/eau 50/50 (-40 °C), congélation dans l'azote liquide, remise en température dans la glace. Ce protocole a été répété 2 fois.
Méthanol froid	Re-suspension du culot cellulaire dans 1 ml de méthanol/eau 50/50 (-40 °C), vortex, incubation dans la glace pendant 10 min.
Méthanol/chloroforme	Re-suspension du culot cellulaire dans 1 ml de méthanol/eau 50/50 (-40 °C), puis ajout de 0,5 ml de chloroforme (-40 °C), vortex, incubation pendant 10 min dans la glace en agitant lentement. Les 2 phases ont été analysées.
Méthanol chaud	Re-suspension du culot cellulaire dans 1 ml de méthanol/eau 80/20 (70 °C), vortex, incubation à 70 °C pendant 10 min, puis refroidissement dans la glace pendant 5 min.
Méthanol pur froid	Re-suspension du culot cellulaire dans 1 ml de méthanol (-40 °C), vortex, incubation dans la glace pendant 10 min.
Ethanol chaud	Re-suspension du culot cellulaire dans 1 ml d'éthanol/eau 75/25 (80 °C), vortex, incubation à 80 °C pendant 5 min, puis refroidissement dans la glace pendant 5 min.
Ethanol HEPES chaud	Re-suspension du culot cellulaire dans 1 ml d'éthanol/eau 75/25 (80 °C) contenant 0,25 M d'HEPES, vortex, incubation à 80 °C pendant 5 min, puis refroidissement dans la glace pendant 5 min.
Ethanol froid	Re-suspension du culot cellulaire dans 1 ml d'éthanol/eau 75/25, vortex, incubation dans la glace pendant 10 min.
Eau chaude	Re-suspension du culot cellulaire dans 1 ml d'eau (95 °C), vortex, incubation à 95 °C pendant 5 min, puis refroidissement dans la glace pendant 5 min.

KOH	Re-suspension du culot cellulaire dans 1 ml de KOH 0,05 M, vortex, incubation dans la glace pendant 10 min. Neutralisation des extraits avec 150 µl de K ₂ HPO ₄ 1 M + 70 µl d'acide perchlorique 0,5 M.
Acide perchlorique	Re-suspension du culot cellulaire dans 1 ml d'acide perchlorique 0,5 M, vortex, incubation dans la glace pendant 10 min. Neutralisation des extraits avec 200 µl de K ₂ HPO ₄ 1,1 M dans KOH 2,5 M.

Tableau 13. Protocoles d'extraction de métabolites intracellulaires comparés par Dietmair et al (Dietmair et al., 2010).

Si l'on se réfère uniquement aux résultats des dosages de nucléotides, cinq protocoles ont montré des résultats probants et similaires : ACN, méthanol congelé, méthanol froid, méthanol/chloroforme, acide perchlorique. Les auteurs ont éliminé le protocole avec l'acide perchlorique car une forte variabilité inter-tube a été observée. Cette variabilité a également été rapportée par d'autres auteurs (Ritter et al., 2008). Parmi les quatre protocoles d'extraction restants, les auteurs ont sélectionné celui avec ACN 50% froid car celui-ci apportait les concentrations de nucléotides les plus élevées. Ensuite, Dietmair et al. ont comparé 3 techniques pour arrêter le métabolisme : MeOH 60% (-40 °C), MeOH 60% (-40 °C) + bicarbonate d'ammonium 0,9% (m/v) pH 7,4 et NaCl 0,9% (m/v) (0,5 °C). L'étude de la perméabilité de la membrane cellulaire a montré que les deux protocoles utilisant le méthanol 60% endommageaient la membrane, libérant ainsi des nucléotides intracellulaires dans le milieu extracellulaire. Le protocole NaCl 0,9% (m/v) (0,5 °C) n'a pas augmenté pas la perméabilité membranaire. Ce protocole a donc été retenu par les auteurs (Dietmair et al., 2010).

Canelas et al. ont comparé 5 techniques d'extraction d'analytes intracellulaires de *Saccharomyces cerevisiae* (Tableau 14) (Canelas et al., 2009). Les nucléotides étudiés étaient AMP, ADP, ATP, UMP, UDP, UTP, GDP et CDP. Les protocoles réalisés par Canelas et al. ont été adaptés de la littérature.

Méthode d'extraction	Protocole
Eau chaude	Ajout de 2 ml d'eau chaude à 95-100 °C sur le culot cellulaire. Agitation, puis dépôt des tubes dans de l'eau pendant 15 min. Ensuite, refroidissement dans de la glace. Enfin, congélation de l'extrait à -80 °C
Ethanol bouillant	Ajout de 5 ml d'éthanol 75% à 95-100 °C sur le culot cellulaire. Agitation, puis dépôt des tubes dans de l'eau pendant 3 min. Ensuite, transfert des tubes à -40°C. Enfin, congélation de l'extrait à -80 °C
Méthanol/chloroforme	Mise en suspension du culot cellulaire dans 2,5 ml de méthanol/eau (50/50, v/v) froid. Puis ajout de 2,5 ml de chloroforme froid. Agitation pendant 45 min. Récupération de la phase aqueuse. Ré-extraction de la phase chloroformique par 2,5 ml de méthanol/eau (50/50, v/v), avec 30 s d'agitation. Mélange des 2 extraits aqueux. Congélation à -80 °C. Toutes les étapes sont réalisées à -40 °C.
Méthanol congelé/décongelé	Mise en suspension du culot cellulaire dans 2,5 ml de méthanol/eau (50/50, v/v) à -40 °C. Réalisation de 3 cycles de congélation/décongélation dans de l'azote liquide, avec 3-5 min pour chaque étape. Récupération du surnageant. Puis remise en suspension du culot cellulaire dans 2,5 ml de méthanol/eau (50/50, v/v) à -40 °C.

	Agitation pendant 30 s. Mélange des 2 surnageants de méthanol/eau (50/50, v/v). Congélation à -80 °C.
Méthanol/acétonitrile/acide formique	Mise en suspension du culot cellulaire dans 1 ml d'acétonitrile /méthanol/acide formique (40/40/20, v/v, avec acide formique 0,1 M dans eau) à -20 °C. Incubation pendant 15 min à -20 °C. Récupération du surnageant. Puis double extraction du culot cellulaire par 2 x 200 µl d'acétonitrile/méthanol/eau (40/40/20, v/v, avec acide formique 0,1 M) à -20 °C. Mélange de tous les extraits. Neutralisation par NH ₄ OH 1,4 M. Congélation à -80 °C.

Tableau 14. Description des 5 protocoles d'extraction comparés par Canelas et al (Canelas et al., 2009).

Si l'on ne tient compte que des nucléotides, l'eau chaude, l'éthanol bouillant et le méthanol/chloroforme étaient les protocoles donnant les meilleurs résultats. Cependant, une dégradation de macromolécules telles que les protéines a été suspectée avec l'utilisation de l'eau chaude. Le mélange méthanol/acétonitrile/acide formique était le protocole donnant les rendements d'extraction les plus faibles (de 0 à 80% selon les nucléotides). Les auteurs ont donc retenu 2 protocoles : l'éthanol bouillant et le méthanol/chloroforme.

Les résultats des études comparatives montrent que :

- l'extraction à l'aide d'acide apporte une grande variabilité dans les résultats.
- les solvants organiques sont à privilégier. Le méthanol est plus souvent cité que l'acétonitrile comme solvant pour la préparation des échantillons en vue du dosage de nucléotides.

Concernant la nature du solvant organique et son utilisation à l'état pur ou mélangé avec de l'eau, les résultats sont discordants. Cependant chaque étude a été réalisée sur une lignée cellulaire précise, différente des autres études. Donc, cette discordance est peut-être liée à une réponse différente de chaque lignée cellulaire vis à vis d'un même solvant. A notre connaissance, aucune étude n'a comparé différents protocoles pré-analytiques sur différentes lignées cellulaires.

1.3. Méthodes de quantification des nucléotides

Contrairement aux analogues nucléos(t)idiques, les nucléotides sont des molécules endogènes, donc forcément présentes dans les matrices biologiques étudiées. Il n'est donc pas possible d'effectuer une gamme d'étalonnage en surchargeant une matrice « blanc » (exemple : plasma témoin). Compte-tenu de l'effet matrice, il n'est pas recommandé de réaliser une gamme d'étalonnage sur matrice aqueuse. Deux solutions sont donc envisageables :

- Etalonnage par la méthode des ajouts dosés (Zhang et al., 2011)
- Etalonnage à l'aide de nucléotides marqués (isotopes stables) ajoutés dans les échantillons (Cohen et al., 2009). Par exemple, le dosage d'ATP endogène sera effectué grâce à une gamme d'étalonnage d'ATP_{13C,15N}. Pour ce type de méthode d'étalonnage, il est bien entendu indispensable d'utiliser un spectromètre de masse comme détecteur.

L'analyse de la littérature concernant le dosage des nucléotides dans des matrices biologiques souligne l'importance :

- du choix de la méthode d'analyse
- du protocole de préparation des échantillons

Parmi les méthodes d'analyse des nucléotides, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem possède une place de choix. La littérature concernant les méthodes de dosage des nucléotides et/ou formes phosphorylées des analogues nucléos(t)idiques est assez riche. Néanmoins, parmi les méthodes n'utilisant pas d'agent de paire d'ions dans la phase mobile, très peu sont appliquées à l'analyse simultanée des nucléosides mono-, di- et triphosphate (Jiang et al., 2012; Pabst et al., 2010; Vo Duy et al., 2012; Wang et al., 2014a; Zhao et al., 2015) et encore moins sont complètement validées (Vo Duy et al., 2012; Wang et al., 2014a). Aucune méthode sans agent de paire d'ions n'est validée pour l'analyse des désoxyribonucléotides.

Pour la préparation d'échantillons en vue du dosage de nucléotides intracellulaires, la littérature révèle une grande hétérogénéité dans les protocoles. La comparaison est difficile car les lignées cellulaires sont différentes entre les études. Il apparaît un manque concernant la préparation des cellules adhérentes et la comparaison entre lignées cellulaires. Parmi tous les protocoles proposés, aucun argument n'est en faveur d'un protocole par rapport à un autre. Cela rend le choix des conditions pré-analytiques très difficile.

2.PARTIE EXPERIMENTALE

L'analyse de la littérature, qui a été développée dans la partie précédente, a révélé peu de méthodes analytiques adaptées à l'ensemble des nucléotides (formes mono-, di- et triphosphate, désoxy ou non). De plus, les méthodes destinées à l'analyse d'un large panel de nucléotides et présentées d'un point de vue analytique sont finalement très rares dans des publications applicatives. Il existe donc soit des méthodes bien développées d'un point de vue analytique mais qui ne sont pas appliquées pour répondre à des questions biologiques, soit des méthodes utilisées pour répondre à des questions biologiques mais qui ne sont pas d'une grande qualité d'un point de vue analytique. Est-ce par manque de collaborations entre équipes pluridisciplinaires ou à cause d'une mise en place difficile de la méthode pour l'analyse de séries d'échantillons ? Devant ce constat, nous avons décidé de développer et valider notre propre méthode de dosage des nucléosides mono-, di et triphosphate. Cette méthode basée sur la LC-MS/MS devait allier performance analytique et simplicité de mise en œuvre de manière à s'intégrer complètement dans une activité hospitalière quotidienne. Seule une méthode répondant à ces deux contraintes permettrait de générer suffisamment de données et de développer de nombreuses collaborations dans le cadre de projets de recherche.

Après le développement de la méthode analytique, nous nous sommes concentrés sur les étapes pré-analytiques. Il nous paraissait en effet indispensable de maîtriser la préparation des échantillons avant de mettre en applications notre méthode analytique.

La partie expérimentale est ainsi constituée de 2 étapes : une première phase analytique, puis une phase pré-analytique.

2.1. Développement et validation d'une méthode de dosage des nucléotides par extraction en ligne couplée à la LC-MS/MS

2.1.1. Objectifs

Une méthode de dosage des nucléotides triphosphates (NTP et dNTP) par LC-MS/MS avec utilisation d'une colonne Hypercarb a été développée et validée précédemment dans notre laboratoire (Cohen et al., 2009). Avant analyse par LC-MS/MS, les extraits cellulaires étaient purifiés par SPE hors ligne sur cartouches WAX.

Cependant, des difficultés d'utilisation au quotidien étaient rencontrées :

- Temps d'analyse long avec une méthode chromatographique d'une durée de 68 min, précédée d'une extraction SPE hors ligne. Ceci limitait le nombre d'échantillons analysés sur une journée.
- Temps d'équilibration de la colonne Hypercarb long en début de journée : 2 - 3h.
- Perte de sensibilité au niveau de l'ionisation les jours suivant l'analyse des nucléotides. Cette diminution de réponse était due à l'utilisation de deux agents de paire d'ions dans la phase mobile (diéthylamine et hexylamine). Malgré le nettoyage de la source et du tube de transfert du spectromètre de masse, ce problème persistait 2 jours, et rendait l'enchaînement avec d'autres analyses difficile.

L'objectif de mon travail concernant la méthode analytique était de développer une méthode d'analyse par LC-MS/MS :

- permettant le dosage des nucléosides mono-, di- et triphosphate
- avec un temps d'analyse plus court
- sans agent de paire d'ions dans la phase mobile
- couplée à une extraction en ligne.

Ceci dans le but d'obtenir une méthode d'analyse adaptée aux nucléosides mono-, di- et triphosphate et plus facile à utiliser.

Cette méthode devait de plus être validée pour l'analyse des nucléosides mono- et triphosphate. La validation de méthode pour les nucléosides diphosphate s'est avérée impossible du fait de l'absence de nucléosides diphosphate marqués dans le commerce.

A partir de l'expérience acquise par le laboratoire lors de la mise au point de la méthode précédente destinée aux nucléosides triphosphate, nous avons choisi de poursuivre la séparation analytique sur colonne Hypercarb. Nous nous sommes imposés comme contraintes pour la composition de la phase mobile l'absence d'agent de paire d'ions et l'absence d'acétate d'ammonium. Le choix de ne pas utiliser d'acétate d'ammonium dans la phase mobile a été dicté par les nombreux problèmes de répétabilité rapportés par les auteurs ayant recours à une colonne Hypercarb avec acétate d'ammonium dans la phase mobile (Bapiro et al., 2011; Huang et al., 2013; Jansen et al., 2009a; Pabst et al., 2010). La littérature étant partagée sur le mode d'ionisation en spectrométrie de masse, nous avons mené une étude comparative des réponses et de la fragmentation en masse en tandem pour chaque nucléotide après ionisation positive ou négative. Enfin, pour la quantification des nucléotides, nous avons gardé la même méthodologie, à savoir l'ajout de nucléotides marqués comme standards dans les échantillons.

2.1.2. Résultats

Le développement et la validation de la méthode de dosage des nucléotides par extraction en ligne couplée à la LC-MS/MS ont été publiés dans l'article suivant (Machon et al., 2014):

Machon C, Jordheim LP, Puy JY, Lefebvre I, Dumontet C, Guitton J. Fully validated assay for the quantification of endogenous nucleoside mono- and triphosphates using online extraction coupled with liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2014; 406(12): 2925-2941.

2.1.3. Discussion

La méthode analytique développée répond aux objectifs initiaux :

- Dosage des (désoxy)ribonucléosides mono-, di- et triphosphate. L'absence de nucléosides diphosphate marqués commercialisés nous empêche de réaliser des gammes d'étalonnage destinées aux nucléosides diphosphate endogènes. Nous sommes obligés d'utiliser les gammes des nucléosides triphosphate correspondants, ce qui crée un biais sur le résultat final.
- Temps d'analyse moins long (38 min comprenant extraction + séparation analytique)
- Absence d'agent de paire d'ions dans la phase mobile. Deux agents de paire d'ions sont néanmoins présents dans la solution échantillon injectée, mais cela représente de faibles quantités dans la source du spectromètre de masse. Ceux-ci sont nécessaires pour améliorer la forme des pics des nucléosides di- et triphosphate. En revanche, ils ne sont pas nécessaires pour l'analyse des nucléosides monophosphate (figure 3 de l'article publié dans Anal Bioanal Chem (Machon et al., 2014)).
- Couplage de la LC-MS/MS à un système d'extraction en ligne. Ceci permet d'automatiser l'étape d'extraction et de gagner du temps.
- Validation de la méthode pour les (désoxy)ribonucléosides mono- et triphosphate sur une gamme de concentrations données. Lors de l'analyse d'échantillons biologiques, afin de rester dans la zone de concentrations validée, nous adaptions notre prise d'essai d'extrait cellulaire. Ceci nous permet d'assurer une bonne qualité des résultats rendus.

Lors du développement de la méthode d'analyse, nous avons fait le choix d'avoir un temps d'analyse un peu long (supérieur à 30 min) afin de séparer les nucléotides. Ceci nous permet de limiter le nombre de nucléotides présents simultanément dans la source du spectromètre de masse, limitant ainsi les phénomènes de compétition entre nucléotides d'autant plus probable que les différences de concentrations entre NTP et dNMP sont de l'ordre de 1000. La séparation des nucléotides permet également la programmation de segments d'analyse dans notre méthode. Cet élément est important pour nous car lié aux performances électroniques de la LC-MS/MS disponible au laboratoire.

Il est important de noter que nous ne rencontrons pas les problèmes de répétabilité rapportés par les autres auteurs utilisant une colonne Hypercarb. Dans notre méthode, le temps de ré-équilibrage de la colonne en fin d'analyse est plus long (10 min à 400 µl/min ou 20 min à 200 µl/min) que ceux rapportés dans les méthodes publiées (7 min à 300 µl/min (Bapiro et al., 2011), 3 min à 250 µl/min (Jansen et al., 2009a)). Des séries d'une trentaine d'extraits cellulaires peuvent être analysés sans rinçage intermédiaire de la colonne et la séparation sur colonne Hypercarb est encore très satisfaisante après 800 injections (Annexe 3). Ceci nous permet de générer des données relativement rapidement permettant de multiplier les collaborations.

Cependant, à cause du manque de stabilité d'AMP et GMP, nous sommes limités à une vingtaine d'échantillons au maximum si un de ces deux nucléotides est dosé. Ce problème nous oblige à remettre en suspension le résidu de l'extrait cellulaire juste avant injection. Ceci demande donc une intervention humaine toutes les 35 minutes environ si AMP et/ou GMP sont étudiés. Le manque de stabilité d'AMP et GMP a été observé dans différentes lignées cellulaires, qu'elles soient adhérentes (Messa, HMEC, HepaRG) ou en suspension (RL, L1210).

Nous avons étudié la stabilité des nucléotides dans la solution contenant 5 mM d'HA et 0,5% de DEA. Pour cela, nous avons ré-injecté la solution 3h, 6h, 9h et 12h après la première injection.

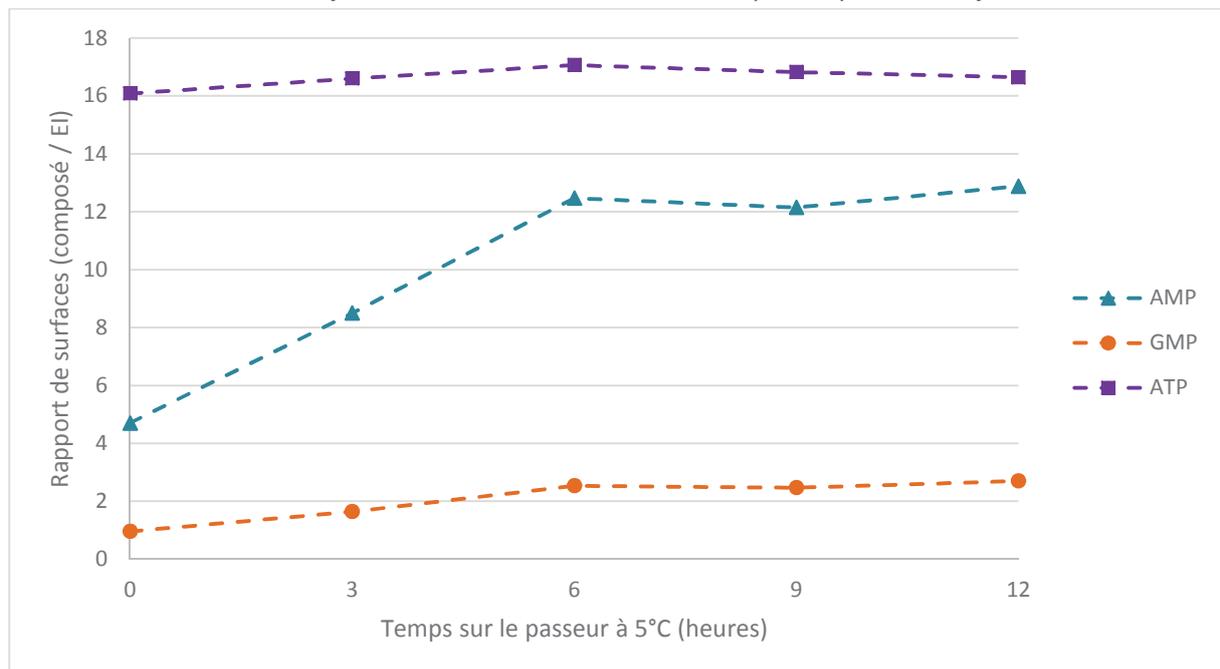


Figure 14. Etude de la stabilité de l'AMP, du GMP et de l'ATP sur le passeur à 5 °C.

Ce problème de stabilité pose plusieurs questions :

- Pour les nucléotides concernés, sachant que l'on observe une augmentation de la réponse au cours du temps passé sur le passeur à 5 °C, les concentrations rendues à T0 ne reflètent vraisemblablement pas la réalité intracellulaire. Donc faut-il attendre plusieurs heures afin d'atteindre un plateau avant d'injecter ?
- Pourquoi ce problème ne touche-t-il pas l'ensemble des nucléotides, ou au moins tous les nucléotides d'une même série ? En effet, les valeurs d'AMP ne sont pas stables, alors que celles de l'ATP le sont (Figure 14).
- Quelle peut être l'origine de ce manque de stabilité ? Trois hypothèses sont avancées :
 - o Phosphorylation/déphosphorylation des nucléotides : cette hypothèse est écartée du fait de la stabilité des autres nucléotides de la série de l'adénosine
 - o Présence d'un composé endogène perturbant la stabilité
 - o Présence d'un complexe [nucléotide – X] qui se dissocie au cours du temps.

Dans le précédent travail de notre équipe, les nucléosides triphosphate étaient stables pendant 40 h sur le passeur à 5 °C (Cohen et al., 2009). Cependant, les nucléosides monophosphate n'étaient pas inclus dans cette étude. La principale différence entre cette méthode d'analyse et la nouvelle méthode est la réalisation d'une extraction SPE hors ligne ou en ligne avant injection. Donc les échantillons étaient conservés sur le passeur après extraction ; contrairement à la nouvelle méthode utilisant l'extraction en ligne. Nous avons donc comparé la stabilité des nucléotides avec extraction hors ligne ou en ligne.

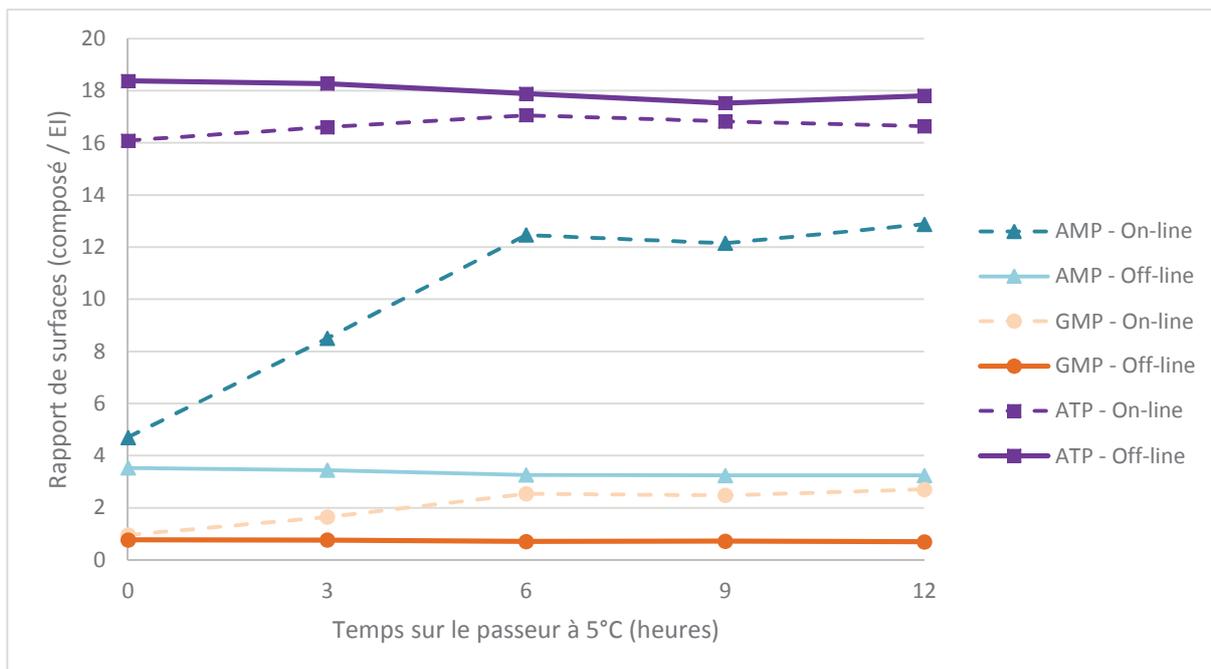


Figure 15. Comparaison de la stabilité de l'AMP, du GMP et de l'ATP sur le passeur à 5 °C, après extraction hors ligne ou non

Après extraction hors-ligne, l'AMP et le GMP sont stables, mais les réponses obtenues correspondent à celles du temps T0 avec extraction en ligne (par exemple : rapport de surfaces = 4 pour l'AMP) et non à celles du plateau observé (par exemple : rapport de surfaces = 12 pour l'AMP) (Figure 15). Devant ces résultats, nous émettons l'hypothèse de la formation d'un complexe entre le nucléotide et un composé de nature inconnue. Ce complexe se dissocierait au cours du temps sur le passeur en l'absence d'extraction préalable, et serait éliminé lors de l'extraction hors ligne. Nous avons donc essayé de dissocier cet éventuel complexe par chauffage et par congélation (Figure 16).

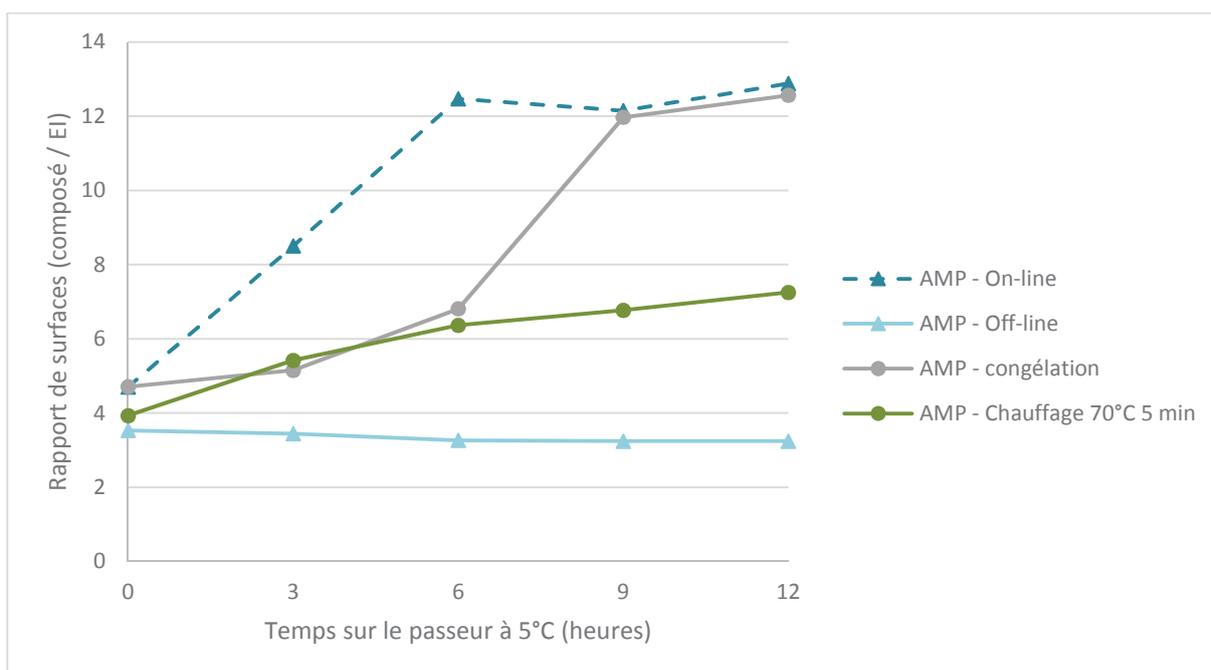


Figure 16. Etude de la stabilité de l'AMP sur le passeur à 5 °C.

La congélation à -80 °C de l'échantillon avant injection, ou son chauffage à 70 °C pendant 5 min retardent l'apparition du plateau, mais ne résolvent pas le problème de stabilité.

Le problème de stabilité n'a pas non plus été résolu en ajoutant une étape de purification avec du chloroforme pendant la préparation de l'extrait cellulaire. Enfin, l'extraction des nucléotides intracellulaires par un autre solvant (acétonitrile/eau 70/30, v/v à la place de méthanol/eau 70/30, v/v) n'a pas répondu à notre problème puisque ce changement a surtout mis en évidence une diminution de la réponse des nucléotides dans la lignée cellulaire testée (Messa).

D'autres hypothèses restent à explorer :

- Les nucléotides peuvent-ils former des adduits, avec NH_4^+ ou Na^+ par exemple, dans le vial ? La recherche et le suivi de la cinétique d'adduits de nucléotides sont indispensables pour savoir si l'augmentation de réponses observée pour certains nucléotides est causée par la dissociation d'adduits.

- Les nucléotides dont les réponses augmentent au fur et à mesure du temps passé sur le passeur pourraient être formés par hydrolyse de molécules dérivées des nucléotides (par exemple par l'hydrolyse de nucléotides sucrés). L'exploration de cette hypothèse nécessite le suivi d'un grand nombre de molécules simultanément ; ce qui n'est pas forcément réalisable avec le matériel actuel. La mise en évidence d'un tel phénomène d'hydrolyse au sein du vial poserait la question de l'efficacité de l'étape de blocage du métabolisme.

La méthode que nous avons développée a répondu à nos objectifs puisqu'elle permet l'analyse des nucléosides mono-, di- et triphosphate dans des conditions compatibles avec les autres activités réalisées au poste LC-MS/MS. Cette méthode allie extraction en ligne couplée à la LC-MS/MS. L'extraction en ligne, décrite pour la première fois dans le cadre de l'analyse des nucléotides, est effectuée sur colonne WAX et la séparation analytique sur colonne Hypercarb. Les agents de paire d'ions (hexylamine et diéthylamine) sont seulement ajoutés dans la solution utilisée pour la reprise des extraits secs. L'ionisation en mode positif et la spectrométrie de masse en tandem nous permettent de différencier sans équivoque les nucléotides, y compris ceux présentant la même masse. Cette méthode, plus rapide (38 min pour extraction + analyse) et plus aisée à mettre en place que la méthode précédemment développée au sein du laboratoire, est utilisée de façon hebdomadaire. Elle est applicable à des séries d'une trentaine d'échantillons (une vingtaine si AMP et/ou GMP sont dosés).

La plus grande facilité de mise en place de la méthode analytique nous a permis, à-travers des collaborations, de doser les nucléotides dans de nombreux échantillons issus de diverses matrices (cellules en culture, acides nucléiques, tissus, tumeurs, milieux de culture). Nous avons donc également répondu au deuxième objectif de l'étude car la méthode est applicable pour répondre à des questions biologiques. A cette occasion, nous nous sommes retrouvés confrontés au difficile choix des conditions de préparations d'échantillons. Afin d'y voir plus clair, nous avons donc mené une étude pré-analytique.

2.2. Optimisation des étapes pré-analytiques

2.2.1. Objectifs

Au regard de la littérature, une grande variété de protocoles pré-analytiques existent pour la quantification des nucléotides dans des matrices biologiques. Cependant, pour la plupart des études, aucune justification n'est apportée pour le choix des conditions pré-analytiques. Pour la validation de la méthode analytique, nous avons isolé les cellules adhérentes par grattage, puis lysé les cellules et enfin extrait les nucléotides avec un mélange méthanol/eau froid (70/30, v/v). Le choix de ce protocole avait été effectué selon des aspects qui nous paraissaient être les plus pratiques. Ainsi, après avoir développé puis validé une méthode d'analyse sensible et sélective, nous avons souhaité maîtriser et optimiser les étapes pré-analytiques.

Les objectifs de notre travail pré-analytique étaient

- d'étudier l'influence des paramètres pré-analytiques sur le dosage de nucléotides intracellulaires et leurs interactions éventuelles
- de déterminer si les conditions optimales de préparation d'échantillon identifiées à partir d'une lignée cellulaire sont extrapolables à d'autres lignées cellulaires.

Tout ceci dans le but de clarifier le choix des conditions pré-analytiques.

Notre travail a ainsi consisté en l'étude de l'ensemble des phases pré-analytiques sur quatre lignées cellulaires : deux adhérentes (NCI-H292, Messa) et deux en suspension (RL et L1210). Ces lignées cellulaires ont été choisies de par leur disponibilité auprès d'une équipe de recherche partenaire et leur relative rapidité de culture.

Compte-tenu du nombre de facteurs à évaluer, nous avons eu recours à une méthodologie à base de plans d'expériences (collaboration avec l'équipe du Pr P. Lanteri, UMR 5280 CNRS, Institut des Sciences Analytiques, Université Claude Bernard Lyon 1 ; logiciel utilisé : Nemrod). Cela nous a permis d'optimiser le nombre d'expériences à réaliser ainsi que l'interprétation des résultats (étude l'influence de chaque paramètre, étude des interactions entre paramètres). Les expériences ont été effectuées sur des cellules en culture, matrice fréquemment utilisée pour le dosage des nucléotides.

2.2.2. Résultats

L'ensemble des résultats de ce travail a été publié dans l'article suivant (Machon et al., 2015) : [Machon C, Bordes C, Cros-Perrial E, Clement Y, Jordheim LP, Lanteri P, Guitton J. Use of designed experiments for the improvement of pre-analytical workflow for the quantification of intracellular nucleotides in cultured cell lines. J Chromatogr A. 2015 Jul 31;1405:116-25](#)

Une partie des résultats (résultats obtenus sur la lignée cellulaire NCI-H292) a été l'objet d'un poster présenté au 16th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man (Juin 2015, New-York) (Annexe 4).

2.2.3. Discussion

Ce travail a montré que certains paramètres pré-analytiques ont une influence majeure sur les résultats du dosage de nucléotides intracellulaires. De ce fait, certaines conditions, telles que le grattage des cellules adhérentes, sont à éviter.

La comparaison entre lignées cellulaires menée dans notre travail a permis d'établir que les conditions pré-analytiques les plus favorables en vue du dosage des nucléotides dépendent de la lignée cellulaire. Le principal facteur dépendant des lignées cellulaires est le solvant d'extraction. Est-ce dû à un comportement différent d'un même solvant vis-à-vis des lignées cellulaires ? En effet, l'efficacité de la lyse cellulaire pourrait dépendre de la composition des membranes cellulaires qui diffèrent d'une lignée cellulaire à une autre (Karp, 2009). De plus, la quantité de nucléotides extraits dépend certainement de la répartition intracellulaire des nucléotides, qui diffère selon la lignée cellulaire (Matuszczyk et al., 2015). Ainsi, l'accessibilité des nucléotides aux solvants dépendraient de la nature du solvant. Parmi les solvants testés, le mélange méthanol/eau (70/30, v/v) apparaît comme un bon compromis comme solvant de lyse cellulaire et d'extraction des nucléotides car il n'a jamais été complètement défavorable lors de nos essais. Pour certaines lignées cellulaires (RL par exemple), le mélange acétonitrile/eau (70/30) peut être intéressant.

Une limite liée à l'importance de certaines barres d'erreur dans l'analyse des effets relatifs E_{relXi} est à souligner. En effet, pour certains nucléotides, notamment l'UMP et les formes diphosphate, la barre d'erreur est plus grande que la barre d'effet relatif. Dans ces cas-là, l'effet relatif de la condition testée sur la concentration en nucléotides n'est pas interprétable.

Avant ce travail, nous effectuions systématiquement la lyse cellulaire et l'extraction avec le mélange méthanol/eau (70/30). Depuis ce travail, lorsque nous analysons les nucléotides dans de nouvelles lignées cellulaires, nous comparons le mélange méthanol/eau (70/30) et le mélange acétonitrile/eau (70/30) pour déterminer lequel convient le mieux aux lignées cellulaires étudiées.

Notre étude, la première à avoir comparé les mêmes conditions pré-analytiques sur plusieurs lignées cellulaires, apporte un élément indispensable à l'interprétation des résultats de dosages de nucléotides. En effet, le comportement différent des lignées cellulaires vis-à-vis d'un même solvant empêche toute comparaison de quantités intracellulaires de nucléotides entre lignées cellulaires. Les seuls résultats pouvant être comparés sont ceux provenant de cellules issues d'une même lignée cellulaire et préparées selon le même protocole.

Notre travail expérimental a abouti :

- Au développement d'une méthode couplant extraction en ligne et LC-MS/MS pour l'analyse des nucléosides mono-, di- et triphosphate. Cette méthode a été validée pour les nucléosides mono- et triphosphate et est applicable à des séries d'une vingtaine à une trentaine d'échantillons biologiques. Le problème de stabilité d'AMP et GMP persiste malgré tout et nous limite dans le nombre d'échantillons quand un de ces deux composés est recherché. En plus d'être développée pour l'analyse des nucléotides endogènes, la méthode couplant extraction en ligne et LC-MS/MS est applicable à l'analyse des nucléosides, nucléosides modifiés, certains analogues nucléos(t)idiques et molécules dérivées des nucléotides (Annexe 5).

- A la démonstration de l'importance de chaque paramètre pré-analytique sur le dosage des nucléotides intracellulaires. Cela nous a permis de mieux connaître l'influence des étapes de préparation d'échantillons.

L'ensemble du travail analytique et pré-analytique nous a également permis de mieux maîtriser l'interprétation des résultats.

3. APPLICATIONS

L'expérience et les connaissances acquises lors du développement de la méthode de dosage des nucléotides, ainsi que la large palette de molécules analysables nous ont permis de développer des collaborations avec différentes équipes de recherche. Les informations apportées par notre approche analytique sont complémentaires des autres approches utilisées (par exemple la biologie moléculaire, la biologie cellulaire).

Certaines applications développées dans le cadre de collaborations ont nécessité une phase de développement supplémentaire, liée à la complexité de la matrice (milieu de culture par exemple) ou à la volonté d'analyser d'autres molécules en plus des nucléotides inclus dans notre travail initial.

Dans la très grande majorité de nos collaborations, les dosages de nucléotides ont été effectués dans des cellules en culture. L'origine des lignées cellulaires utilisées est présentée en Annexe 6.

L'ensemble de nos collaborations a pour thème l'implication du métabolisme des nucléotides dans la tumorigénèse. Parmi les caractéristiques du cancer décrites par Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011), figurent l'instabilité génomique et la reprogrammation cellulaire. Ces deux points sont dépendants, entre autres, du métabolisme des nucléotides. Le métabolisme nucléotidique est ainsi devenu un sujet important de la recherche sur le cancer et même une cible pour des traitements anticancéreux.

3.1. Applications directes de la méthode développée pour les nucléotides

3.1.1. Applications dans le cadre de l'instabilité génomique

Le maintien de la stabilité génomique est essentiel à la transmission fidèle de l'information génétique au cours des divisions cellulaires. Une instabilité génomique a été mise en évidence dans les cancers dès les stades précoces (Bester et al., 2011). Cette instabilité peut être créée par des perturbations du mécanisme de réplication, appelées stress réplicatif. Le stress réplicatif peut être causé par des sources exogènes (rayonnements UV, radiations ionisantes, agents chimiques) ou des sources endogènes (stress oxydant, déséquilibre du pool nucléotidique, modification de l'ADN).

Dans le cadre de deux collaborations (Dr PM Girard de l'Institut Curie, Dr B Lopez de l'Institut Gustave Roussy), nous avons dosé les désoxyribonucléosides triphosphate (dATP, TTP, dCTP et dGTP) dans des cellules afin d'étudier la relation entre pool nucléotidique et stress réplicatif.

3.1.1.1. Inhibition de la progression des fourches de réplication par le stress oxydant induit par des UVA

Collaboration avec l'équipe du Dr PM Girard (CNRS, UMR3348, Institut Curie, Orsay)

Les rayonnements UVA (320 – 400 nm) exercent des effets délétères sur l'organisme via l'absorption de photons UVA par des molécules photosensibilisantes. Cela conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les ROS sont responsables de modifications des lipides, glucides, protéines et acides nucléiques. Il a été démontré que les ROS produits suite à une irradiation par UVA inhibent la réplication de l'ADN (Girard et al., 2008).

L'objectif du travail de recherche mené par l'équipe du Dr PM Girard était de mettre en évidence le mécanisme d'action des ROS lors de l'inhibition de la réplication. Des expériences de biologie moléculaire (mesure de la vitesse de progression des fourches de réplication, Western blot) ainsi que des dosages de désoxyribonucléosides triphosphate (dNTP) ont été menées sur des fibroblastes préalablement irradiés par UVA.

Dans le cadre d'une collaboration, nous avons dosé dATP, TTP, dCTP et dGTP dans des extraits cellulaires de fibroblastes MRC5. Les dosages ont été effectués à différents temps en présence ou en absence d'irradiation par UVA aux doses de 80 et 160 kJ/m².

Des gammes d'étalonnage des 4 dNTP ont été réalisées en ajoutant les molécules marquées dans les extraits cellulaires (Tableau 15). Les fourchettes de concentrations des gammes d'étalonnage ont été déterminées après des essais sur les échantillons d'intérêt.

		dATP	TTP	dCTP	dGTP
pmol injectés	G6	18,8	75,0	12,5	12,5
	G5	9,4	37,5	6,3	6,3
	G4	4,7	18,8	3,1	3,1
	G3	2,3	9,4	1,6	1,6
	G2	1,2	4,7	0,8	0,8
	G1	0,6	2,3	0,4	0,4

Tableau 15. Gammes d'étalonnage de dATP, TTP, dCTP et dGTP utilisées pour les dosages dans les cellules MRC5.

Les dosages ont été effectués sur une prise d'essai d'extrait cellulaire correspondant à environ 2 millions de cellules. Les résultats ont été rendus en pmol de nucléotide par million de cellules.

Les résultats ont montré une diminution transitoire du pool de dNTP après irradiation des cellules par UVA (figure 17A). Cette diminution a été prévenue par l'ajout d'azide de sodium (NaN_3) dans le milieu de culture avant irradiation (figure 17B). L'azide de sodium permet de piéger l'oxygène singulet et donc de limiter ses effets.

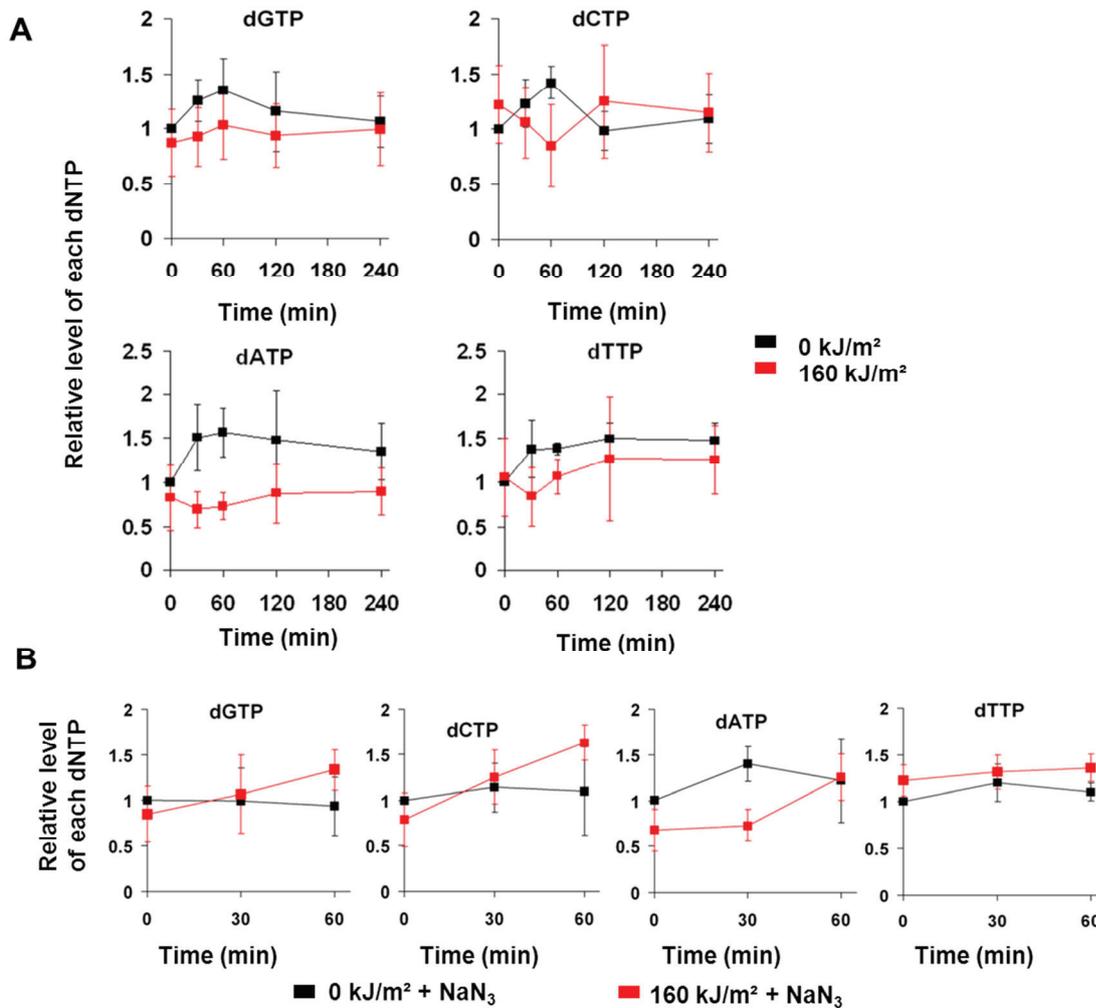


Figure 17. Evolution des taux de dNTP dans des cellules MRC5 irradiées par UVA, en l'absence (A) ou en présence (B) d'azide de sodium (n = 3).

L'ensemble des résultats a montré :

- Une diminution de la vitesse de progression des fourches de réplication après irradiation des fibroblastes par UVA. L'ajout de dNTP dans le milieu de culture après irradiation a permis de revenir à une vitesse de progression des fourches de réplication quasiment normale. Ceci met en évidence une relation entre le pool intracellulaire de dNTP et la vitesse de progression des fourches de réplication.
- Une oxydation de la sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase (RNR). La RNR a pour rôle de transformer les ribonucléosides diphosphate (NDP) en désoxyribonucléosides diphosphate (dNDP). Les dNTP seront ensuite formés à partir des dNDP.
- Une prévention des effets de l'irradiation par UVA (oxydation de la sous-unité R1 de la RNR, déplétion du pool intracellulaire de dNTP, diminution de la vitesse de progression des fourches de réplication) en cas de « capture » de l'oxygène singulet par l'azide de sodium

L'ensemble des résultats de ce travail est publié dans l'article suivant (Graindorge et al., 2015) :

Graindorge D, Martineau S, Machon C, Arnoux P, Guitton J, Francesconi S, Frochot C, Sage E, Girard PM. Singlet oxygen-mediated oxidation during UVA radiation alters the dynamic of genomic DNA replication. PLoS One. 2015 Oct 20;10(10):e0140645. doi: 10.1371/journal.pone.0140645. eCollection 2015. L'article est présenté dans la partie Articles relatifs aux applications (Article n°1)

3.1.1.2. Inhibition de la progression des fourches de réplication par le stress oxydant dans des cellules déficientes en recombinaison homologue

Collaboration avec l'équipe du Dr B Lopez (Université Paris Sud, CNRS UMR 8200, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, Villejuif)

Parmi les altérations de la réplication entraînant un stress réplicatif figure la diminution de la vitesse voire le blocage de propagation des fourches de réplication. Il existe un mécanisme permettant de corriger ce trouble : la recombinaison homologue. Il a été montré que des cellules déficientes en recombinaison homologue (cellules RH⁻) ont spontanément une diminution de la vitesse de propagation des fourches de réplication ; contrairement à des cellules « contrôle » (Wilhelm et al., 2014).

Le travail de recherche mené par l'équipe du Dr B. Lopez a pour objectif d'étudier si le stress oxydant (cause importante de stress endogène chronique) est responsable de la diminution de la vitesse de propagation des fourches de réplication observée dans les cellules RH⁻.

En plus d'expériences de biologie moléculaire, des dosages de dNTP ont été effectués dans des cellules dérivées de hamster : lignées cellulaires V79 et VC8. Pour chaque lignée cellulaire, des cellules « contrôle » et des cellules RH⁻ ont été utilisées.

Des gammes d'étalonnage des 4 dNTP ont été réalisées en ajoutant les molécules marquées dans les extraits cellulaires (Tableau 16). Les fourchettes de concentrations des gammes d'étalonnage ont été déterminées après des essais sur les échantillons d'intérêt.

		dATP	TTP	dCTP	dGTP
pmol injectés	G6	37,5	75,0	125	12,5
	G5	18,8	37,5	62,5	6,3
	G4	9,4	18,8	31,3	3,1
	G3	4,7	9,4	15,6	1,6
	G2	2,3	4,7	7,8	0,8
	G1	1,2	2,3	3,9	0,4

Tableau 16. Gammes d'étalonnage de dATP, TTP, dCTP et dGTP utilisées pour les dosages dans les lignées cellulaires V79 et VC8.

Les dosages ont été effectués sur une prise d'essai d'extrait cellulaire correspondant à environ 2 millions de cellules (nombre déterminé après des essais). Les résultats ont été rendus en pmol de nucléotide par million de cellules.

Parmi les échantillons testés, certains correspondaient à des cellules traitées par hydroxyurée. Ces échantillons représentaient des contrôles permettant de vérifier le bon déroulement de l'analyse. En effet, l'effet de l'hydroxyurée sur le pool de dNTP est connu : forte diminution de dATP. Donc le fait de retrouver une forte diminution de dATP dans les cellules traitées par hydroxyurée a confirmé la validité des résultats de dosages de dNTP (figure 18A).

Les résultats ont montré une modification du pool de dNTP, avec une forte diminution de dATP, après traitement des cellules « contrôle » par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (figure 18B). Le mécanisme induisant la modification du pool de dNTP a été identifié : il s'agit d'une oxydation de la sous-unité RRM2 de la RNR.

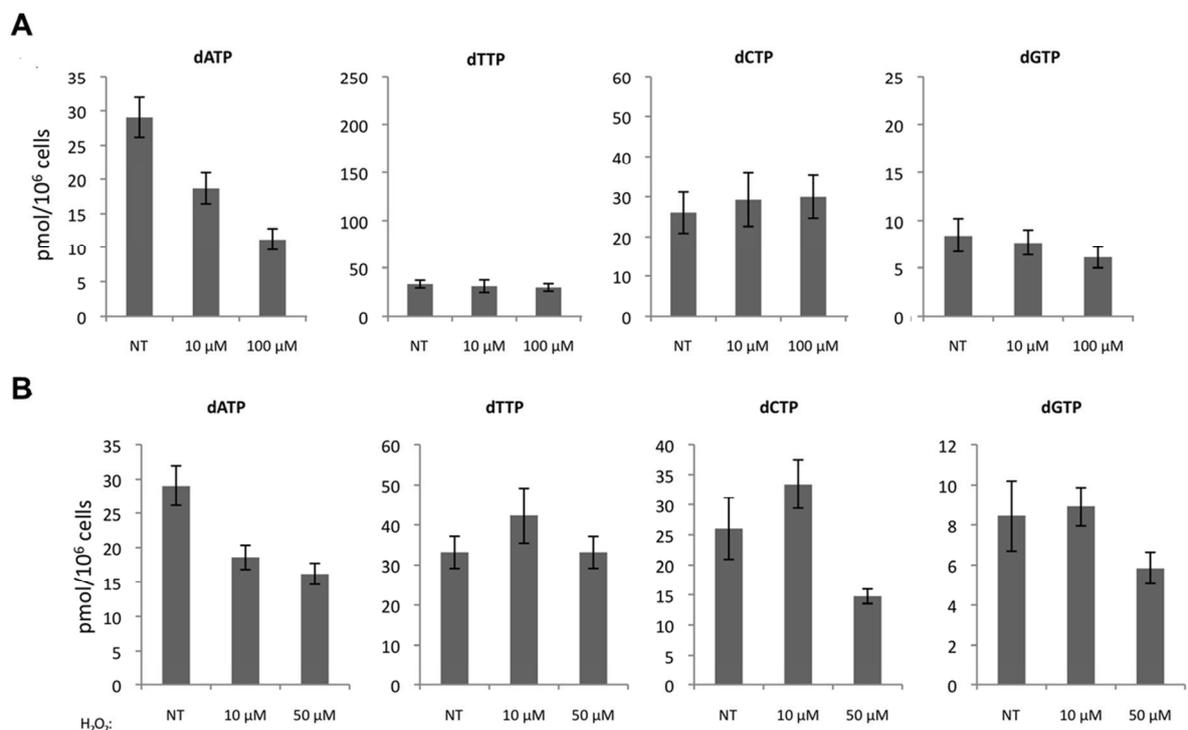


Figure 18. Quantités de dNTP dans les cellules VC79 "contrôle", après traitement par hydroxyurée (A) ou peroxyde d'hydrogène (B).

En revanche, aucune modification du pool de dNTP n'a été observée dans les cellules RH⁻ après traitement par H₂O₂.

L'ensemble des résultats a indiqué que le stress oxydant est une cause de la diminution de la vitesse de propagation des fourches de réplication observée dans les cellules RH⁻. Cet effet délétère entraîne un stress réplcatif indépendamment du pool nucléotidique puisqu'aucune modification du pool de dNTP n'a été observée dans les cellules RH⁻ en présence de stress oxydant.

Un article relatif à ce projet a été soumis au journal PNAS le 23 octobre 2015. Le manuscrit est présenté dans la partie Articles relatifs aux applications (Article n°2).

3.1.2. Etude du rôle de la modulation de cN-II dans les cellules cancéreuses

Collaboration : Dr LP Jordheim, Pr C Dumontet (INSERM U1052 – CNRS 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon)

cN-II est une 5'-nucléotidase intracellulaire impliquée dans la régulation du pool nucléotidique. Elle agit par déphosphorylation des nucléosides monophosphate puriques, avec une préférence pour l'IMP et le GMP plutôt que l'AMP.

L'objectif du travail était d'étudier le rôle de cN-II et de sa modulation dans les cellules cancéreuses. Pour cela, cinq lignées cellulaires cancéreuses (ADF, MDA-MB-231, NCI-H292, MIA PaCa-2, HCT-116) ont été transfectées afin d'inhiber de façon chronique cN-II. L'influence de l'inhibition de cN-II sur les pools nucléotidiques et la sensibilité des cellules à divers anti-cancéreux ont été étudiées.

Les nucléosides triphosphate (ATP, dATP, UTP, TTP, CTP, dCTP, GTP, dGTP), diphosphate (ADP, UDP, CDP, GDP) et monophosphate (AMP, UMP, CMP, GMP) ont été quantifiés dans les cinq lignées cellulaires (figure 19). Afin que les résultats d'AMP et de GMP ne soient pas faussés par d'éventuels problèmes de stabilité dans le vial, tous les résidus secs des échantillons ont été repris extemporanément, c'est-à-dire juste avant analyse. Toutes les lignées cellulaires étudiées étant adhérentes, les nucléotides ont été extraits par ajout du mélange méthanol/eau (70/30, v/v) directement dans la flasque.

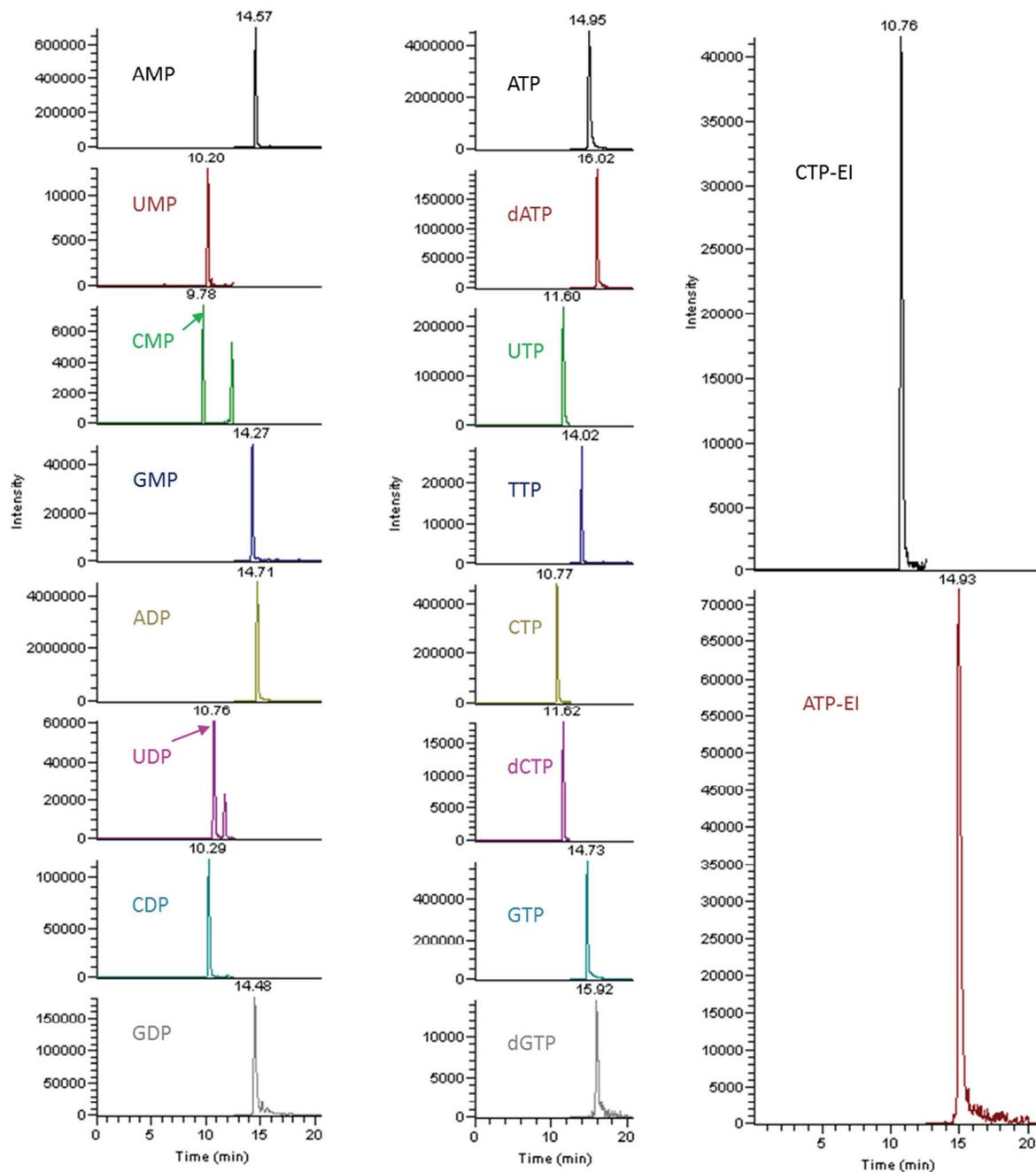


Figure 19. Exemple de chromatogrammes obtenus avec des échantillons de la lignée cellulaire ADF.

Aucune différence significative n'a été observée dans les quantités de nucléotides entre les cellules présentant une expression de cN-II normale et celles ayant une inhibition chronique de cN-II. Nous émettons l'hypothèse que les cellules ayant une inhibition chronique de cN-II ont mis en place un processus de compensation afin de garantir la synthèse des nucléotides.

Les résultats observés sur la lignée cellulaire ADF ont été publiés dans l'article suivant (Cividini et al., 2015) :

Cividini F, Cros-Perrial E, Pesi R, Machon C, Allegrini S, Camici M, Dumontet C, Jordheim LP, Tozzi MG. Cell proliferation and drug sensitivity of human glioblastoma cells are altered by the stable

modulation of cytosolic 5'-nucleotidase II. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Aug;65:222-9. doi: 10.1016/j.biocel.2015.06.011. Epub 2015 Jun 14. L'article est présenté dans la partie Articles relatifs aux applications (Article n°3)

Les résultats obtenus avec les lignées cellulaires MDA-MB-231, NCI-H292, MIA PaCa-2, HCT-116 seront publiés dans la revue *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* : Bricard G, Cros-Perrial E, Machon C, Dumontet C, Jordheim LP. Stably transfected adherent cancer cell models with decreased expression of 5'-nucleotidase cN-II.

Les premiers tests réalisés ayant montré une adaptation des cellules ayant une inhibition chronique de cN-II pour maintenir leur métabolisme, les prochaines expériences seront réalisées sur les mêmes lignées cellulaires, mais en situation de stress. En effet, l'objectif sera de déterminer si la réponse à un stress est identique entre les cellules ayant une inhibition de cN-II et les cellules « contrôle ».

3.2. Applications nécessitant une phase de développement analytique

3.2.1. Applications dans le cadre de la reprogrammation cellulaire

Pour répondre aux besoins de la croissance tumorale (augmentation de la production énergétique, biosynthèses de macromolécules, maintien de la balance redox) dans un environnement appauvri en nutriments et oxygène, les cellules tumorales s'adaptent via une « reprogrammation » de leurs voies métaboliques (Cairns et al., 2011; Schulze and Harris, 2012).

3.2.1.1. Implication des nucléotides de la voie des hexosamines dans le stress du réticulum endoplasmique

Collaboration avec l'équipe du Dr S. Manié (INSERM U1052 – CNRS 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon)

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organelle intracellulaire présent dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Il est formé d'un réseau membranaire de citernes et tubulures communiquant entre eux. Ce réseau de membranes renferme un compartiment subcellulaire, la lumière du RE, qui est séparé du cytoplasme. Le RE intervient dans la synthèse, les modifications, le repliement et la maturation de protéines. Il intervient également dans le stockage du calcium intracellulaire, représentant le principal lieu de stockage, et dans la synthèse des acides gras et phospholipides.

L'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE, situation induite par une perturbation de la maturation protéique, produit une situation de stress, appelée stress du RE. Le RE déclenche alors la réponse UPR (Unfolded Protein Response) via 3 voies de signalisation : IRE-1, ATF6 et PERK. L'activation de la réponse UPR a pour but de rétablir une homéostasie du RE en réduisant la synthèse protéique et en induisant la synthèse de protéines chaperonnes impliquées dans le processus de repliement. Si le processus échoue, le stress se prolonge et les voies induisant l'apoptose sont activées (Walter and Ron, 2011). Le RE intervient ainsi dans le « contrôle qualité » du repliement des protéines.

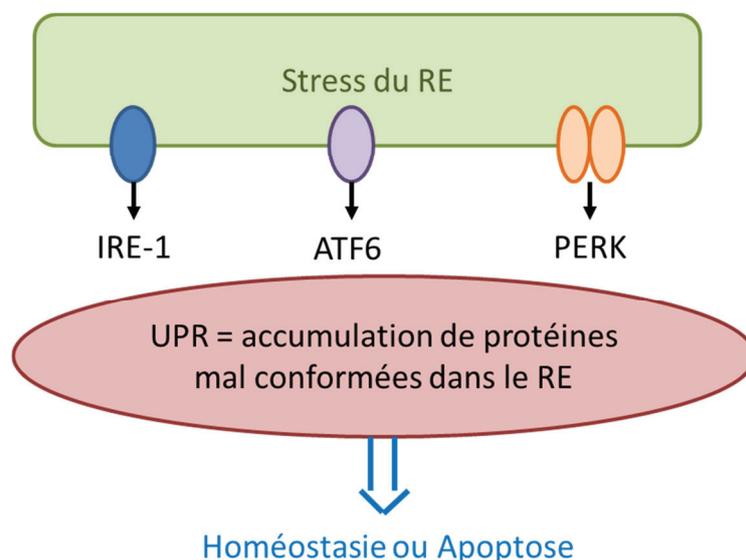


Figure 20. Stress du RE et réponse UPR. IRE-1, ATF6 et PERK agissent en tant que senseurs du stress du RE.

Pathologies et stress du RE

Des stimuli extracellulaires, mais aussi des variations de l'homéostasie intracellulaire peuvent entraîner une perturbation du repliement des protéines dans le RE. Ainsi, la réponse UPR a été observée dans plusieurs situations pathologiques chez l'homme et dans des modèles murins de pathologies humaines : diabète, syndrome métabolique, maladies inflammatoires de l'intestin, infections virales, maladies neurodégénératives, cancers (Wang and Kaufman, 2012).

La voie des hexosamines

La voie des hexosamines (HBP pour hexosamine biosynthetic pathway) représente une des voies métaboliques du glucose (Annexe 7). Contrairement à la voie de la glycolyse, empruntée par la majeure partie du glucose intracellulaire, la voie des hexosamines utilise seulement 1 à 3% du glucose intracellulaire (Obici and Rossetti, 2003). L'étape finale de la voie des hexosamines aboutit à la formation d'UDP-N-Acétylglucosamine (UDPGlcNAc). L'UDPGlcNAc est responsable des O-glycosylations des résidus sérine et thréonine des protéines, et des N-glycosylations des protéines.

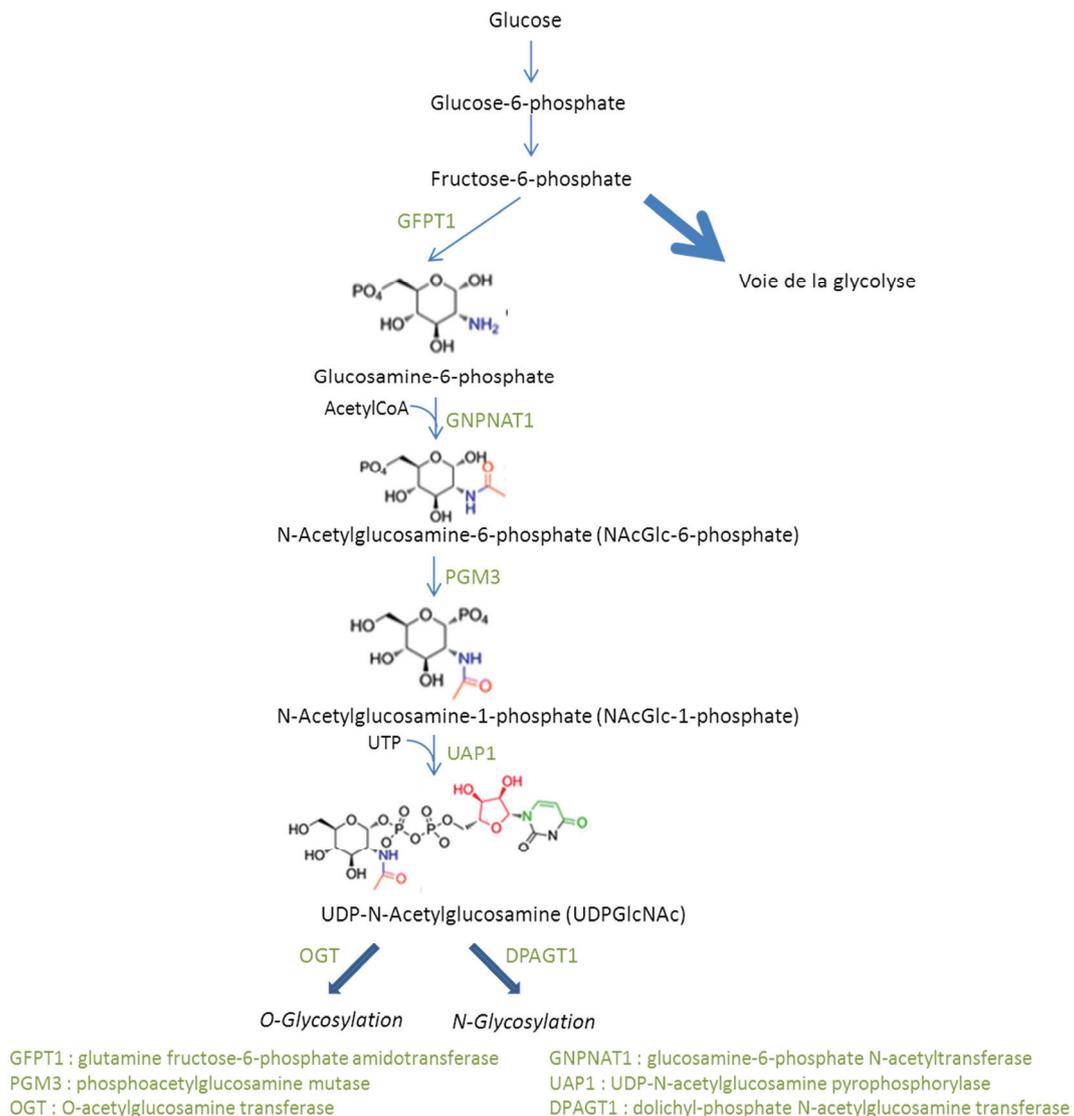


Figure 21. Voie des hexosamines. La voie des hexosamines proprement dite s'arrête au niveau de l'UDPGlcNAc.

Voie des hexosamines et stress du RE

Denzel et al. ont démontré la relation entre la voie des hexosamines et l'activité de « contrôle qualité » des protéines du RE via les N-glycosylations (Denzel et al., 2014). Wang et al. ont montré un lien entre la réponse UPR observée dans un contexte d'ischémie-reperfusion, situation induisant un stress aigu du RE, et la voie des hexosamines (Wang et al., 2014b)]. Une stimulation de la voie des hexosamines par l'UPR via Xbp1s a été rapportée. Ceci permet de produire plus d'UDPGlcNAc et donc d'augmenter les capacités de N-glycosylation et ainsi corriger le stress du RE.

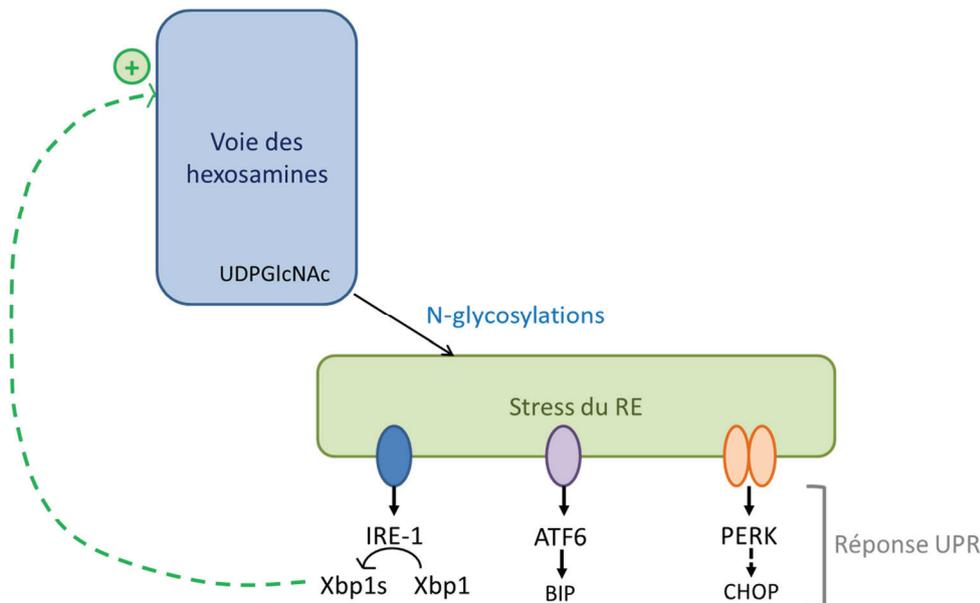


Figure 22. Relations voie des hexosamines, stress du RE et réponse UPR. Le lien voie des hexosamines / stress du RE a été montré par Denzel et al.. La stimulation de la voie des hexosamines par la réponse UPR a été démontrée par Wang et al..

Travail de recherche

Lors de la croissance tumorale, les cellules cancéreuses sont dans un environnement appauvri en oxygène et en nutriments. L'appauvrissement en glucose induit une diminution, entre autres, de la voie des hexosamines, entraînant une hypoglycosylation des protéines et donc un stress du RE.

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par la présence d'un stress chronique du RE, donc d'une UPR chronique. Normalement, cela devrait aboutir à une apoptose. Mais, il a été démontré, dans des modèles murins de cancers du poumon, que les cellules cancéreuses se sont adaptées pour supporter ce stress chronique (Huber et al., 2013).

L'objectif de l'étude menée par le Dr S. Manié était d'explorer la voie des hexosamines et les voies de signalisation de l'UPR dans le cancer du poumon chez l'homme. Ce travail a été réalisé sur des échantillons de tumeurs bronchiques.

Différentes approches complémentaires ont été utilisées pour explorer la voie des hexosamines et les voies de signalisation de l'UPR :

- Dosages de la NAcGlc-6-phosphate et de l'UDPHexNAc pour étudier la fonctionnalité de la voie des hexosamines

- Etudes protéiques et immunohistochimiques des enzymes impliquées dans la voie des hexosamines
- Etudes protéiques et immunohistochimiques des marqueurs caractéristiques de la réponse UPR.

Le ribose-5-phosphate et l'IMP ont également été dosés pour explorer la voie des pentoses phosphate (Annexe 7).

Notre travail a consisté à doser l'UDPHexNAc, la NAcGlc-6-phosphate, le ribose-5-phosphate et l'IMP dans des tumeurs bronchiques.

Les molécules d'intérêt ont d'abord été infusées en spectrométrie de masse afin de déterminer les transitions les plus abondantes (Tableau 17).

Molécule	Ionisation négative (E collision)	Ionisation positive (E collision)
UDPGlcNAc	Fragments instables	608 -> 204 (15) ⁽⁺⁾
NAcGlc-6-phosphate	300 -> 97 (25)	302 -> 284 (12) ⁽⁺⁾
	300 -> 199 (17)	302 -> 126 (25)
Ribose-5-phosphate	229 -> 97 (15) ⁽⁺⁾	Réponse faible
	229 -> 79 (30)	
	229 -> 139 (15)	
IMP		349 -> 137 (25)

Tableau 17. Transitions identifiées pour l'UDPGlcNAc, la NAcGlc-6-phosphate et le ribose-5-phosphate et l'IMP.

⁽⁺⁾ : transition la plus abondante pour chaque molécule

Dans les échantillons biologiques, l'UDPGlcNAc possède un énantiomère : l'UDPGalNAc (en équilibre grâce à l'enzyme GalE). Leur séparation n'étant pas possible avec notre méthode analytique, nous les avons regroupés sous le nom d'UDPHexNAc (Hex signifiant hexose).

Dans la voie des hexosamines, la NAcGlc-6-phosphate précède la NAcGlc-1-phosphate. Les deux composés ayant la même masse, nous avons cherché un ou plusieurs fragment(s) spécifique(s) pour chaque molécule afin de les différencier (Figure 23).

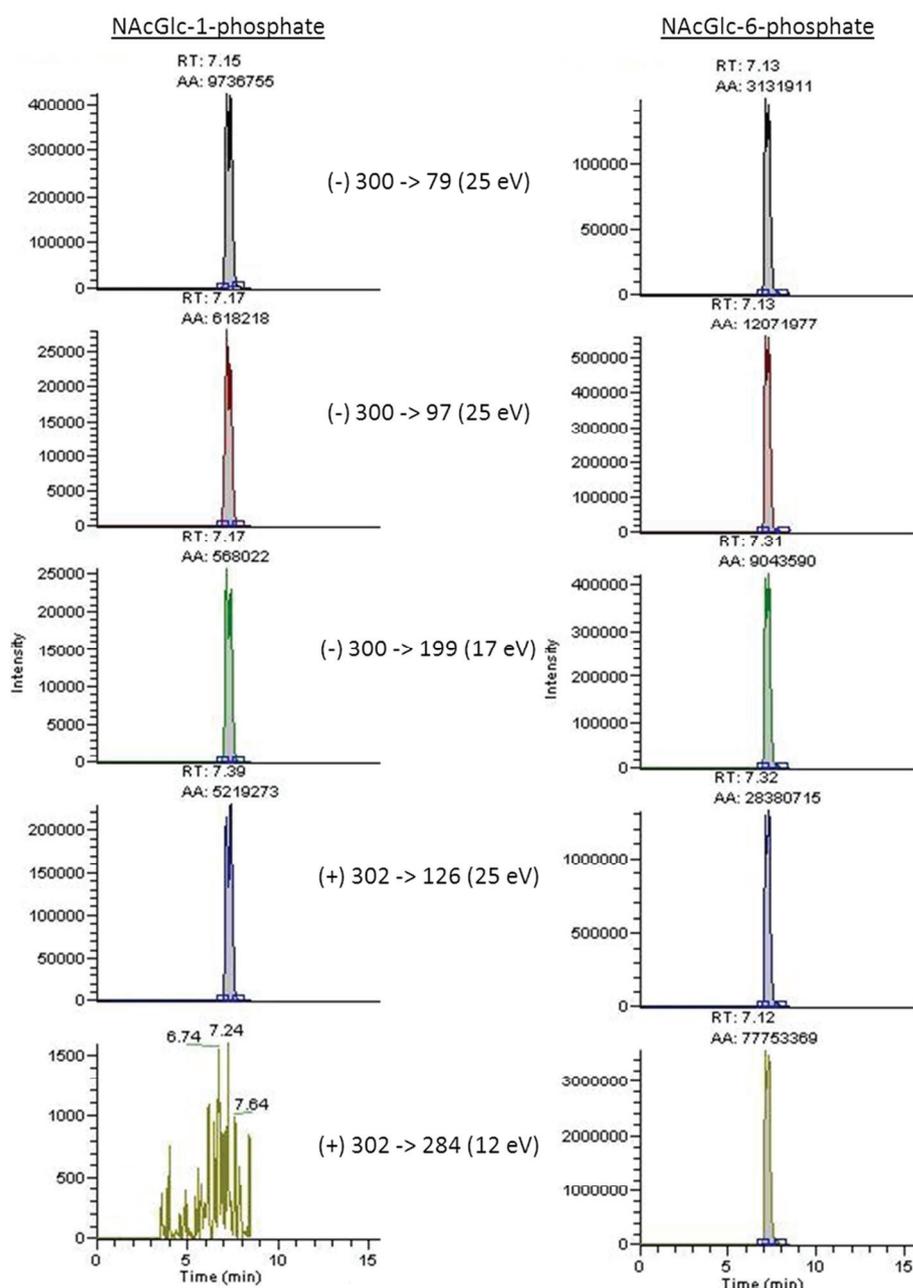


Figure 23. Comparaison des fragments formés (nature et abondance) par le NAcGlc-6-phosphate et le NAcGlc-1-phosphate. Injection d'un mélange de NAcGlc-6-phosphate et le NAcGlc-1-phosphate à 200 μ M dans de l'eau.

La NAcGlc-6-phosphate présente une transition spécifique (302 \rightarrow 284 en ionisation positive) contrairement à la NAcGlc-1-phosphate. Les abondances des fragments en ionisation négative n'ont pas le même profil selon la molécule. La transition majoritaire pour la NAcGlc-1-phosphate est 300 \rightarrow 79, alors que pour la NAcGlc-6-phosphate il s'agit de la transition 300 \rightarrow 97 est la plus abondante. L'utilisation de la transition 302 \rightarrow 284 en ionisation positive nous a permis de doser spécifiquement la NAcGlc-6-phosphate.

Avec la méthode chromatographique développée pour l'analyse des nucléotides, les composés ont présenté les temps de rétention suivants :

- | | |
|----------------------|----------|
| - UDPGlcNAc | 13 min |
| - NAcGlc-6-phosphate | 7,2 min |
| - Ribose-5-phosphate | 4,7 min |
| - IMP | 13,2 min |

La méthode chromatographique étant adaptée pour les nucléotides, et non pour les sucres-phosphate, les pics chromatographiques de la NAcGlc-6-phosphate et du ribose-5-phosphate sont larges et dédoublés. Une modification des conditions chromatographiques (diminution du palier de début de gradient + augmentation de la pente du gradient) a permis d'améliorer légèrement la forme des pics. Cela a entraîné une modification des temps de rétention des composés : 4 min pour ribose-5-phosphate, 5 min pour NAcGlc-6-phosphate, 10,4 min pour UDPGlcNAc et 10,5 min pour IMP.

L'UDPHexNAc, la NAcGlc-6-phosphate, le ribose-5-phosphate et l'IMP ont été dosés dans des échantillons de tumeurs bronchiques et tissus sains adjacents (15 couples tissus sains / tumeurs).

Les tumeurs bronchiques et les tissus sains ont été cryobroyés, puis le cryobroyat a été conservé à -80 °C jusqu'à extraction. Le protocole suivant a été appliqué pour l'extraction des hexosamines et nucléotides du cryobroyat :

- Ajouter 1 ml de méthanol/eau froid (70/30, v/v) sur le cryobroyat
- Vortexer 30 secondes
- Incuber 30 minutes à 4 °C
- Vortexer 30 secondes
- Plonger le tube quelques secondes dans l'azote liquide
- Centrifuger 10 min à 13 200 tours/min
- Récupérer le surnageant (= extrait cellulaire)
- Conserver le tube à -80 °C jusqu'à analyse

Sur le culot, la quantité de protéines présentes dans chaque échantillon de tumeurs ou tissus sains a été déterminée par incubation dans tampon de lyse RIPA + 8 mol/l d'urée suivie du dosage par le réactif de Lowry.

Pour l'analyse, un volume d'extrait correspondant à 0,5 – 0,6 µg de protéines a été prélevé (quantité choisie après des essais afin d'obtenir une réponse convenable pour l'ensemble des molécules d'intérêt). Après ajout des étalons internes (dAMP_{13C15N} pour IMP, CTP_{13C} pour les autres composés), les échantillons ont été préparés selon le protocole utilisé pour l'analyse des nucléotides : centrifugation, évaporation du surnageant puis reprise du résidu sec par 100 µl d'une solution contenant 5 mM d'HA et 0,5% de DEA.

Les résultats ont été rendus en rapports de surface (surface du composé d'intérêt / surface de l'étalon interne) par µg de protéines afin de permettre la comparaison entre tissus sains et tumeurs pour un même patient. Aucune quantification en pmol n'a été effectuée car nous ne disposons pas des molécules d'intérêt marquées.

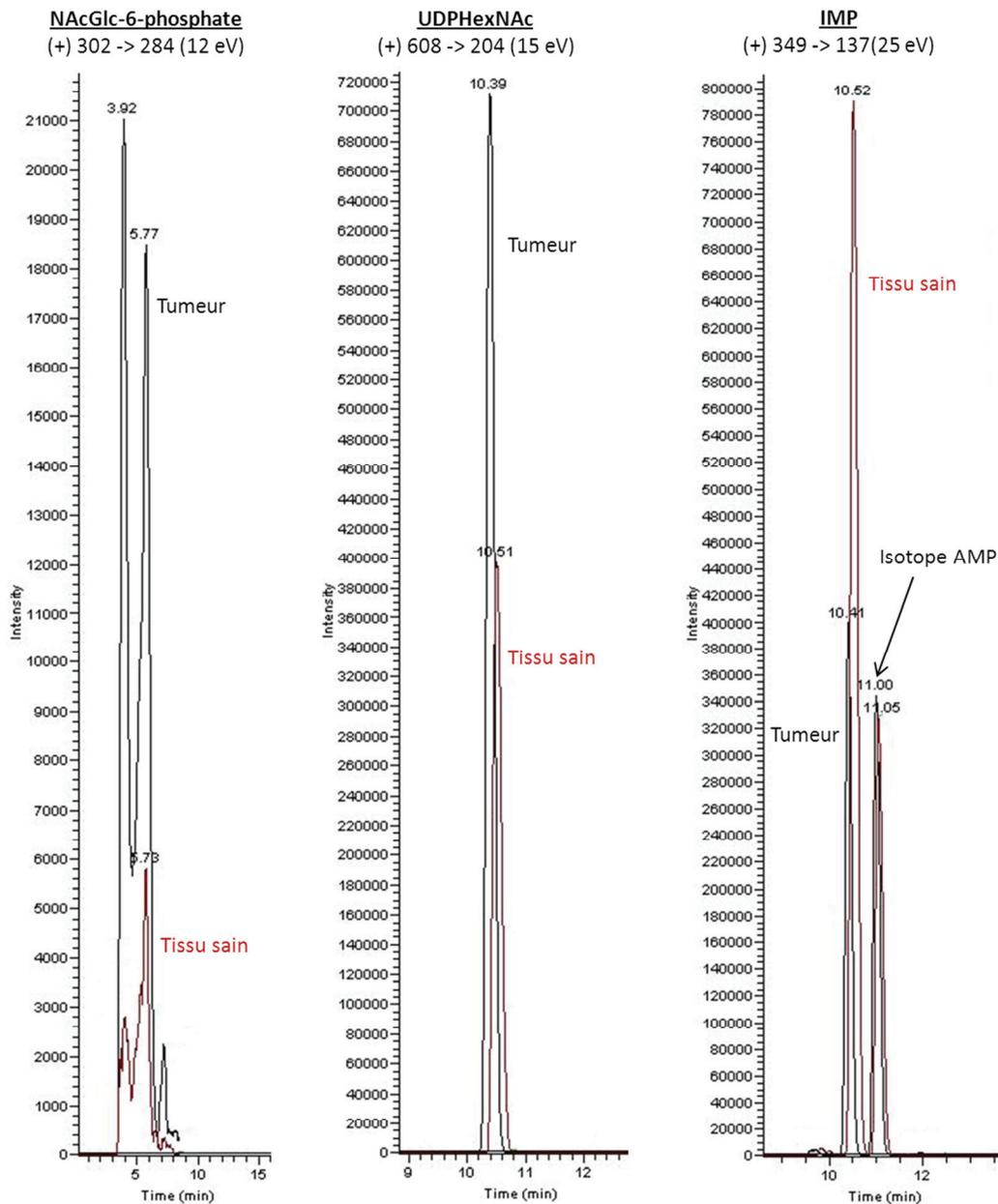


Figure 24. Comparaison des chromatogrammes obtenus pour la NAcGlc-6-phosphate, l'UDPHexNAc et l'IMP dans un couple « tumeurs / tissus sains ».

Quinze couples « tumeurs – tissus sains adjacents » ont été analysés. L'analyse statistique selon le test de Wilcoxon a montré une différence significative des quantités d'UDPGlcNAc ($p < 0,001$) et NAcGlc-6-phosphate ($p = 0,003$) entre les tumeurs et les tissus sains. Aucune différence significative n'a été observée pour l'IMP et le ribose-5-phosphate (Figure 25).

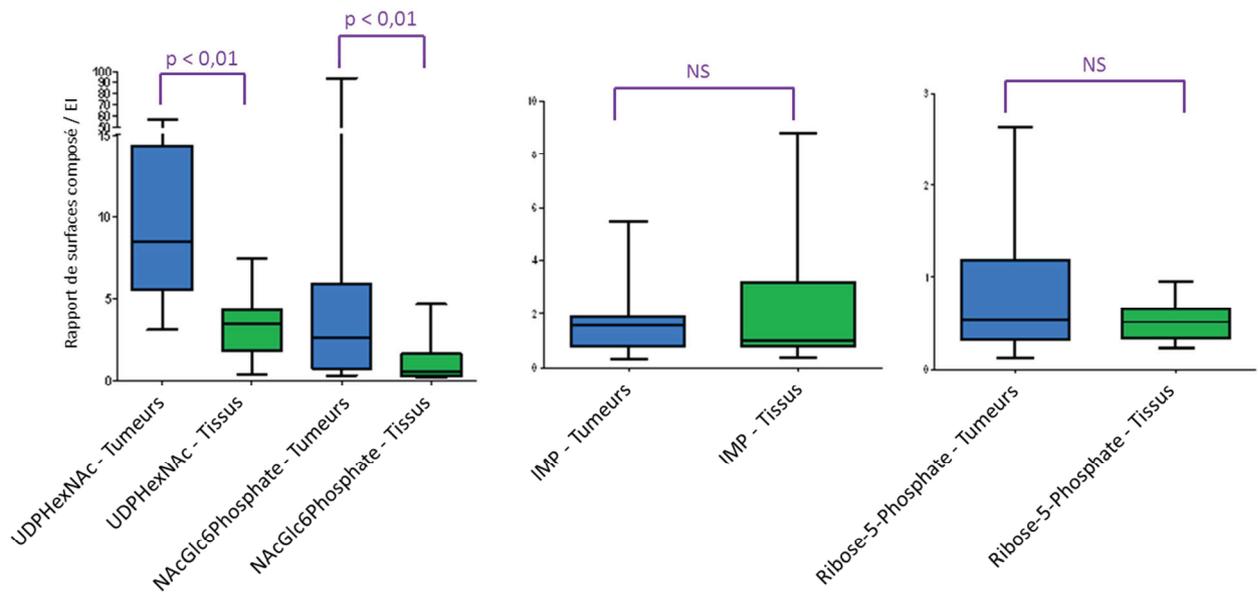


Figure 25. Comparaison des quantités d'UDPHexNAc, NACGlc-6-phosphate, IMP et ribose-5-phosphate dans des tumeurs et tissus sains adjacents (logiciel GraphPad Prism®).

Ces résultats montrent une majoration de la voie des hexosamines dans les tumeurs par rapport aux tissus sains adjacents. Le flux vers la voie des pentoses phosphate est identique dans les tumeurs et les tissus sains adjacents.

Les données issues des dosages d'UDPHexNAc et de NACGlc-6-phosphate sont corrélées avec les résultats des analyses protéiques et immunohistochimiques.

L'expression de marqueurs de la réponse UPR (BIP, Xbp1s et CHOP) et des enzymes impliquées dans la voie des hexosamines est augmentée dans les tumeurs par rapport aux tissus sains adjacents (figure 26). Lors des western-blots, l'actine est utilisée comme marqueur de charge, c'est-à-dire comme élément permettant de vérifier que les échantillons contiennent la même quantité de protéines.

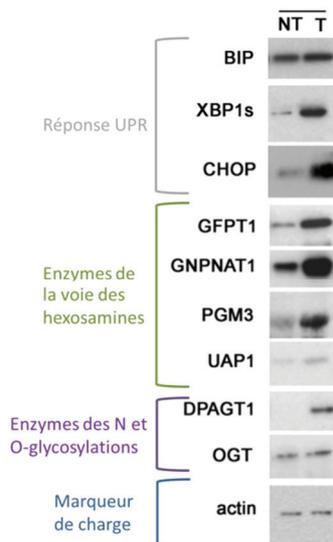


Figure 26. Western-blot obtenu pour des marqueurs protéiques de la réponse UPR et des enzymes de la voie des hexosamines. Exemple d'un couple tissu sain adjacent (NT) / tumeur (T).

L'ensemble des résultats a montré une augmentation de la voie des hexosamines (augmentation de la NAcGlc-6-phosphate, de l'UDPHexNAc et de l'expression des enzymes) et de la réponse UPR dans les tumeurs bronchiques comparativement aux tissus sains.

La suite du projet consistera en l'étude mécanistique, c'est-à-dire à déterminer si la voie des hexosamines est stimulée par la réponse UPR résultant du stress du RE. Cela demandera de renouveler les dosages dans des cellules en culture.

Un article regroupant l'ensemble des résultats observés est en cours de rédaction.

3.2.1.2. Etude du contrôle de l'homéostasie de cellules cancéreuses présentant des marqueurs de cellules souches

Collaboration avec l'équipe du Pr A. Puisieux (INSERM U1052 – CNRS 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon)

Les tumeurs sont constituées d'un mélange de cellules hétérogènes présentant différents phénotypes et ayant chacune leur rôle. Cette hétérogénéité favorise une coopération entre ces cellules à l'image d'un tissu sain et favorise également le développement de la tumeur. Parmi les cellules tumorales, les cellules souches cancéreuses sont les plus agressives car elles sont capables de se disséminer et de résister aux traitements. Ces particularités leur permettent de survivre plus longtemps et de proliférer dans un environnement « non adapté ». La compréhension de l'homéostasie de ces cellules est donc d'intérêt.

L'objectif du projet de recherche initié par le Dr A Vigneron (INSERM U1052 – CNRS 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon) était de déterminer s'il existe un contrôle particulier de l'homéostasie dans les cellules cancéreuses présentant des marqueurs de cellules souches. L'implication de la réponse aux glucocorticoïdes a été étudiée. Une analyse globale de l'anabolisme cellulaire en réponse aux glucocorticoïdes a donc été menée, avec entre autres l'étude des pools nucléotidiques et de la voie des hexosamines.

Etude du pool nucléotidique

Dans un premier temps, les nucléosides triphosphate (ATP, dATP, UTP, TTP, CTP, dCTP, GTP, dGTP), diphosphate (ADP, UDP, CDP, GDP) et monophosphate (AMP, UMP, CMP, GMP) ont été quantifiés dans des cellules en culture. Le dosage simultanée d'AMP, ADP et ATP permet d'évaluer le statut énergétique de la cellule grâce à la formule : $(ATP + 0,5 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$.

Les cellules (cinq lignées cellulaires différentes) étaient toutes immortalisées et ont toutes été soumises à l'activité d'un oncogène. En revanche, certaines présentaient un marqueur de cellules souches alors que d'autres non (cellules « contrôle »).

Les résultats des nucléosides triphosphate et monophosphate ont été rendus en pmol/échantillon après calcul grâce aux gammes d'étalonnage des nucléotides marqués correspondants. Les résultats des nucléosides diphosphate ont été rendus en rapport de surfaces (nucléotides / étalon interne) car nous ne disposons pas des équivalents marqués (isotope stable). Afin de comparer les résultats d'un

échantillon à l'autre, les valeurs (quantités ou rapports de surfaces) ont été rapportées à la quantité de protéines dosées dans chaque échantillon cellulaire.

Les résultats ont montré un maintien du pool nucléotidique dans les cellules présentant un marqueur de cellules souches, contrairement aux cellules « contrôle » pour lesquelles une diminution du pool nucléotidique a été observée.

Autres métabolites

Afin d'étudier d'autres voies métaboliques simultanément à l'analyse des nucléotides, d'autres métabolites ont été recherchés avec la méthode d'analyse développée pour les nucléotides :

- Ribose-5-phosphate, glucose-6-phosphate : pour explorer le métabolisme du glucose
- UDPGlcNAc, UDPglucose, NAcGlc-6-phosphate : pour explorer la voie des hexosamines
- S-adénosylméthionine (SAM), S-adénosylhomocystéine (SAH) : pour explorer le pool de groupements methyl disponibles dans les cellules car SAM est un donneur de groupement methyl principalement pour le cycle des folates (élément dans la voie de synthèse de nucléotides)

Toutes les nouvelles molécules ont été infusées afin d'identifier une ou plusieurs transitions en spectrométrie de masse, puis injectées en LC-MS/MS couplée à l'extraction en ligne.

Segment	Molécule	Mode d'ionisation	Transition (E collision)	Temps de rétention (min)
S1	NAcGlc-6-phosphate	Pos	302 → 284 (25)	6,7
	Ribose-5-phosphate	Neg	229 → 97 (15)	6,8
			229 → 79 (30)	
	Glucose-6-phosphate	Neg	259 → 97 (15)	6,9
259 → 79 (30)				
S2	AMP	Pos	348 → 136 (25)	14,3
	ADP	Pos	428 → 136 (32)	14,4
	ATP	Pos	508 → 136 (32)	14,6
	ATP - étalon interne	Pos	518 → 141 (32)	14,4
	GMP - étalon interne	Pos	379 → 162 (20)	13,8
	UDPglucose	Neg	564,8 → 323 (25)	12,8
	UDPGlcNAc	Pos	608 → 204 (15)	12,9
S3	SAM	Pos	399,1 → 136 (30)	18,8
	SAH	Pos	385,1 → 136 (20)	21,6

Tableau 18. Mode d'ionisation, transition et temps de rétention des molécules d'intérêt.

Trois segments ont été créés dans la méthode chromatographique en tenant compte des temps de rétention de chaque composé d'intérêt (tableau 18).

Dans les milieux biologiques, il existe des isomères du glucose-6-phosphate, comme le fructose-6-phosphate. Nous ne sommes pas en mesure de différencier ces isomères donc la réponse observée pour la transition 259 → 97 dans les cellules regroupe tous les sucres monophosphate à 6 carbones, c'est-à-dire les hexoses-6-phosphate.

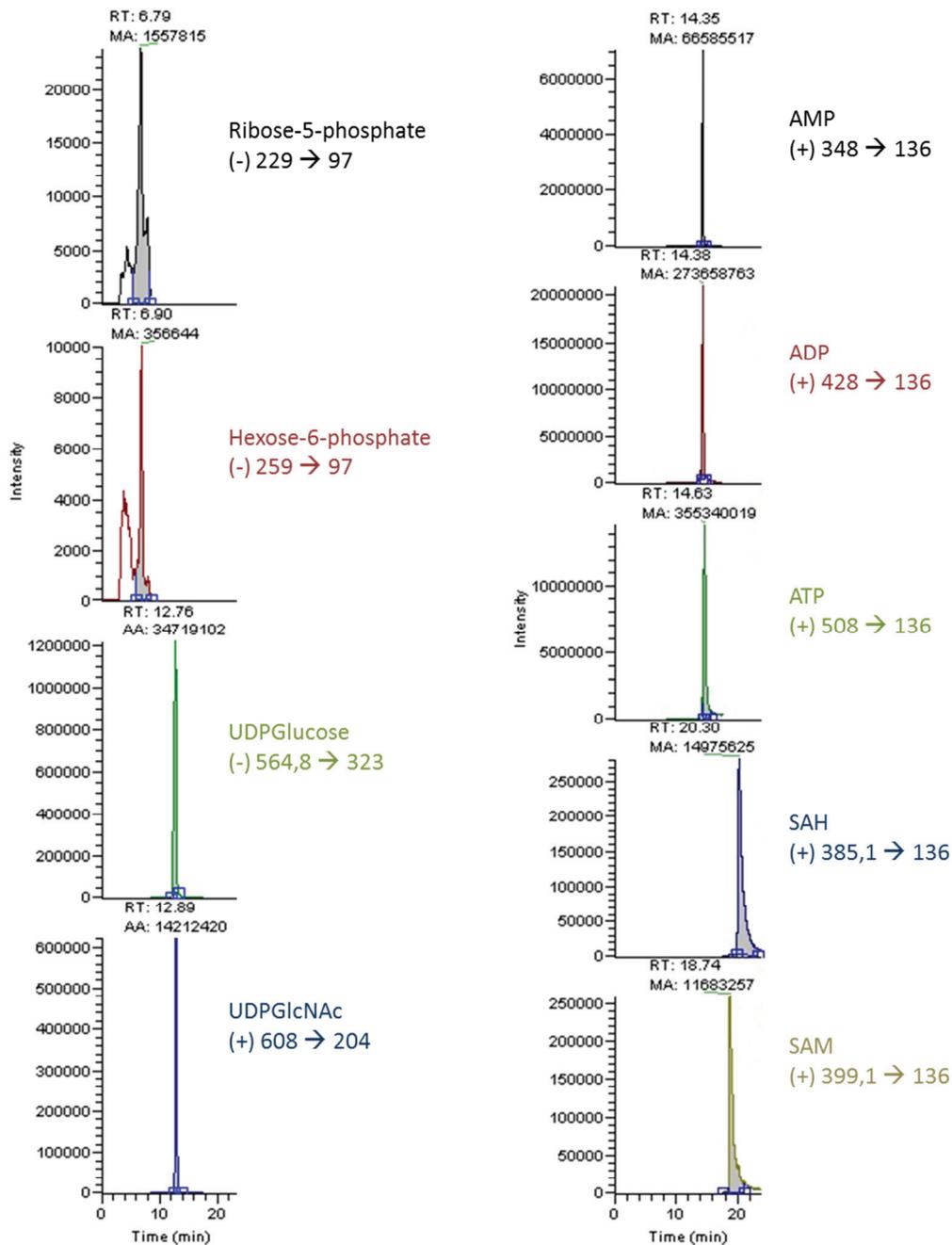


Figure 27. Exemple de chromatogrammes obtenus après analyse d'un échantillon cellulaire.

Les quantités de NAcGlc-6-phosphate mises en évidence avec notre méthode de dosage étaient trop faibles pour pouvoir être exploitées.

Les résultats ont montré une augmentation de l'UDPGlcNAc dans les cellules présentant un marqueur de cellules souches par rapport aux cellules « contrôle ». Aucune différence n'a été mise en évidence pour les autres métabolites.

Etude de flux de la voie des hexosamines

Suite aux résultats montrant une augmentation de l'UDPglcNAc dans les cellules présentant un marqueur de cellules souches, une étude du flux de la voie des hexosamines a été menée. Cette étude a été réalisée en suivant la cinétique de formation d'UDPglcNAc marqué à partir de glucose marqué ^{13}C ajouté dans le milieu de culture. La cinétique de formation d'UDPglc marqué à partir de glucose marqué ^{13}C ajouté dans le milieu de culture a simultanément été suivie pour valider la spécificité de l'analyse. En effet, l'UDPglc ne faisant pas partie de la voie des hexosamines, une augmentation de la formation d'UDPglcNAc marqué par rapport à l'UDPglc marqué signifierait une augmentation spécifique du flux vers la voie des hexosamines.

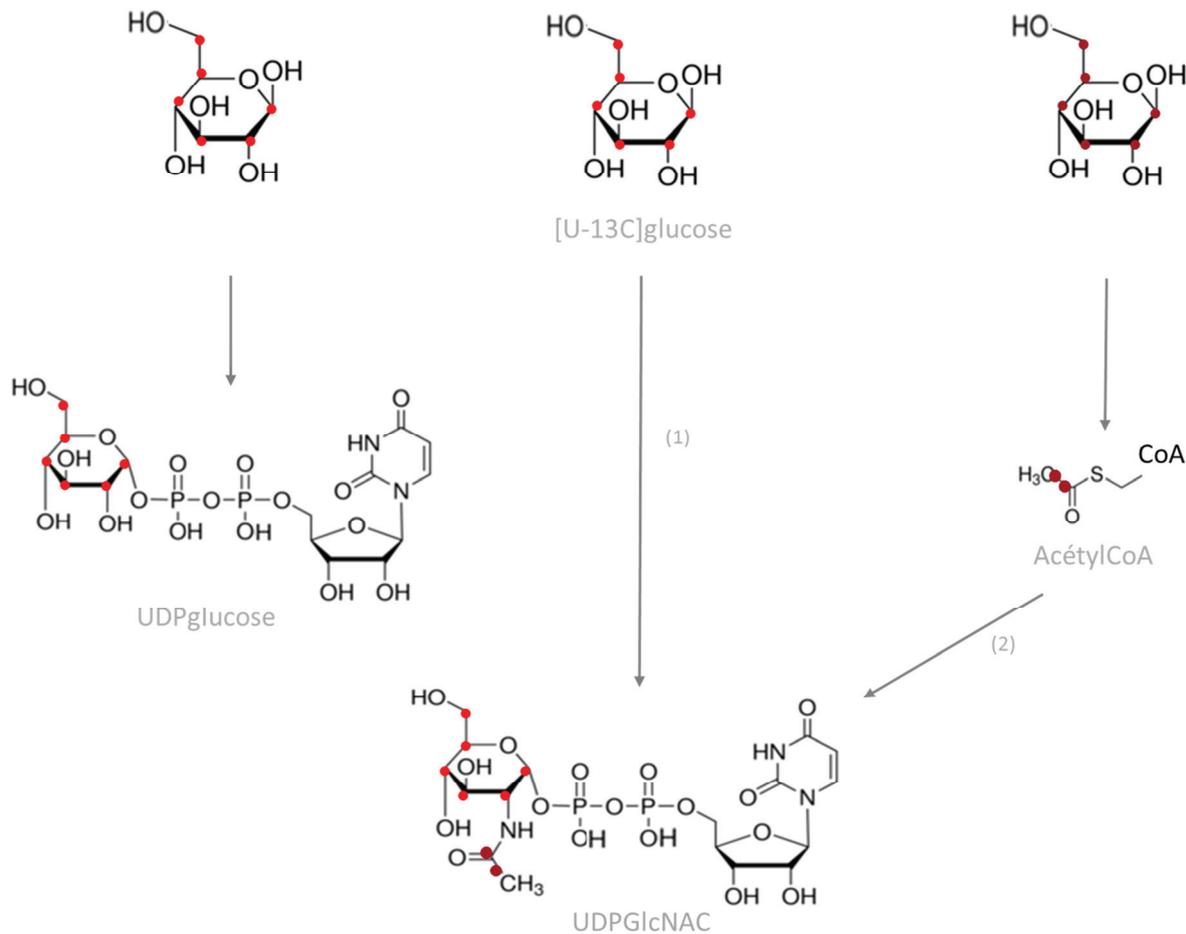


Figure 28. Formation de l'UDPglc et de l'UDPglcNAc à partir du glucose. Les carbones provenant du glucose marqué sont signalés par un point rouge.

Le glucose ajouté dans le milieu de culture des cellules présentait six ^{13}C ([U-13c]glucose). L'UDPglc formé présentera donc six ^{13}C (Figure 28), soit un décalage de masse de 6 par rapport à la molécule non marquée. Dans l'UDPglcNAc, le cycle pyrane provient systématiquement du squelette carboné du glucose (voie 1 de la Figure 28). Le groupement N-acétyl quant à lui peut être généré de façon non systématique par de l'acétylCoA dérivant lui-même du glucose marqué (voie 2 de la Figure 28). Il en découle des molécules d'UDPglcNAc marquées alternativement sur 6, 7 ou 8 atomes de carbone.

Les résultats ont montré :

- La formation d'UDPGlc marqué après incubation des cellules dans un milieu contenant du [U-¹³C]glucose
- La formation d'UDPGlcNAc marqué après incubation des cellules dans un milieu contenant du [U-¹³C]glucose. L'augmentation des réponses est surtout visible pour les molécules ayant un m/z égal à 614, 616, et 615 dans une moindre mesure, soit des décalages de masse de +6, +8 et +7 respectivement (Figure 29). Les valeurs rendues pour l'UDPGlcNAc marqué correspondent à la somme des surfaces des pics présentant les m/z 614, 615 et 616.

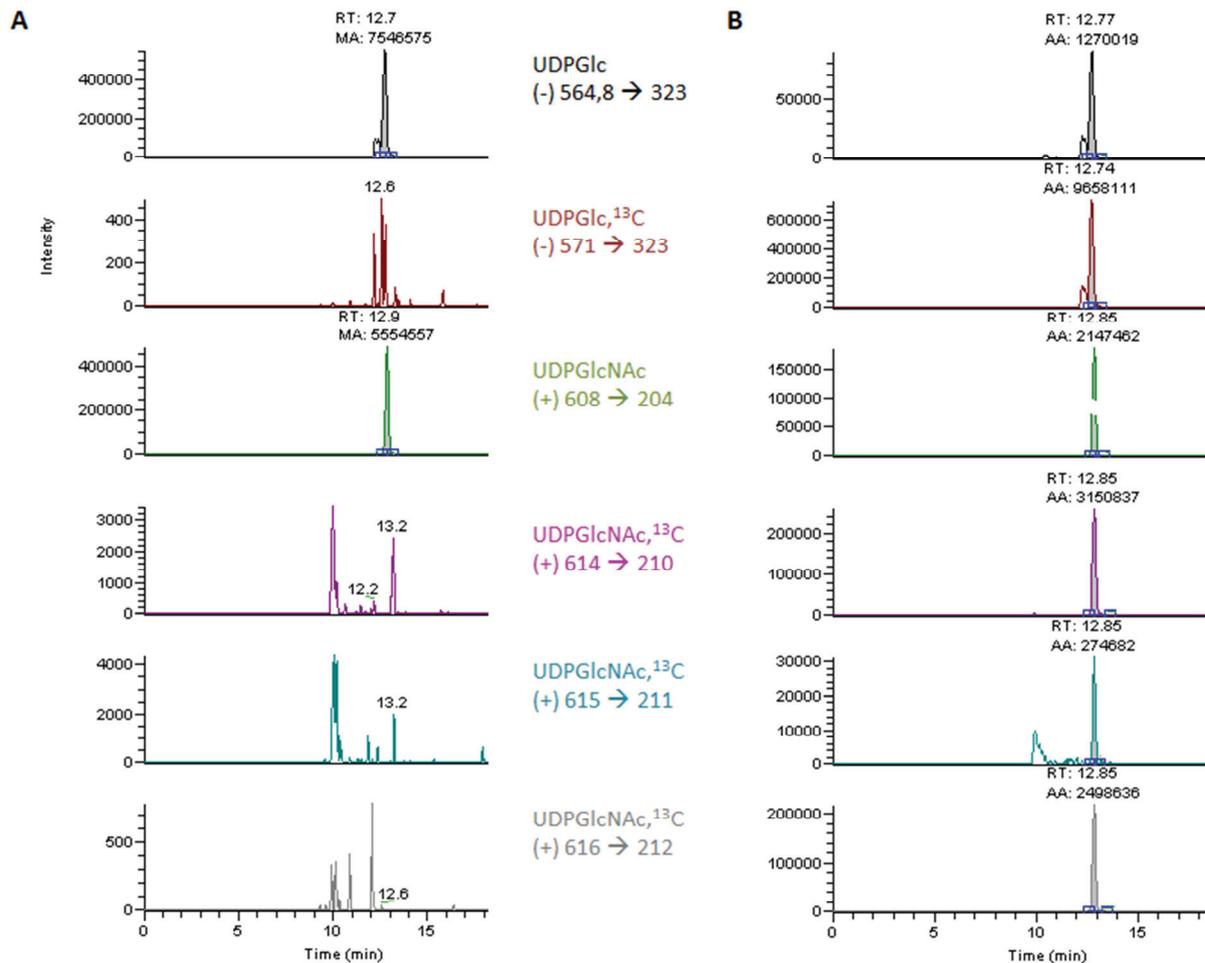


Figure 29. Chromatogrammes de l'UDPGlc et de l'UDPGlcNAc à T0 (A) et T2h (B) après incubation des cellules dans un milieu contenant du glucose ¹³C₆.

Une cinétique a été effectuée avec des dosages intracellulaires à différents temps : 0h, 30 min, 1h, 2h et 4h. Les résultats observés ont montré la formation d'UDPGlc et UDPGlcNAc marqués dès le temps 30 min après ajout du glucose marqué dans le milieu de culture. Parallèlement, une diminution de l'UDPGlc et de l'UDPGlcNAc non marqués a été observée. La synthèse d'UDPGlc et UDPGlcNAc marqués a stagné environ 2h après ajout du glucose marqué dans le milieu de culture, sans reprise de la synthèse des molécules non marquées (figure 30). L'étude de flux a donc montré que la voie des hexosamines est fonctionnelle.

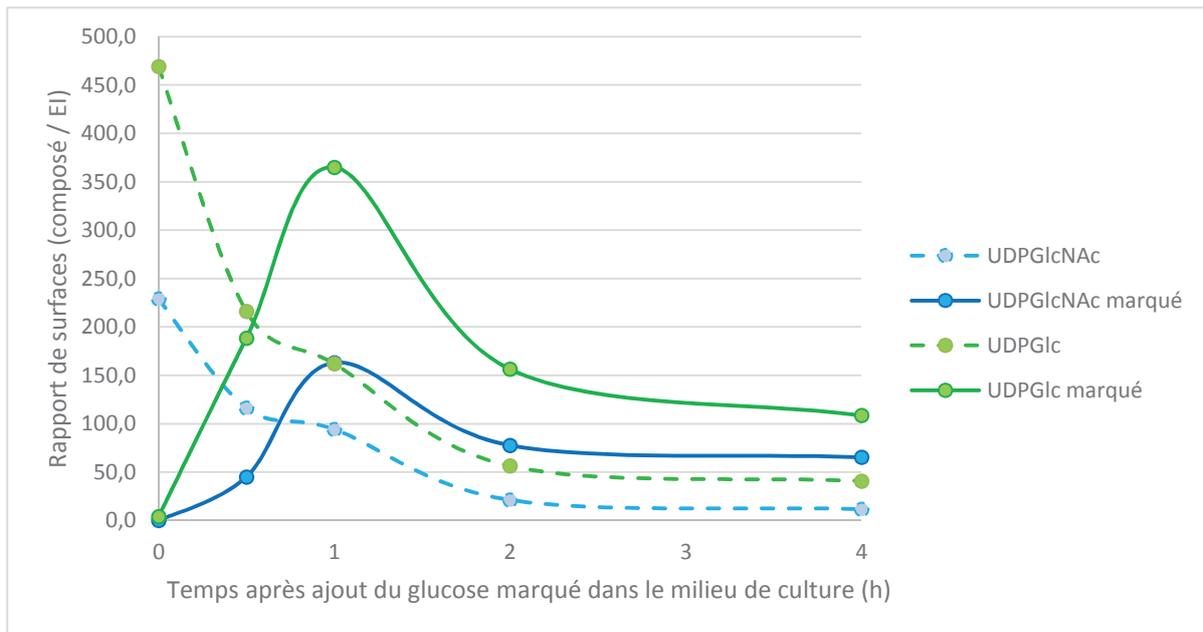


Figure 30. Cinétique de formation d'UDPGlc et UDPGlcNAc marqué après ajout de glucose marqué dans le milieu de culture. Exemple de la lignée cellulaire Twist1.

La comparaison des études de flux entre les cellules « contrôle » et les cellules présentant un marqueur de cellules souches révèle un flux plus important au niveau de l'UDPGlcNAc (donc la voie des hexosamines) dans les cellules présentant un marqueur de cellules souches. Le flux vers l'UDPGlc est identique dans les cellules « contrôle » et les cellules présentant un marqueur de cellules souches, montrant une que la majoration du flux est spécifiquement vers la voie des hexosamines.

Cohérence avec les autres résultats de l'étude

La juxtaposition de l'ensemble des résultats a permis de mettre en évidence le mécanisme permettant aux cellules présentant un marqueur de cellules souches de s'adapter à un oncogène (Figure 31).

- L'augmentation d'UDPGlcNAc dans les cellules présentant un marqueur de cellules souches entraîne une O-glycosylation de l'enzyme PFK1 (enzyme à l'entrée de la voie de la glycolyse). L'oxydation de PFK1 diminue l'activité de l'enzyme. Cela entraîne une réduction du flux de glucose vers la glycolyse et donc une redistribution en faveur de la voie des hexosamines. Ainsi, PFK1 contrôle l'entrée des carbones du fructose-6-phosphate dans la voie des hexosamines. La réduction de l'activité de PFK1 permet également une redistribution vers la voie des pentoses phosphate à partir du fructose-6-phosphate, d'où un maintien du pool nucléotidique dans les cellules présentant un marqueur de cellules souches.
- Il a également été montré dans ce projet que l'activité de la voie des hexosamines est contrôlée par le gène déterminant GFPT2. En réaction à un oncogène, les cellules présentant un marqueur de cellules souches réagissent en augmentant GFPT2 d'où l'augmentation d'activité de la voie des hexosamines observée grâce au dosage d'UDPGlcNAc.

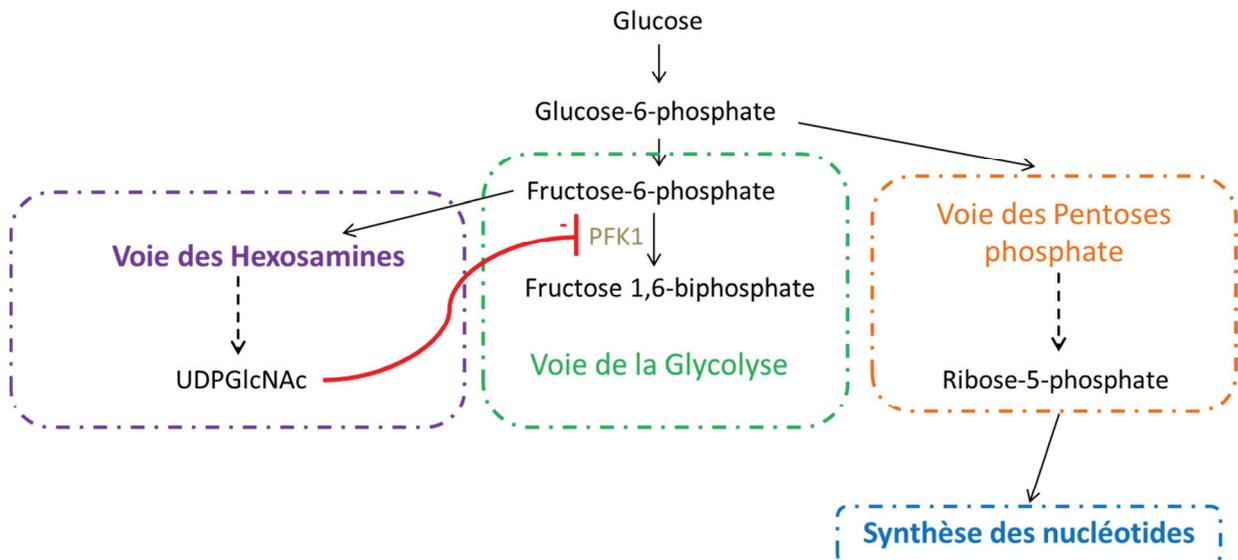


Figure 31. Mécanisme proposé pour expliquer l'adaptation des cellules présentant un marqueur de cellules souches en réponse à un oncogène.

Un article présentant l'ensemble des résultats est en phase de soumission dans la revue Nature : Metabolic hormones control stemness features of triple-negative breast cancer. E Nouri, L Payen-Gay, E Ruiz, C Machon, J Guitton, A Vigneron et al.

3.2.2. Régulation de la production d'adénosine extracellulaire

Collaboration : Dr C. Caux (INSERM U1052 – CNRS 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon)

3.2.2.1. Introduction – Objectifs

L'adénosine est considérée comme une molécule exerçant des activités pro-tumorales en induisant la croissance des cellules tumorales via ses récepteurs A1 et A3, en favorisant l'angiogénèse et en protégeant les cellules tumorales de l'apoptose. Elle agit aussi comme une molécule immunosuppressive, via ses récepteurs A2a et A2b, sur les différentes sous populations du système immunitaire en réduisant les éléments clés de la réponse immune et en favorisant la génération de cytokines suppressives (figure 32) (Spychala, 2000).

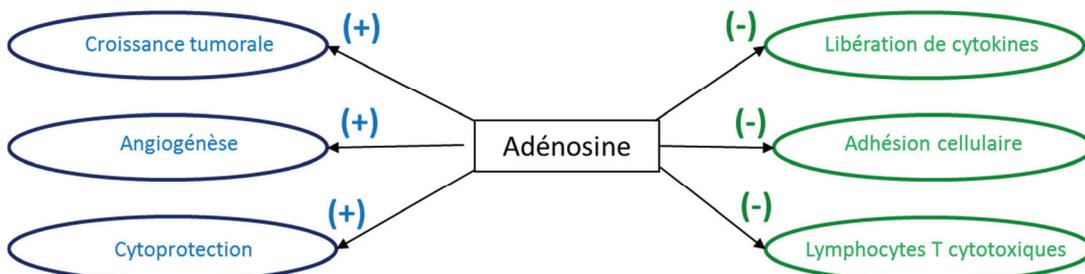


Figure 32. Effets pro-tumoraux (en bleu) et immunosuppresseurs (en vert) de l'adénosine (d'après (Spychala, 2000)).

L'adénosine est produite dans le milieu extracellulaire principalement par dégradation de l'ATP en AMP puis en adénosine (Figure 33).

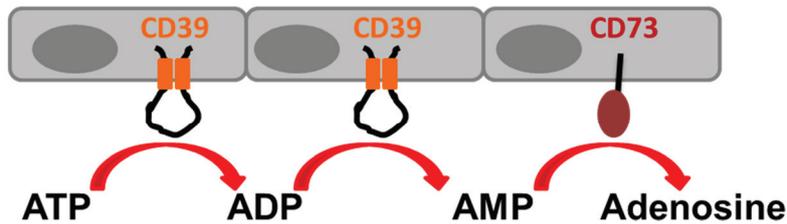


Figure 33. Production d'adénosine dans le milieu extracellulaire.

Il a été démontré chez la souris qu'une fraction des lymphocytes T $CD4^+$ appelée lymphocytes T régulateurs (Treg) co-expriment CD39 et CD73 à leur surface, ce qui leur permet de dégrader l'ATP extracellulaire en AMP puis en adénosine (Deaglio et al., 2007). Ce mécanisme est impliqué dans leur fonction suppressive. Chez l'homme, les lymphocytes Treg expriment CD39, mais seulement 1% d'entre eux expriment conjointement CD73 (Schuler et al., 2014). Schuler et al. ont montré la coopération des lymphocytes Treg $CD4^+CD39^+CD73^{neg}$ et des $CD4^+CD39^{neg}CD73^+$ en co-culture pour générer *in vitro* de l'adénosine par dégradation d'ATP extracellulaire.

Le projet de recherche avait pour objectif global de réduire la production d'adénosine extracellulaire à l'aide d'un agent exogène interférant avec la voie CD39/CD73. Une partie du travail a consisté à identifier et mieux décrire les cellules immunes exprimant CD73 en surface chez l'homme, et à étudier la fonction enzymatique de CD39 et CD73 à la surface des populations cellulaires d'intérêt

(Treg et T CD4⁺). Nous avons également étudié la coopération des populations cellulaires d'intérêt pour dégrader l'ATP en adénosine. Dans le cadre d'une collaboration, notre rôle était de développer une technique permettant le dosage d'ATP, AMP, adénosine et inosine extracellulaire dans un milieu de culture.

3.2.2.2. Dosages d'ATP, d'AMP, d'adénosine et d'inosine dans des milieux de culture

Afin d'étudier un modèle expérimental reproduisant le catabolisme de l'ATP en AMP puis en adénosine, nous avons dosé l'ATP, l'AMP, l'adénosine et l'inosine dans des milieux de culture.

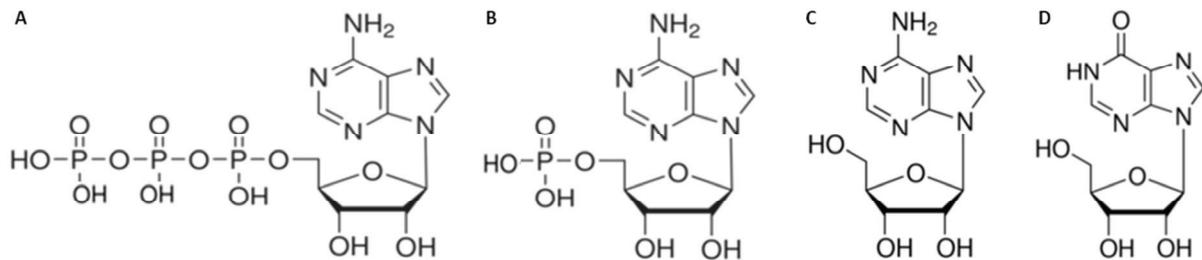


Figure 34. Formules développées de l'ATP (A), l'AMP (B), l'adénosine (C) et l'inosine (D).

Les lymphocytes Treg CD4⁺CD39⁺CD73^{neg}, T CD4⁺CD39^{neg}CD73⁺ et T CD4⁺CD39^{neg}CD73^{neg} ont été isolées de sang périphérique humain par cytométrie en flux, puis cultivées en milieu RPMI-1640 et incubés en présence d'ATP ou d'AMP à la concentration de 37,5 μM. L'APCP (50 μM) et l'ARL67156 (250 μM), inhibiteurs de CD73 et CD39 respectivement, ont été ajoutés lors de certains essais.

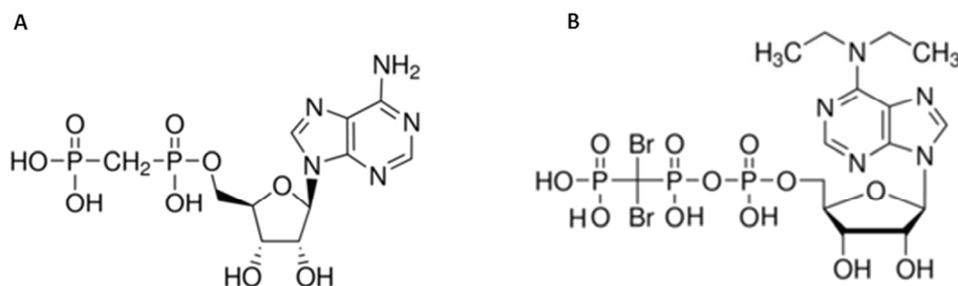


Figure 35. Formules développées de l'APCP (A) et de l'ARL67156 (B).

La méthode analytique développée pour l'analyse des nucléotides permet aussi de doser l'adénosine et l'inosine. Néanmoins, deux difficultés se sont présentées à nous :

- La nature de la matrice : les milieux de culture sont riches en glucose et divers sels non volatils. La composition complète du milieu de culture RPMI1640 est présentée en annexe 8.
- La présence d'APCP et d'ARL67156 à des concentrations importantes (> 50 μM) dans les échantillons. L'extraction en ligne ne permettait pas l'élimination de ces deux composés, ils étaient donc entraînés sur la colonne Hypercarb.

Nous avons ainsi choisi de développer une méthode d'extraction hors ligne dans le but i) d'éliminer les principaux composants du milieu de culture, et ii) d'éliminer les inhibiteurs. Cette dernière tâche s'annonçait difficile pour l'APCP de par sa proximité de structure avec l'ADP (Figure 35 et Annexe 5).

Extraction hors ligne

Un premier essai a été réalisé sur des cartouches Oasis WAX (60 mg ; 3 cc) en appliquant la méthode développée précédemment au laboratoire (Cohen et al., 2009).

Conditionnement :	- 2 mL de méthanol - 2 ml d'acétate d'ammonium 50 mM ; pH 4,5
Dépôt :	- 3 ml de milieu de culture dilué contenant ATP, AMP, Adénosine, Inosine, APCP et ARL
Lavage :	- 2 ml d'acétate d'ammonium 50 mM ; pH 4,5 - 2 ml d'eau
Elution :	- 2 ml de méthanol/eau/hydroxyde d'ammonium (80/15/5)

L'acétate étant très défavorable pour la colonne WAX on-line, un lavage à base d'eau a été ajouté afin de bien éliminer l'acétate d'ammonium.

Avec ce protocole, tous les composés d'intérêt ainsi que les inhibiteurs ont été élués ensemble.

Pour les essais suivants, nous avons cherché à nous rapprocher des conditions utilisées sur la WAX on-line.

Conditionnement :	- 2 ml de méthanol - 2 ml d'eau
Dépôt :	- 1 ml de milieu de culture dilué contenant ATP, AMP, Adénosine, Inosine, APCP et ARL
Lavage :	- 1 ml d'eau
Elution :	- test de différentes solutions contenant NH ₄ OH 0,25% pH 10, eau et acétonitrile

Les rendements d'extraction d'ATP, AMP, adénosine, inosine, APCP et ARL67156 ont été déterminés pour chaque étape et chaque solution d'élution testée (Tableau 19).

Rendement	ATP	AMP	Adénosine	Inosine	APCP	ARL67156
Dépôt 1 ml	0	0	0	1	0	0
Lavage Eau 1 ml	0	0	0	5	0	0
Elution A - 10% NH ₄ OH 0,25% pH 10 - 70% eau - 20% ACN 2 x 1 ml	17	78	32	43	102	0

Rendement	ATP	AMP	Adénosine	Inosine	APCP	ARL67156
Elution B - 15% NH ₄ OH 0,25% pH 10 - 65% eau - 20% ACN 2 x 1 ml	20	96	66	65	120	0
Elution C - 30% NH ₄ OH 0,25% pH 10 - 50% eau - 20% ACN 2 x 1 ml	98	89	63	62	85	0
Elution C' - 30% NH ₄ OH 0,25% pH 10 - 50% eau - 20% ACN 3 x 1 ml	115	90	63	62	87	1

Tableau 19. Rendements d'extraction d'ATP, AMP, adénosine, inosine, APCP et ARL67156 pour différents pourcentages de NH₄OH 0,25% pH 10 dans la solution d'élution.

Pour éluer l'ATP, il faut augmenter le pourcentage de NH₄OH 0,25% pH 10 dans la solution d'élution. L'ARL67156 reste fixé sur la phase stationnaire de la cartouche WAX. En revanche, comme attendu, l'APCP est élué avec les nucléotides d'intérêt.

⇒ Le pourcentage de NH₄OH 0,25% pH 10 choisi dans la solution d'élution est de 30%.

Ensuite nous avons testé différentes proportions d'acétonitrile dans la solution d'élution, en fixant le pourcentage de NH₄OH 0,25% pH10 dans la solution d'élution à 30%. L'objectif est de diminuer au maximum la proportion de phase aqueuse dans la solution d'élution afin de limiter le temps d'évaporation entre l'extraction et l'analyse par LC-MS/MS. Nous avons fait varier le pourcentage d'acétonitrile dans la solution d'élution de 20 à 50%. Jusqu'à 40% d'acétonitrile, il n'y a eu aucune incidence sur les rendements d'extraction, puis une forte diminution des rendements de l'adénosine et de l'ATP (rendement divisé par 2 pour l'ATP) avec la solution d'élution contenant 50% d'acétonitrile. Le pourcentage d'acétonitrile retenu est donc de 40%.

Protocole d'extraction appliqué en hors ligne sur cartouches Oasis WAX 60 mg ; 3 cc

Conditionnement : - 2 ml de méthanol
- 2 ml d'eau

Dépôt : - 1 ml d'échantillon

Lavage : - 1 ml d'eau

Elution : - 3 x 1 ml de la solution NH₄OH 0,25% pH10 / eau / acétonitrile 30/30/40

Evaporation des éluats.

Ce protocole permet d'éliminer l'ARL67156 (qui reste fixé à la phase stationnaire). Les rendements d'extraction d'adénosine et d'inosine d'environ 60% sont « compensés » par une forte réponse de ces deux nucléosides en spectrométrie de masse.

Analyse des échantillons

Conditions d'expérience de dégradation de l'ATP et de l'AMP

Les puits d'incubation contenaient 50 000 cellules de chaque type (Treg CD4⁺CD39⁺CD73^{neg}, T CD4⁺CD39^{neg}CD73⁺ et T CD4⁺CD39^{neg}CD73^{neg}) par puits dans 200 µl de milieu de culture RPMI1640. Afin de s'affranchir de l'efflux cellulaire d'ATP, AMP, adénosine et inosine, nous avons choisi d'utiliser de l'ATP_{13C,15N} et de l'AMP_{13C,15N} pour l'étude de la dégradation en adénosine. Les cellules ont été incubées 30 min avec l'inhibiteur (APCP ou ARL) puis 2 h avec le nucléotide ajouté au milieu de culture à la concentration de 37,5 µM.

Les surnageants ont ensuite été récupérés puis chauffés 5 min à 65°C afin d'inhiber toute activité enzymatique.

	Treg CD39 ⁺ CD73 ^{neg}		T CD4 ⁺ CD39 ^{neg} CD73 ^{neg}		T CD4 ⁺ CD39 ^{neg} CD73 ⁺		Pas de cellules		Treg CD39 ⁺ + T CD4 ⁺ CD73 ^{neg}		Treg CD39 ⁺ + T CD4 ⁺ CD73 ⁺	
Milieu sans cellule												
ATP _{13C,15N} 37,5 µM												
AMP _{13C,15N} 37,5 µM												
ATP _{13C,15N} 37,5 µM + ARL67156 250 µM												
AMP _{13C,15N} 37,5 µM + APCP 50µM												
ATP _{13C,15N} 37,5 µM + ARL67156 + APCP												

Tableau 20. Conditions expérimentales appliquées pour l'étude de la dégradation d'ATP en AMP, d'ATP ou AMP en adénosine et inosine.

Les conditions non évaluées car sans fondement scientifique sont grisées. Toutes les autres conditions (rose) ont été évaluées.

Dans certains puits, les cellules CD39⁺CD73^{neg} et les cellules CD39^{neg}CD73⁺ ont été incubées séparément afin de vérifier la fonctionnalité de CD39 et CD73. Toutes les conditions ont été testées en duplicats.

Analyse par LC-MS/MS

Des gammes d'étalonnage ont été réalisées en rajoutant de l'ATP_{13C}, AMP_{15N}, adénosine_{13C} et inosine_{15N} dans les échantillons avant la phase d'extraction SPE hors ligne. Ces gammes sont adaptées à une prise d'essai de 50 µl de milieu de culture.

		ATP _{13C}	AMP _{15N}	Adénosine _{13C}	Inosine _{15N}
pmol injectés	G6	500	250	37,5	12,5
	G5	250	125	18,8	6,3
	G4	125	62,5	9,4	3,1
	G3	62,5	31,3	4,7	1,6
	G2	31,3	15,6	2,3	0,8
	G1	15,6	7,8	1,2	0,4
µmol/l de milieu de culture	G6	250	125	18,8	6,3
	G5	125	62,5	9,4	3,2
	G4	62,5	31,3	4,7	1,6
	G3	31,3	15,7	2,3	0,8
	G2	15,6	7,8	1,2	0,4
	G1	7,8	3,9	0,6	0,2

Tableau 21. Gammes d'étalonnage réalisées en vue du dosage d'ATP, AMP, adénosine et inosine dans les milieux de culture. Les valeurs sont exprimées en pmol injectés et en µmol/l de milieu de culture.

Les molécules suivies en spectrométrie de masse sont présentées dans le tableau ci-dessous. Elles regroupent :

- les molécules ajoutées au milieu de culture et celles formées par dégradation extracellulaire : marquage ¹³C, ¹⁵N
- les molécules utilisées pour établir les gammes d'étalonnage (= standards) : marquage ¹³C ou ¹⁵N
- les étalons internes

Rôle	Molécule	Temps de rétention (min)	Transition (E collision)
Echantillon	ATP _{13C,15N}	15,0	523 → 146 (32)
	AMP _{13C,15N}	14,7	363 → 146 (25)
	Adenosine _{13C,15N}	20,7	283 → 146 (20)
	Inosine _{13C,15N}	16,6	284 → 147 (20)
Standards	ATP _{13C}	15,0	518 → 141 (32)
	AMP _{15N}	14,7	353 → 141 (25)
	Adenosine _{13C}	20,7	273 → 136 (20)
	Inosine _{15N}	16,6	273 → 141 (20)
Étalon interne	ATP _{15N}	15,0	513 → 141 (32)
	GMP _{13C,15N}	14,3	379 → 162 (25)

Tableau 22. Transitions respectives des molécules suivies en spectrométrie de masse.

L'ATP_{15N} est l'étalon interne de l'ATP. Du fait de l'absence de disponibilité d'AMP_{13C} dans le commerce, nous n'avons pas été en mesure d'utiliser ce dernier comme étalon interne. C'est pourquoi, nous avons choisi le GMP_{13C,15N} comme étalon interne pour l'AMP, l'adénosine et l'inosine.

Résultats

✓ Vérification de la fonctionnalité de CD39 et CD73 (culture séparée des cellules CD39⁺CD73^{neg} et des cellules CD39^{neg}CD73⁺)

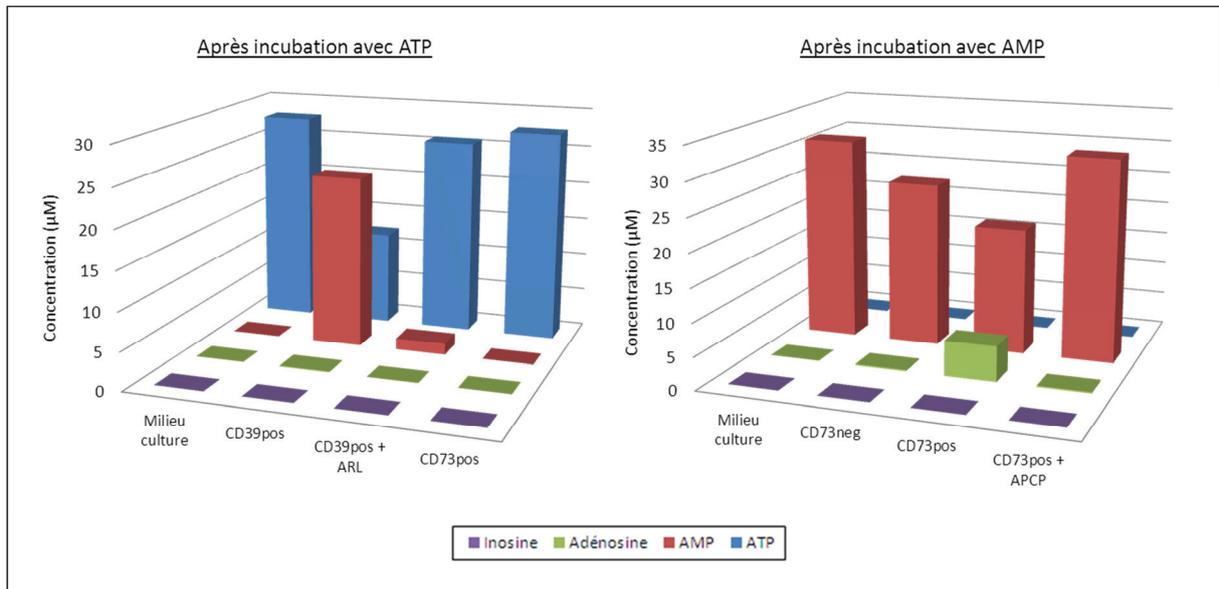


Figure 36. Concentrations en ATP, AMP, adénosine et inosine dans les milieux de culture après incubation avec ATP et avec AMP.

D'après la figure 36, les dosages d'ATP, AMP, adénosine et inosine dans les milieux de culture ont montré que :

- lorsque les cellules expriment CD39, on a une transformation ATP → AMP, qui est inhibée en présence d'ARL.
- lorsque les cellules expriment CD73, on n'observe pas de transformation ATP → AMP.
- lorsque les cellules expriment CD73, on observe une transformation AMP → Adénosine, qui est inhibée par APCP
- nous n'observons pas la formation d'inosine dans les conditions analysées.

L'ensemble de ces résultats démontrent que les enzymes CD39 et CD73 exprimées par les différentes populations sont fonctionnelles.

✓ Co-culture des cellules CD39⁺CD73^{neg} et des cellules CD39^{neg}CD73⁺

Lorsque les cellules CD39⁺CD73^{neg} et CD39^{neg}CD73⁺ sont cultivées dans le même puits, une dégradation de l'ATP marqué en adénosine marquée a été mise en évidence (Figure 37), sans formation d'inosine.

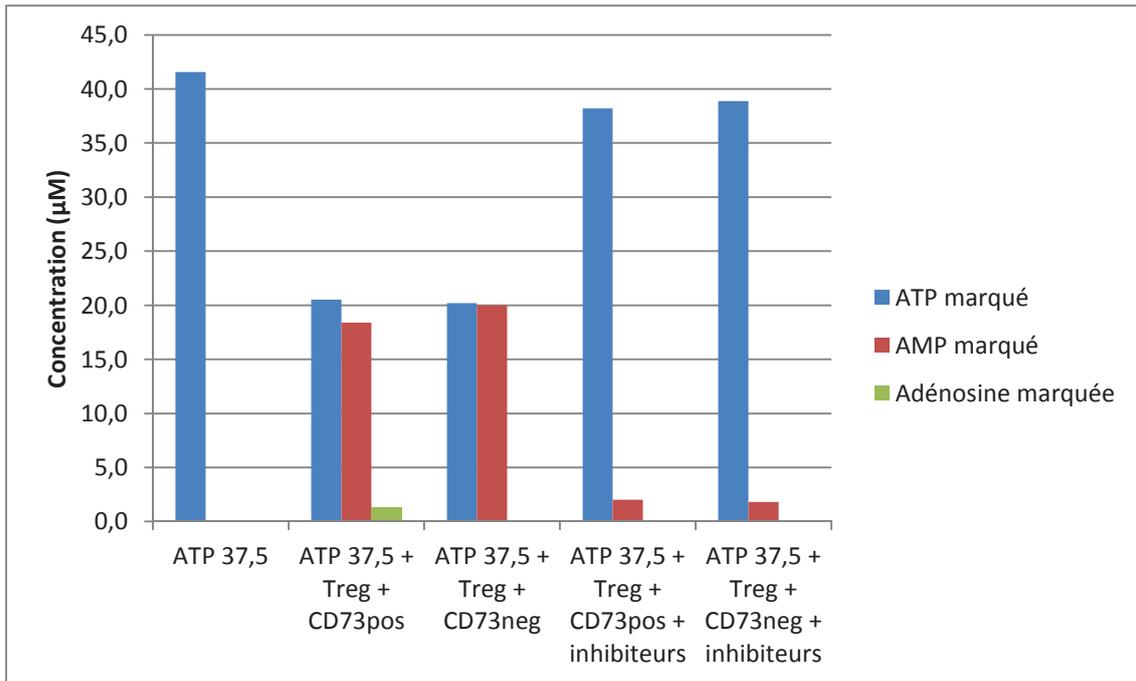


Figure 37. Concentrations en ATP, AMP et adénosine dans les milieux de culture après incubation avec ATP.

Ces résultats montrent que le « schéma » de dégradation de l'ATP extracellulaire en adénosine *via* l'AMP, à la suite de l'action conjointe de CD39 et CD73 sur les deux types cellulaires CD39⁺CD73^{neg} (Treg) et CD39^{neg}CD73⁺ (T CD4⁺ conventionnels) qui coopèrent est vérifié. Cela valide le modèle expérimental *in vitro* qui permettra d'étudier les effets d'agents modulant la fonction de CD73.

✓ Analyse de cellules CD39⁺CD73⁻ provenant de tumeurs mammaires

Une comparaison de la génération d'AMP à partir d'ATP a été réalisée entre des cellules CD39⁺CD73^{neg} provenant de sang de donneurs sains et de tumeurs mammaires. L'analyse par cytométrie de flux a montré une intensité d'expression de CD39 plus importante dans les lymphocytes provenant de la tumeur mammaire par rapport à ceux provenant de sang périphérique d'un donneur sain (Figure 38).

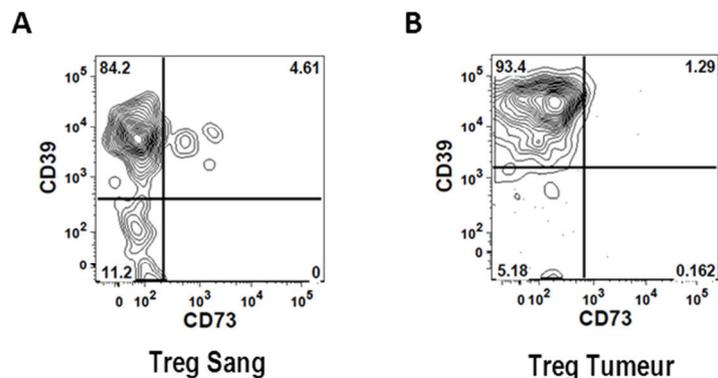


Figure 38. Intensité d'expression de lymphocytes exprimant CD39 purifiés à partir de sang périphérique (A) et d'une tumeur mammaire (B). L'intensité a été mesurée par cytométrie en flux.

A nombre équivalent de cellules (50 000 par puits), les lymphocytes CD39⁺CD73^{neg} provenant d'une tumeur mammaire ont généré une quantité d'AMP à partir de 37,5 μM d'ATP plus importante que les lymphocytes CD39⁺CD73^{neg} provenant de sang de donneurs sains. (Figure 39)

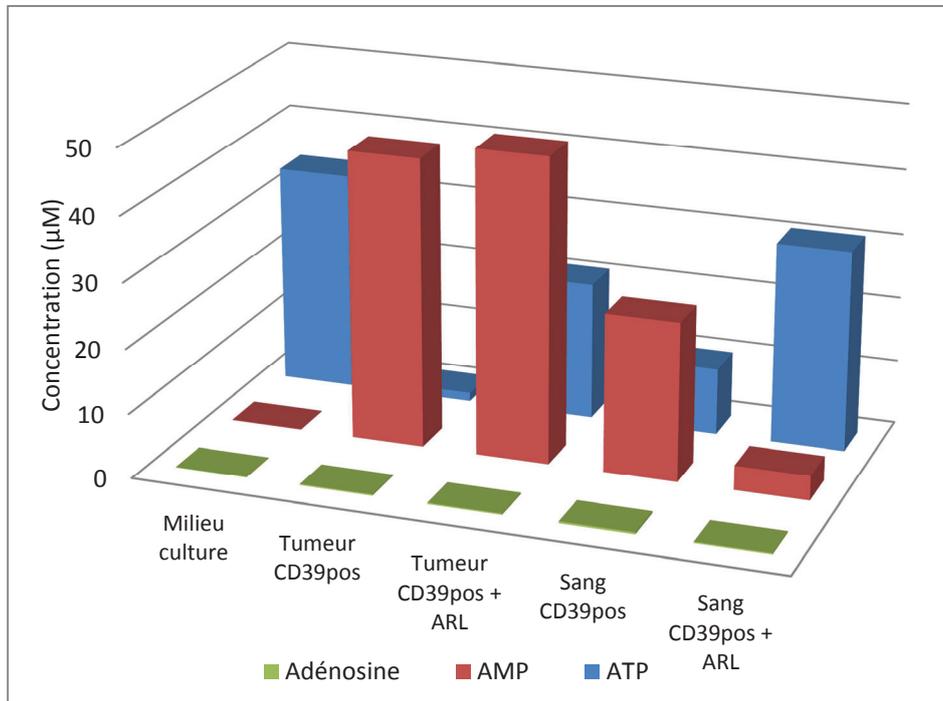


Figure 39. Concentrations en ATP, AMP et adénosine dans les milieux de culture après incubation avec ATP des lymphocytes Treg provenant d'une tumeur mammaire ou de sang périphérique.

Les résultats de la capacité des lymphocytes CD39⁺CD73^{neg} provenant d'une tumeur mammaire à dégrader l'ATP extracellulaire sont corrélés avec ceux de la cytométrie en flux qui montraient une intensité d'expression plus forte comparativement aux lymphocytes CD39⁺CD73^{neg} provenant du sang périphérique.

La caractérisation des lymphocytes CD39⁻CD73^{pos} ainsi que la reproduction *in vitro* de la coopération cellulaire entre CD39⁺CD73^{neg} et CD39⁻CD73^{pos} aboutissant à la formation d'adénosine constituent une étape dans le projet dont l'objectif est la réduction de la production d'adénosine intracellulaire par un agent exogène.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était de disposer d'une méthode analytique validée permettant le dosage des nucléotides endogènes (formes mono-, di- et triphosphate) dans diverses matrices biologiques. Une fois validée, cette méthode a permis la réalisation d'une étude de l'ensemble des étapes pré-analytiques. Au terme de ce projet, nous proposons une méthode de quantification des nucléotides endogènes par LC-MS/MS et une stratégie de préparation d'échantillons adaptée aux cellules en culture.

La méthode analytique développée a répondu aux objectifs initiaux : couplage extraction en ligne-LC-MS/MS, absence d'agent de paire d'ions dans la phase mobile pour obtenir une meilleure répétabilité, validation de la méthode pour les nucléosides monophosphate et triphosphate, intégration facile dans le planning des analyses réalisées sur la LC-MS/MS par ailleurs. La validation de la méthode pour les nucléosides diphosphate sera envisageable quand des nucléosides diphosphate marqués seront disponibles dans le commerce. L'extraction sur colonne WAX et la séparation des nucléotides sur colonne Hypercarb sont réalisées en 20 min. L'ensemble de la méthode, en comptant la ré-équilibrage des colonnes, dure 37 min. Grâce à l'utilisation d'un triple quadripôle et une ionisation en mode positif, les nucléotides endogènes sont identifiés sans équivoque, y compris ceux possédant la même masse molaire.

L'étude de l'influence des paramètres pré-analytiques sur le dosage intracellulaire des nucléotides est innovante car elle a comparé plusieurs lignées cellulaires, adhérentes ou en suspension, soumises aux mêmes conditions de préparation. L'utilisation d'une méthodologie à base de plans d'expériences a permis d'optimiser le nombre d'expériences réalisées et leur interprétation. Nous avons montré que les conditions pré-analytiques optimales dépendent de la lignée cellulaire. Cela apporte une donnée importante en vue de la maîtrise de la préparation des échantillons pour le dosage des nucléotides et de l'interprétation des résultats de dosage. L'interprétation ne devra pas se faire en comparant les quantités absolues mais en mesurant les variations relatives des pools nucléotidiques en fonction de conditions expérimentales différentes.

Les performances analytiques de la méthode ont permis de développer de multiples collaborations. La mise en application de la méthode a ainsi confirmé sa validité puisqu'elle a fourni des résultats originaux qui ont renforcé ou corroboré les données obtenues avec d'autres approches (biologie moléculaire par exemple). Grâce à cette méthode, nous avons pu étudier l'implication des pools nucléotidiques dans le processus de tumorigénèse. Certaines applications ne se sont pas restreintes uniquement aux nucléotides, mais ont exploré d'autres composés formés à partir des nucléotides ou d'autres voies métaboliques.

Nous allons poursuivre notre travail sur les nucléotides en nous focalisant plus particulièrement sur l'étude des nucléosides et nucléosides modifiés. En effet, il a été montré que les nucléosides modifiés pouvaient représenter des marqueurs diagnostic et pronostic de cancer (Feng et al., 2005; Helleday, 2015; Yu-Rui Zhang, 2014). Cela permettra d'aborder un versant clinique, lié à nos fonctions hospitalières.

Le métabolisme nucléotidique ne représente qu'un des métabolismes cellulaires. Une étude simultanée d'autres voies métaboliques est donc indispensable pour la compréhension des mécanismes aboutissant à la reprogrammation cellulaire des cellules cancéreuses, permettant ainsi l'identification de cibles thérapeutiques potentielles. L'analyse de nombreux métabolites apporterait également des éléments pour l'évaluation des effets toxiques intracellulaires d'agents exogènes.

Pour poursuivre ces développements, nous pourrions nous appuyer sur un spectromètre de masse à haute résolution (acquisition prévue en 2016). Il nous apportera une meilleure sensibilité et une plus grande sélectivité que notre système quadripolaire actuel et permettra l'analyse simultanée d'un grand nombre de composés.

Nous continuerons également notre travail sur la phase pré-analytique avec, dans le cadre d'une collaboration, le développement de MIP. Grâce à ce système, nous espérons pouvoir extraire des composés présents en faible quantité dans des matrices biologiques afin de faciliter leur analyse. Ce type de préparation d'échantillons pourrait s'appliquer à la recherche de nucléotides et/ou nucléosides modifiés.

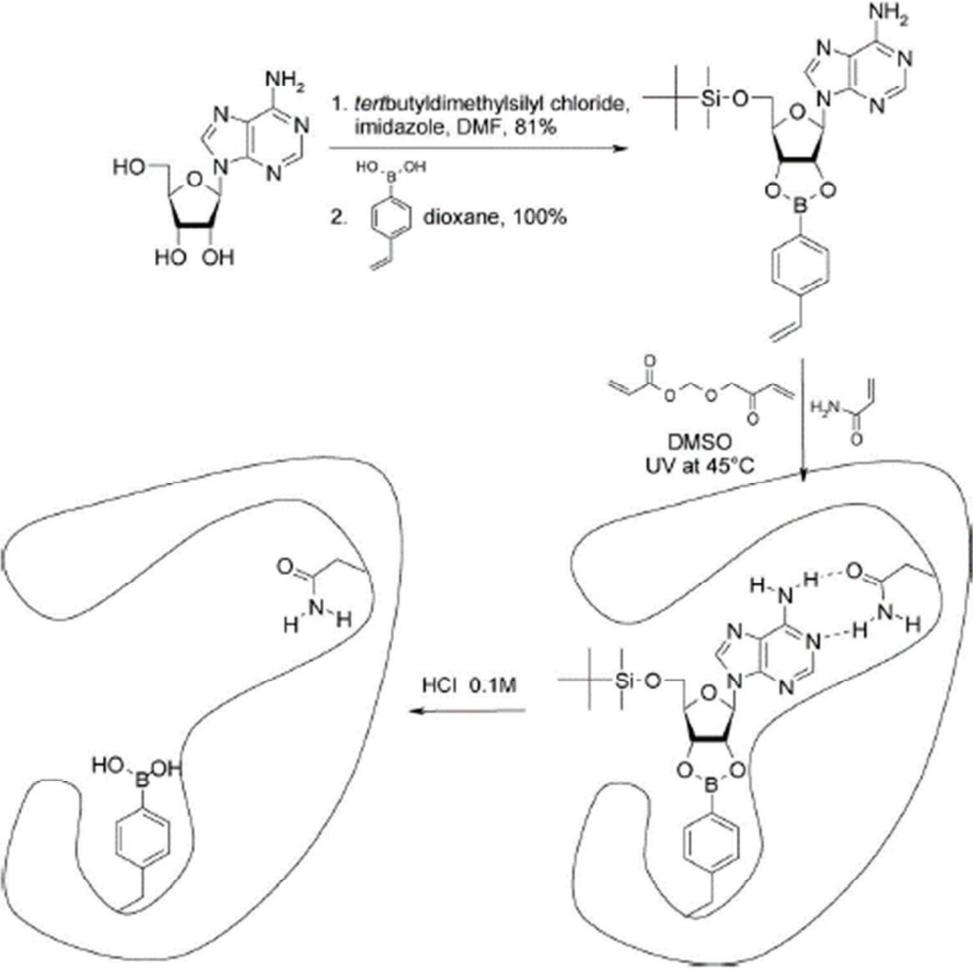
Grâce à nos fonctions hospitalières et nos collaborations, nous espérons atteindre l'objectif ultime qui est l'intégration de ces analyses dans le diagnostic et le suivi thérapeutique en oncologie.

ANNEXES

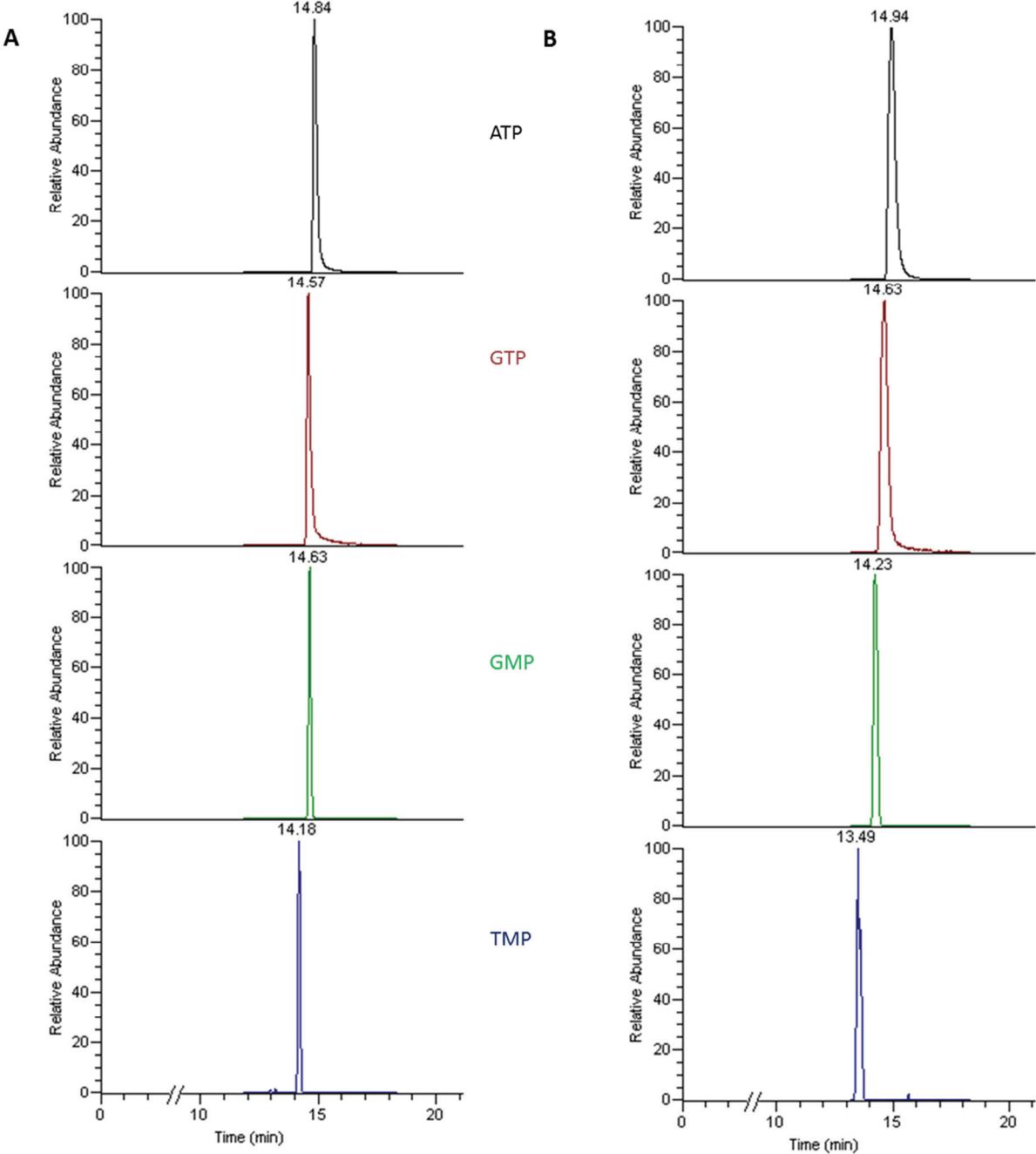
Annexe 1. Quantités de nucléosides triphosphate (en pmol/million de cellules) au sein de la lignée cellulaire L1210. Les résultats sont issus de différentes cultures (Cohen et al., 2009).

Experiments	<i>n</i>	ATP	CTP	GTP	UTP	dATP	dCTP	dGTP	TTP
L1210 (1)	17	4910 ± 571	211 ± 7	461 ± 11	827 ± 20	8.85 ± 0.56	8.84 ± 0.55	3.54 ± 0.48	15.9 ± 1.0
L1210 (2)	17	4130 ± 297	145 ± 8	423 ± 19	603 ± 26	9.91 ± 0.76	6.85 ± 0.43	5.35 ± 0.67	12.1 ± 1.0
L1210 (3)	22	4730 ± 313	193 ± 11	514 ± 17	489 ± 36	7.23 ± 0.32	5.10 ± 0.37	2.29 ± 0.14	8.30 ± 0.50
L1210 (4)	17	2290 ± 119	114 ± 6	272 ± 26	306 ± 14	2.87 ± 0.17	3.25 ± 0.13	1.33 ± 0.09	3.10 ± 0.20
L1210 (5)	17	2930 ± 169	99.0 ± 7.0	287 ± 17	319 ± 22	3.76 ± 0.25	2.21 ± 0.21	1.41 ± 0.20	5.90 ± 0.30

Annexe 2. Stratégie de préparation du MIP développée par Breton et al. pour l'extraction de l'AMP en solution aqueuse (Breton et al., 2008).



Annexe 3. Comparaison des chromatogrammes provenant d'une colonne neuve (A) et de la même colonne après 800 injections (B).



Annexe 4. Poster présenté au 16th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man (Juin 2015, New-York).



Demonstration of the importance of sample preparation for the study of endogenous nucleotides in cell cultures



Christelle Machon^{1,2}, Claire Bordes³, Emeline Cros-Perrial⁴, Charles Dumontet⁴, Pierre Lanteri³, Jérôme Guitton^{1,2} & Lars Petter Jordheim^{2,4}

¹Biochemistry Laboratory, Centre de Biologie Sud, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

²ISPB – Faculty of Pharmacy, University of Lyon, Lyon, France

³Institute of Analytical Sciences, UMR 5280 CNRS, University of Lyon, Villeurbanne, France

⁴CRCL, INSERM U1052, CNRS UMR 5286, University of Lyon, Lyon, France

email address : christelle.machon@chu-lyon.fr

Background

- ✓ Nucleotides are essential molecules in living organisms, and are involved in many functions in intracellular metabolism: components of nucleic acids, energy metabolism, second messengers, enzymatic co-factors.
- ✓ The study of endogenous nucleotides has become of great interest in many fields such as biochemistry, pharmacology, microbiology, genetic...
- ✓ Literature reveals a high heterogeneity of pre-analytical workflow for the quantification of intracellular nucleotides.
- ✓ Aims of the study: 1/ determination of the impact of various pre-analytical conditions on levels of nucleotides in NCI-H292 cells.
2/ improvement of pre-analytical steps for the quantification of nucleotides in NCI-H292 cells.

Methods

- ✓ NCI-H292 cells (adherent cells)
- ✓ Designs of experiments (DOE): comparison of 5 factors involved in pre-analytical workflow of adherent cells
- ✓ Analysis of nucleotides by on-line extraction coupled with LC-MS/MS analysis
- ✓ Quantification of a panel of 10 nucleoside mono-, di- and triphosphates

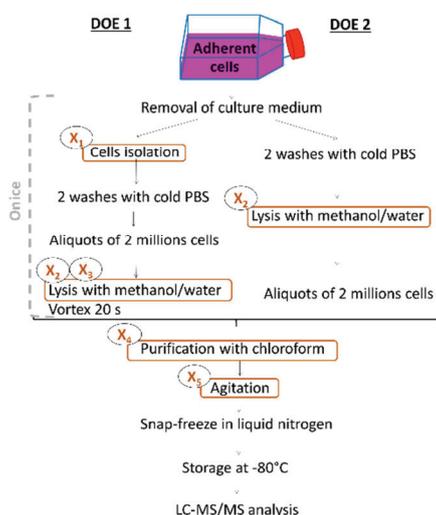


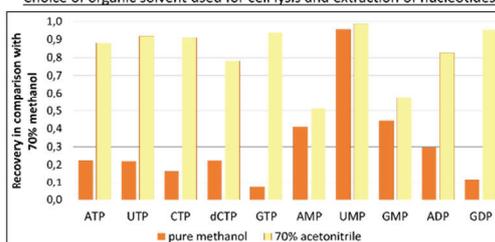
Figure 1. Workflows used for designs of experiments

Factors	DOE 1		DOE 2	
	Coded levels		Coded levels	
	-1	+1	-1	+1
X ₁ Cells recovery	Scraping	Trypsinization	N.A	N.A
X ₂ Percentage of methanol	70	80	70	80
X ₃ Volume of methanol (mL)	1.5	3	N.A	N.A
X ₄ Volume of chloroform (mL)	0	3	0	3
X ₅ Stirring time (min)	5	30	5	30

Table 1. Experimental factors (X_i) and levels involved in each DOE. N.A: not applied

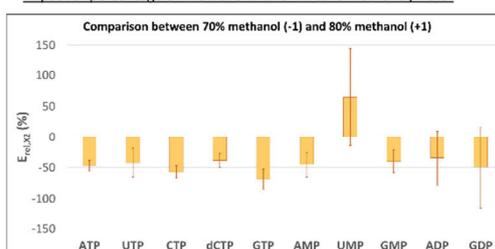
Results

- ✓ Choice of organic solvent used for cell lysis and extraction of nucleotides



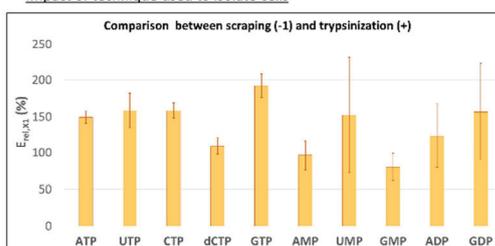
⇒ The mixture methanol/water was selected as lysis and extraction solvent.

- ✓ Impact of percentage of methanol in the mixture methanol/water



⇒ The percentage 70% methanol in water is favored for analysis of nucleoside triphosphates.

- ✓ Impact of technique used to isolate cells



⇒ Scraping cells must be avoided: high decrease of levels of nucleotides.
⇒ Trypsinization or lysis directly in the flask must be preferred.

- ✓ Impact of other factors tested

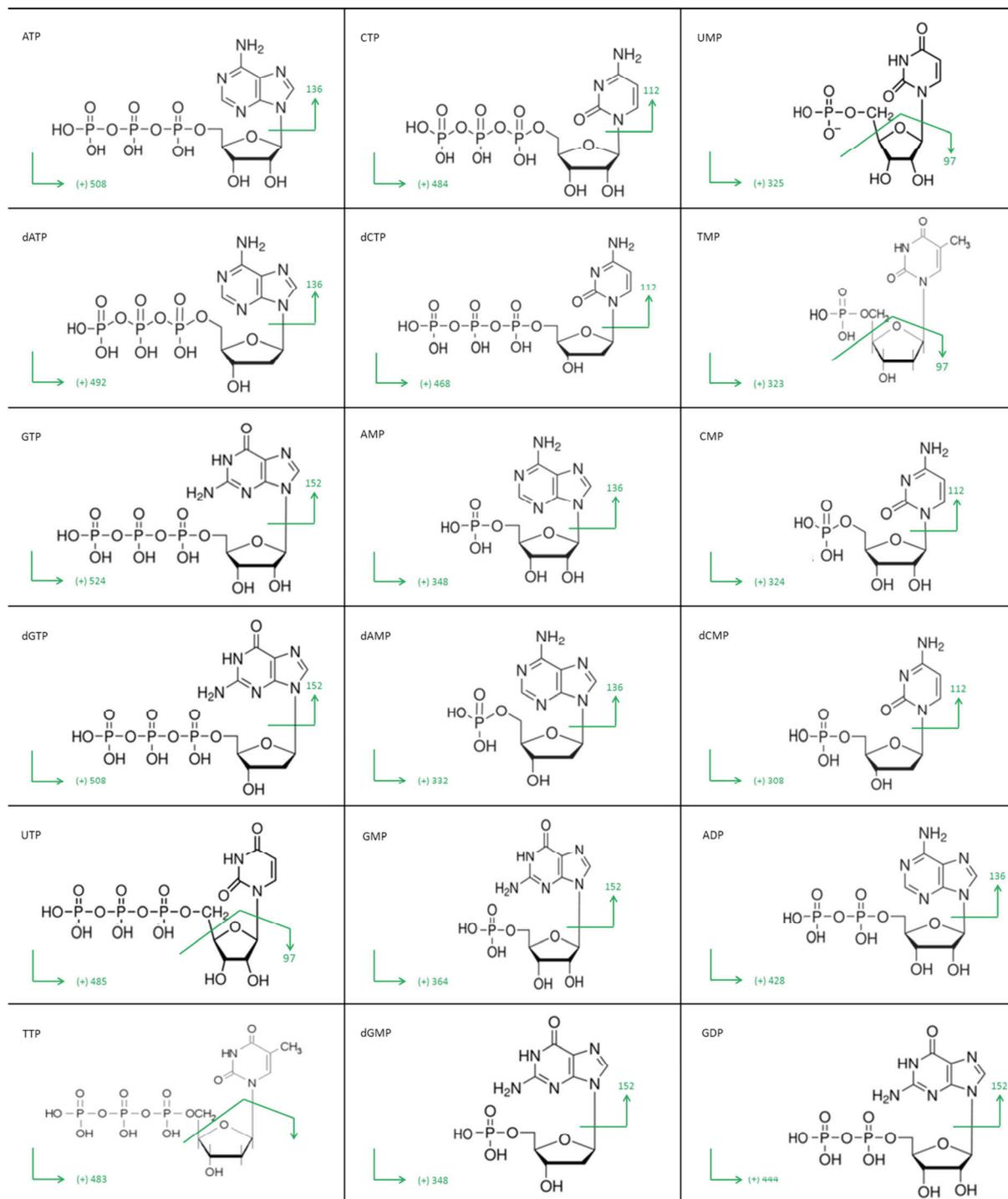
⇒ Purification with chloroform was deleterious.
⇒ Stirring time and volume of methanol/water had no influence.

Conclusion

- ✓ Pre-analytical workflow is very important for the quantification of intracellular nucleotides in NCI-H292 cells.
- ✓ Some pre-analytical conditions have a major deleterious effect on levels of nucleotides: scraping adherent cells, purification with chloroform.
- ✓ The optimal percentage of methanol depends on the nucleotide studied.
- ✓ Similar study realized on other cell lines (Messa, RL and L1210 cells) confirmed the importance of pre-analytical workflow and revealed that optimal pre-analytical conditions depended on cell lines (data will be published: Manuscript number: JCA-15-473R1).

➔ Before initiating any study of deoxyribonucleotides and ribonucleotides pools in cultured cells, sample preparation strategy has to be studied.

Annexe 5. Schémas de fragmentation des nucléotides, nucléosides et autres molécules analysées avec la méthode développée pour les nucléotides.

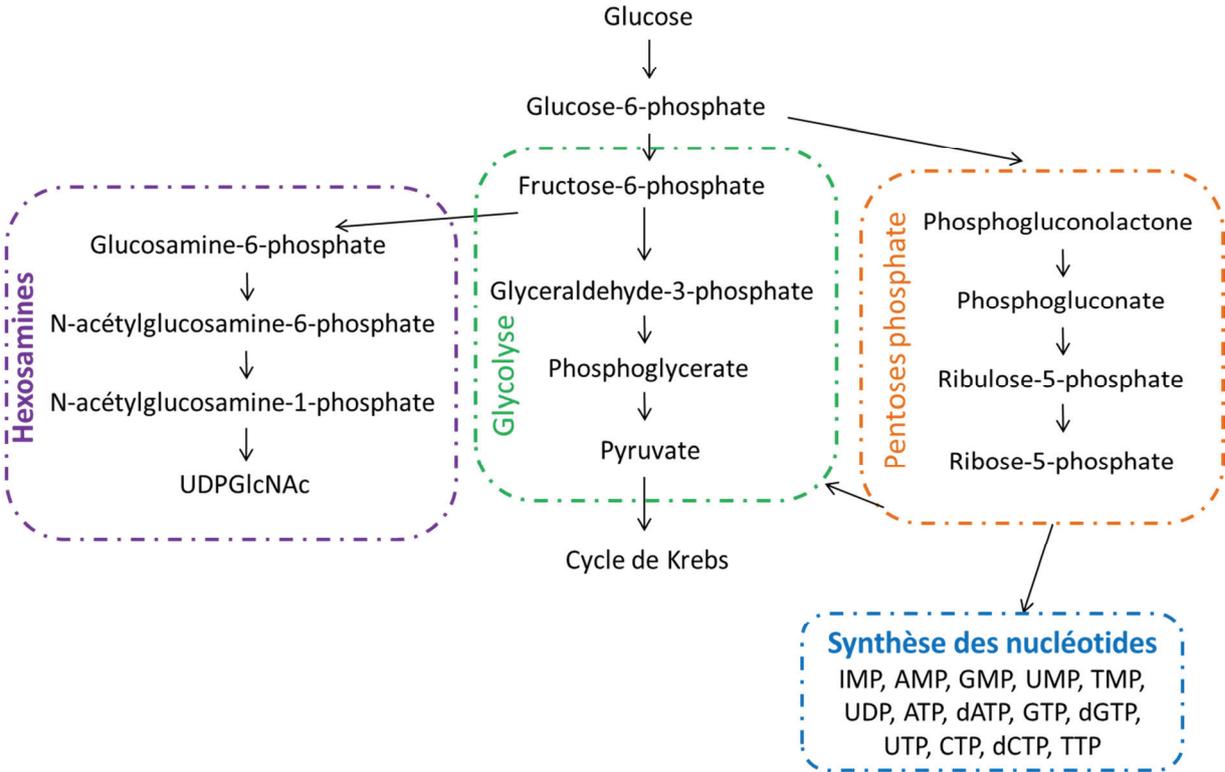


<p>UDP</p> <p>(+) 405</p>	<p>Cytidine</p> <p>(+) 244</p>	<p>UDP-N-acetylglucosamine</p> <p>(+) 608</p>
<p>CDP</p> <p>(+) 404</p>	<p>Inosine</p> <p>(+) 269</p>	<p>UDPGlucose</p> <p>(-) 564,8</p>
<p>Adénosine</p> <p>(+) 268</p>	<p>IMP</p> <p>(+) 349</p>	<p>AcétylCoaA</p> <p>(-) 808</p>
<p>Guanosine</p> <p>(+) 284</p>	<p>AMPc</p> <p>(+) 330</p>	<p>SAM</p> <p>(+) 399,1</p>
<p>Uridine</p> <p>(-) 243</p>	<p>GMPc</p> <p>(+) 346</p>	<p>SAH</p> <p>(+) 385,1</p>
<p>Pseudo-Uridine</p> <p>(-) 243</p>	<p>8-oxodGTP</p> <p>(+) 524</p>	<p>Ribose-5-phosphate</p> <p>(-) 229</p>
		<p>Glucose-6-phosphate</p> <p>(-) 259</p>

Annexe 6. Lignées cellulaires utilisées dans la partie Applications.

Lignées cellulaires	Origine
ADF	Homme, glioblastome
HCT-116	Homme, colon, carcinome
HMEC	Homme, sein
MDA-MB231	Homme, sein, adénocarcinome
Messa	Homme, utérus, sarcome
MIA Paca-2	Homme, pancréas, carcinome
MRC5	Homme, poumon, cellules embryonnaires
NCI-H292	Homme, poumon, carcinome
V79	Hamster, poumon
VC8	Hamster, poumon

Annexe 7. Place de la voie des hexosamines dans le métabolisme du glucose.



Annexe 8. Composition complète du milieu de culture RPMI1640 (ThermoFisher).

Composants	Concentration (g/l)	Composants	Concentration (g/l)
Sels inorganiques		Acides aminés	
Nitrate de calcium	0,1	L-Arginine	0,2
Sulfate de magnésium	0,1	L-Asparagine	0,05
Chlorure de potassium	0,4	Acide L-aspartique	0,02
Chlorure de sodium	5,5	L-Cystine	0,02
Phosphate disodique	0,8	Acide L-Glutamique	0,02
Bicarbonate de sodium	2	L-Glutamine	0,3
Vitamines		Glycine	0,01
D-Biotine	0,0002	L-Histidine	0,015
Choline	0,003	Hydroxy-L-Proline	0,02
Acide folique	0,001	L-Isoleucine	0,05
<i>myo</i> -Inositol	0,035	L-Leucine	0,05
Niacinamide	0,001	L-Lysine	0,04
Acide <i>p</i> -Aminobenzoïque	0,001	L-Methionine	0,015
Acide D-Pantothenique	0,00025	L-Phénylalanine	0,015
Pyridoxine	0,001	L-Proline	0,02
Riboflavine	0,0002	L-Serine	0,03
Thiamine	0,001	L-Thréonine	0,02
Vitamine B ₁₂	0,000005	L-Tryptophane	0,005
Autres		L-Tyrosine	0,02
Glutathion réduit	0,001	L-Valine	0,02
Rouge phénol	0,005	Autres	
Glucose	2	HEPES	6

ARTICLES RELATIFS A LA PARTIE APPLICATIONS DE LA THESE

Les articles présentés dans cette partie sont :

- publiés
- ou soumis

Trois articles sont également en cours de rédaction.

Article n°1

Graindorge D, Martineau S, Machon C, Arnoux P, Guitton J, Francesconi S, Frochot C, Sage E, Girard PM. Singlet oxygen-mediated oxidation during UVA radiation alters the dynamic of genomic DNA replication. PLoS One. 2015 Oct 20;10(10):e0140645. doi: 10.1371/journal.pone.0140645. eCollection 2015.

Article n°2

Wilhem T, Ragu S, Magdalou I, Machon C, Dardillac E, Técher H, Guitton J, Debatisse M, Lopez B. Homologous recombination protects replication fork velocity from endogenous stress. Soumis à PNAS en octobre 2015.

Article n°3

Cividini F, Cros-Perrial E, Pesi R, Machon C, Allegrini S, Camici M, Dumontet C, Jordheim LP, Tozzi MG. Cell proliferation and drug sensitivity of human glioblastoma cells are altered by the stable modulation of cytosolic 5'-nucleotidase II. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Aug;65:222-9. doi: 10.1016/j.biocel.2015.06.011. Epub 2015 Jun 14.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allegrini, S., Filoni, D.N., Galli, A., Collavoli, A., Pesi, R., Camici, M., and Tozzi, M.G. (2013). Expression of bovine cytosolic 5'-nucleotidase (cN-II) in yeast: nucleotide pools disturbance and its consequences on growth and homologous recombination. *PLoS One* 8, e63914.
- Al-Shehri, S., Henman, M., Charles, B.G., Cowley, D., Shaw, P.N., Liley, H., Tomarchio, A., Punyadeera, C., and Duley, J.A. (2013). Collection and determination of nucleotide metabolites in neonatal and adult saliva by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 931, 140–147.
- Anglana, M., Apiou, F., Bensimon, A., and Debatisse, M. (2003). Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell* 114, 385–394.
- Bapiro, T.E., Richards, F.M., Goldgraben, M.A., Olive, K.P., Madhu, B., Frese, K.K., Cook, N., Jacobetz, M.A., Smith, D.-M., Tuveson, D.A., et al. (2011). A novel method for quantification of gemcitabine and its metabolites 2',2'-difluorodeoxyuridine and gemcitabine triphosphate in tumour tissue by LC-MS/MS: comparison with (19)F NMR spectroscopy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68, 1243–1253.
- Baranowska-Bosiacka, I., Machaliński, B., and Tarasiuk, J. (2005). The purine nucleotide content in human leukemia cell lines. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10, 217–226.
- Bester, A.C., Roniger, M., Oren, Y.S., Im, M.M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach, D.S., and Kerem, B. (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* 145, 435–446.
- Bezy, V., Chaimbault, P., Morin, P., Unger, S.E., Bernard, M.-C., and Agrofoglio, L.A. (2006). Analysis and validation of the phosphorylated metabolites of two anti-human immunodeficiency virus nucleotides (stavudine and didanosine) by pressure-assisted CE-ESI-MS/MS in cell extracts: sensitivity enhancement by the use of perfluorinated acids and alcohols as coaxial sheath-liquid make-up constituents. *Electrophoresis* 27, 2464–2476.
- Bolten, C.J., Kiefer, P., Letisse, F., Portais, J.-C., and Wittmann, C. (2007). Sampling for Metabolome Analysis of Microorganisms. *Anal. Chem.* 79, 3843–3849.
- Breton, F., Delépée, R., Jégourel, D., Deville-Bonne, D., and Agrofoglio, L.A. (2008). Selective adenosine-5'-monophosphate uptake by water-compatible molecularly imprinted polymer. *Anal. Chim. Acta* 616, 222–229.
- Breton, F., Delépée, R., and Agrofoglio, L.A. (2009). Molecular imprinting of AMP by an ionic-noncovalent dual approach. *J. Sep. Sci.* 32, 3285–3291.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 85–95.
- Canelas, A.B., ten Pierick, A., Ras, C., Seifar, R.M., van Dam, J.C., van Gulik, W.M., and Heijnen, J.J. (2009). Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics. *Anal. Chem.* 81, 7379–7389.
- Carli, D., Honorat, M., Cohen, S., Megherbi, M., Vignal, B., Dumontet, C., Payen, L., and Guitton, J. (2009). Simultaneous quantification of 5-FU, 5-FUrd, 5-FdUrd, 5-FdUMP, dUMP and TMP in cultured cell models by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 877, 2937–2944.

- Chen, P., Liu, Z., Liu, S., Xie, Z., Aimiwu, J., Pang, J., Klisovic, R., Blum, W., Grever, M.R., Marcucci, G., et al. (2009). A LC-MS/MS method for the analysis of intracellular nucleoside triphosphate levels. *Pharm. Res.* *26*, 1504–1515.
- Chen, P., Aimiwu, J., Xie, Z., Wei, X., Liu, S., Klisovic, R., Marcucci, G., and Chan, K.K. (2011). Biochemical modulation of aracytidine (Ara-C) effects by GTI-2040, a ribonucleotide reductase inhibitor, in K562 human leukemia cells. *AAPS J.* *13*, 131–140.
- Cividini, F., Cros-Perrial, E., Pesi, R., Machon, C., Allegrini, S., Camici, M., Dumontet, C., Jordheim, L.P., and Tozzi, M.G. (2015). Cell proliferation and drug sensitivity of human glioblastoma cells are altered by the stable modulation of cytosolic 5'-nucleotidase II. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *65*, 222–229.
- Cohen, S., Megherbi, M., Jordheim, L.P., Lefebvre, I., Perigaud, C., Dumontet, C., and Guitton, J. (2009). Simultaneous analysis of eight nucleoside triphosphates in cell lines by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *877*, 3831–3840.
- Cohen, S., Jordheim, L.P., Megherbi, M., Dumontet, C., and Guitton, J. (2010). Liquid chromatographic methods for the determination of endogenous nucleotides and nucleotide analogs used in cancer therapy: a review. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *878*, 1912–1928.
- Cordell, R.L., Hill, S.J., Ortori, C.A., and Barrett, D.A. (2008). Quantitative profiling of nucleotides and related phosphate-containing metabolites in cultured mammalian cells by liquid chromatography tandem electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *871*, 115–124.
- Coulier, L., Gerritsen, H., van Kampen, J.J.A., Reedijk, M.L., Luider, T.M., Osterhaus, A.D.M.E., Gruters, R.A., and Brüll, L. (2011). Comprehensive analysis of the intracellular metabolism of antiretroviral nucleosides and nucleotides using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and method improvement by using ultra performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *879*, 2772–2782.
- Crauste, C., Lefebvre, I., Hovaneissian, M., Puy, J.Y., Roy, B., Peyrottes, S., Cohen, S., Guitton, J., Dumontet, C., and Perigaud, C. (2009). Development of a sensitive and selective LC/MS/MS method for the simultaneous determination of intracellular 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine triphosphate (araCTP), cytidine triphosphate (CTP) and deoxycytidine triphosphate (dCTP) in a human follicular lymphoma cell line. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *877*, 1417–1425.
- Daxecker, H., Raab, M., Cichna, M., Markl, P., and Müller, M.M. (2001). Determination of the effects of mycophenolic acid on the nucleotide pool of human peripheral blood mononuclear cells in vitro by high-performance liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *310*, 81–87.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enyoloji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* *204*, 1257–1265.
- De Franceschi, L., Fattovich, G., Turrini, F., Ayi, K., Brugnara, C., Manzato, F., Noventa, F., Stanzial, A.M., Solero, P., and Corrocher, R. (2000). Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: role of membrane oxidative damage. *Hepatology. Baltim. Md* *31*, 997–1004.

- De Korte, D., Haverkort, W.A., Roos, D., Behrendt, H., and van Gennip, A.H. (1986). Imbalance in the ribonucleotide pools of lymphoid cells from acute lymphoblastic leukemia patients. *Leuk. Res.* *10*, 389–396.
- De Korte, D., Haverkort, W.A., de Boer, M., van Gennip, A.H., and Roos, D. (1987). Imbalance in the nucleotide pools of myeloid leukemia cells and HL-60 cells: correlation with cell-cycle phase, proliferation, differentiation, and transformation. *Cancer Res.* *47*, 1841–1847.
- Denzel, M.S., Storm, N.J., Gutschmidt, A., Baddi, R., Hinze, Y., Jarosch, E., Sommer, T., Hoppe, T., and Antebi, A. (2014). Hexosamine Pathway Metabolites Enhance Protein Quality Control and Prolong Life. *Cell* *156*, 1167–1178.
- Derissen, E.J.B., Hillebrand, M.J.X., Rosing, H., Otten, H.M.M.B., Laille, E., Schellens, J.H.M., and Beijnen, J.H. (2014). Quantitative determination of azacitidine triphosphate in peripheral blood mononuclear cells using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *90*, 7–14.
- Derissen, E.J.B., Hillebrand, M.J.X., Rosing, H., Schellens, J.H.M., and Beijnen, J.H. (2015). Development of an LC-MS/MS assay for the quantitative determination of the intracellular 5-fluorouracil nucleotides responsible for the anticancer effect of 5-fluorouracil. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *110*, 58–66.
- Dietmair, S., Timmins, N.E., Gray, P.P., Nielsen, L.K., and Krömer, J.O. (2010). Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol. *Anal. Biochem.* *404*, 155–164.
- Durand-Gasselino, L., Da Silva, D., Benech, H., Pruvost, A., and Grassi, J. (2007). Evidence and possible consequences of the phosphorylation of nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human red blood cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 2105–2111.
- Fausther, M., and Sévigny, J. (2011). Les nucléosides et nucléotides extracellulaires régulent les fonctions hépatiques par le biais d'un système complexe de protéines membranaires. *C. R. Biol.* *334*, 100–117.
- Feng, B., Zheng, M.-H., Zheng, Y.-F., Lu, A.-G., Li, J.-W., Wang, M.-L., Ma, J.-J., Xu, G.-W., Liu, B.-Y., and Zhu, Z.-G. (2005). Normal and modified urinary nucleosides represent novel biomarkers for colorectal cancer diagnosis and surgery monitoring. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *20*, 1913–1919.
- Fromentin, E., Gavegnano, C., Obikhod, A., and Schinazi, R.F. (2010). Simultaneous quantification of intracellular natural and antiretroviral nucleosides and nucleotides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* *82*, 1982–1989.
- Fung, E.N., Cai, Z., Burnette, T.C., and Sinhababu, A.K. (2001). Simultaneous determination of Ziagen and its phosphorylated metabolites by ion-pairing high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* *754*, 285–295.
- Gill, B.D., Indyk, H.E., and Manley-Harris, M. (2013). Analysis of nucleosides and nucleotides in infant formula by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* *405*, 5311–5319.
- Girard, P.-M., Pozzebon, M., Delacôte, F., Douki, T., Smirnova, V., and Sage, E. (2008). Inhibition of S-phase progression triggered by UVA-induced ROS does not require a functional DNA damage checkpoint response in mammalian cells. *DNA Repair* *7*, 1500–1516.

- Gonzalez, B., François, J., and Renaud, M. (1997). A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast Chichester Engl.* *13*, 1347–1355.
- Graindorge, D., Martineau, S., Machon, C., Arnoux, P., Guitton, J., Francesconi, S., Frochot, C., Sage, E., and Girard, P.-M. (2015). Singlet Oxygen-Mediated Oxidation during UVA Radiation Alters the Dynamic of Genomic DNA Replication. *PLoS One* *10*, e0140645.
- Graven, P., Tambalo, M., Scapozza, L., and Perozzo, R. (2014). Purine metabolite and energy charge analysis of *Trypanosoma brucei* cells in different growth phases using an optimized ion-pair RP-HPLC/UV for the quantification of adenine and guanine pools. *Exp. Parasitol.* *141*, 28–38.
- Grem, J.L., and Allegra, C.J. (1990). Enhancement of the toxicity and DNA incorporation of arabinosyl-5-azacytosine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine by cyclopentenyl cytosine. *Cancer Res.* *50*, 7279–7284.
- Guo, S., Duan, J., Qian, D., Wang, H., Tang, Y., Qian, Y., Wu, D., Su, S., and Shang, E. (2013). Hydrophilic interaction ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry for determination of nucleotides, nucleosides and nucleobases in *Ziziphus* plants. *J. Chromatogr. A* *1301*, 147–155.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hartmann, S., Okun, J.G., Schmidt, C., Langhans, C.-D., Garbade, S.F., Burgard, P., Haas, D., Sass, J.O., Nyhan, W.L., and Hoffmann, G.F. (2006). Comprehensive detection of disorders of purine and pyrimidine metabolism by HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* *52*, 1127–1137.
- Hawkins, T., Veikley, W., Durand-Gasselien, L., Babusis, D., Reddy, Y.S., Flaherty, J.F., and Ray, A.S. (2011). Intracellular nucleotide levels during coadministration of tenofovir disoproxil fumarate and didanosine in HIV-1-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 1549–1555.
- Helenius, M., Jalkanen, S., and Yegutkin, G. (2012). Enzyme-coupled assays for simultaneous detection of nanomolar ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine and pyrophosphate concentrations in extracellular fluids. *Biochim. Biophys. Acta* *1823*, 1967–1975.
- Helleday, T. (2015). Poisoning Cancer Cells with Oxidized Nucleosides. *N. Engl. J. Med.* *373*, 1570–1571.
- Homma, M., Matsuzaki, Y., Inoue, Y., Shibata, M., Mitamura, K., Tanaka, N., and Kohda, Y. (2004). Marked elevation of erythrocyte ribavirin levels in interferon and ribavirin-induced anemia. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *2*, 337–339.
- Huang, L., Lizak, P., Aweeka, F., and Long-Boyle, J. (2013). Determination of intracellular fludarabine triphosphate in human peripheral blood mononuclear cells by LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *86*, 198–203.
- Huber, A.-L., Lebeau, J., Guillaumot, P., Pétrilli, V., Malek, M., Chilloux, J., Fauvet, F., Payen, L., Kfoury, A., Renno, T., et al. (2013). p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose. *Mol. Cell* *49*, 1049–1059.
- Jansen, R.S., Rosing, H., Schellens, J.H.M., and Beijnen, J.H. (2009a). Retention studies of 2'-2'-difluorodeoxycytidine and 2'-2'-difluorodeoxyuridine nucleosides and nucleotides on porous

graphitic carbon: development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *J. Chromatogr. A* *1216*, 3168–3174.

Jansen, R.S., Rosing, H., Schellens, J.H.M., and Beijnen, J.H. (2009b). Simultaneous quantification of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 2',2'-difluorodeoxyuridine nucleosides and nucleotides in white blood cells using porous graphitic carbon chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *RCM* *23*, 3040–3050.

Jansen, R.S., Rosing, H., Kromdijk, W., ter Heine, R., Schellens, J.H., and Beijnen, J.H. (2010). Simultaneous quantification of emtricitabine and tenofovir nucleotides in peripheral blood mononuclear cells using weak anion-exchange liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *878*, 621–627.

Jansen, R.S., Rosing, H., Schellens, J.H.M., and Beijnen, J.H. (2011). Mass spectrometry in the quantitative analysis of therapeutic intracellular nucleotide analogs. *Mass Spectrom. Rev.* *30*, 321–343.

Jégourel, D., Delépée, R., Breton, F., Rolland, A., Vidal, R., and Agrofoglio, L.A. (2008). Molecularly imprinted polymer of 5-methyluridine for solid-phase extraction of pyrimidine nucleoside cancer markers in urine. *Bioorg. Med. Chem.* *16*, 8932–8939.

Jiang, Y., Sun, C., Ding, X., Yuan, D., Chen, K., Gao, B., Chen, Y., and Sun, A. (2012). Simultaneous determination of adenine nucleotides, creatine phosphate and creatine in rat liver by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *66*, 258–263.

Jordheim, L.P., and Dumontet, C. (2007). Review of recent studies on resistance to cytotoxic deoxynucleoside analogues. *Biochim. Biophys. Acta* *1776*, 138–159.

Jordheim, L., Galmarini, C.M., and Dumontet, C. (2003). Drug resistance to cytotoxic nucleoside analogues. *Curr. Drug Targets* *4*, 443–460.

Kamčeva, T., Bjånes, T., Svardal, A., Riedel, B., Schjøtt, J., and Eide, T. (2015). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of eight endogenous nucleotides and the intracellular gemcitabine metabolite dFdCTP in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *1001*, 212–220.

van Kampen, J.J.A., Reedijk, M.L., Burgers, P.C., Dekker, L.J.M., Hartwig, N.G., van der Ende, I.E., de Groot, R., Osterhaus, A.D.M.E., Burger, D.M., Luider, T.M., et al. (2010). Ultra-fast analysis of plasma and intracellular levels of HIV protease inhibitors in children: a clinical application of MALDI mass spectrometry. *PLoS One* *5*, e11409.

Karp, G. (2009). *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments* (John Wiley & Sons).

Kirchherr, H., Shipkova, M., and von Ahsen, N. (2013). Improved method for therapeutic drug monitoring of 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine in whole-blood by LC/MSMS using isotope-labeled internal standards. *Ther. Drug Monit.* *35*, 313–321.

Krstulja, A., Lettieri, S., Hall, A.J., Delépée, R., Favetta, P., and Agrofoglio, L.A. (2014). Evaluation of molecularly imprinted polymers using 2',3',5'-tri-O-acyluridines as templates for pyrimidine nucleoside recognition. *Anal. Bioanal. Chem.* *406*, 6275–6284.

- Kuklenyik, Z., Martin, A., Pau, C.-P., Holder, A., Youngpairoj, A.S., Zheng, Q., Cong, M.-E., Garcia-Lerma, J.G., Heneine, W., Pirkle, J.L., et al. (2009). On-line coupling of anion exchange and ion-pair chromatography for measurement of intracellular triphosphate metabolites of reverse transcriptase inhibitors. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *877*, 3659–3666.
- Laourdakis, C.D., Merino, E.F., Neilson, A.P., and Cassera, M.B. (2014). Comprehensive quantitative analysis of purines and pyrimidines in the human malaria parasite using ion-pairing ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *967*, 127–133.
- Liu, J.-X., Aerts, J.T., Rubakhin, S.S., Zhang, X.-X., and Sweedler, J.V. (2014). Analysis of endogenous nucleotides by single cell capillary electrophoresis-mass spectrometry. *The Analyst* *139*, 5835–5842.
- Machon, C., Jordheim, L.P., Puy, J.-Y., Lefebvre, I., Dumontet, C., and Guitton, J. (2014). Fully validated assay for the quantification of endogenous nucleoside mono- and triphosphates using online extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* *406*, 2925–2941.
- Machon, C., Bordes, C., Cros-Perrial, E., Clement, Y., Jordheim, L.P., Lanteri, P., and Guitton, J. (2015). Use of designed experiments for the improvement of pre-analytical workflow for the quantification of intracellular nucleotides in cultured cell lines. *J. Chromatogr. A* *1405*, 116–125.
- Magdenoska, O., Martinussen, J., Thykaer, J., and Nielsen, K.F. (2013). Dispersive solid phase extraction combined with ion-pair ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for quantification of nucleotides in *Lactococcus lactis*. *Anal. Biochem.* *440*, 166–177.
- Mateos-Vivas, M., Rodríguez-Gonzalo, E., García-Gómez, D., and Carabias-Martínez, R. (2015). Hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in the presence of hydrophilic ion-pairing reagents for the separation of nucleosides and nucleotide mono-, di- and triphosphates. *J. Chromatogr. A* *1414*, 129–137.
- Mathews, C.K. (2006). DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 1300–1314.
- Matuszczyk, J.-C., Teleki, A., Pfizenmaier, J., and Takors, R. (2015). Compartment-specific metabolomics for CHO reveals that ATP pools in mitochondria are much lower than in cytosol. *Biotechnol. J.* *10*, 1639–1650.
- van Moorsel, C.J., Bergman, A.M., Veerman, G., Voorn, D.A., Ruiz van Haperen, V.W., Kroep, J.R., Pinedo, H.M., and Peters, G.J. (2000). Differential effects of gemcitabine on ribonucleotide pools of twenty-one solid tumour and leukaemia cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* *1474*, 5–12.
- Moyer, J.D., and Henderson, J.F. (1985). Compartmentation of intracellular nucleotides in mammalian cells. *CRC Crit. Rev. Biochem.* *19*, 45–61.
- Musk, P., Clark, J.M., Thompson, D., Dunn, I.S., Christopherson, R.I., Szabados, E., Rose, S.E., and Parsons, P.G. (1996). Purine deoxynucleoside metabolism in human melanoma cells with a high spontaneous mutation rate. *Mutat. Res.* *350*, 229–238.
- Obici, S., and Rossetti, L. (2003). Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. *Endocrinology* *144*, 5172–5178.

- Pabst, M., Grass, J., Fischl, R., Léonard, R., Jin, C., Hinterkörner, G., Borth, N., and Altmann, F. (2010). Nucleotide and nucleotide sugar analysis by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry on surface-conditioned porous graphitic carbon. *Anal. Chem.* *82*, 9782–9788.
- Peifer, S., Schneider, K., Nürenberg, G., Volmer, D.A., and Heinzle, E. (2012). Quantitation of intracellular purine intermediates in different Corynebacteria using electrospray LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* *404*, 2295–2305.
- Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Cabrerizo, F.M., Lorente, C., Capparelli, A.L., Braun, A.M., Oliveros, E., and Thomas, A.H. (2007). Photosensitization of 2'-deoxyadenosine-5'-monophosphate by pterin. *Org. Biomol. Chem.* *5*, 2792–2799.
- Pruvost, A., Théodoro, F., Agrofoglio, L., Negredo, E., and Bénech, H. (2008). Specificity enhancement with LC-positive ESI-MS/MS for the measurement of nucleotides: application to the quantitative determination of carbovir triphosphate, lamivudine triphosphate and tenofovir diphosphate in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Mass Spectrom.* *JMS 43*, 224–233.
- Quinn, R., Basanta-Sanchez, M., Rose, R.E., and Fabris, D. (2013). Direct infusion analysis of nucleotide mixtures of very similar or identical elemental composition. *J. Mass Spectrom.* *JMS 48*, 703–712.
- Rashidzadeh, H., Bhadresa, S., Good, S.S., Larsson Cohen, M., Gupta, K.S., and Rush, W.R. (2015). Overcoming stability challenges in the quantification of tissue nucleotides: determination of 2'-C-methylguanosine triphosphate concentration in mouse liver. *Biol. Pharm. Bull.* *38*, 380–388.
- Rehberg, M., Rath, A., Ritter, J.B., Genzel, Y., and Reichl, U. (2014). Changes in intracellular metabolite pools during growth of adherent MDCK cells in two different media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 385–397.
- Ren, Y., Zhang, J., Song, X., Chen, X., and Li, D. (2011). Simultaneous determination of 5'-monophosphate nucleotides in infant formulas by HPLC-MS. *J. Chromatogr. Sci.* *49*, 332–337.
- Ritter, J.B., Genzel, Y., and Reichl, U. (2008). Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: optimization using experimental design. *Anal. Biochem.* *373*, 349–369.
- Rodríguez-Gonzalo, E., Domínguez-Álvarez, J., Mateos-Vivas, M., García-Gómez, D., and Carabias-Martínez, R. (2014). A validated method for the determination of nucleotides in infant formulas by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Electrophoresis* *35*, 1677–1684.
- Saito, H., Tada, S., Ebinuma, H., Ishii, H., Kashiwazaki, K., Takahashi, M., Tsukada, N., Nishida, J., Tanaka, S., Shiozaki, H., et al. (2006). Role of erythrocytes as a reservoir for ribavirin and relationship with adverse reactions in the early phase of interferon combination therapy for chronic hepatitis C virus infections. *J. Clin. Microbiol.* *44*, 3562–3568.
- Schuler, P.J., Saze, Z., Hong, C.-S., Muller, L., Gillespie, D.G., Cheng, D., Harasymczuk, M., Mandapathil, M., Lang, S., Jackson, E.K., et al. (2014). Human CD4+ CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clin. Exp. Immunol.* *177*, 531–543.
- Schulze, A., and Harris, A.L. (2012). How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* *491*, 364–373.

- Scorrano, S., Longo, L., and Vasapollo, G. (2010). Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of 1-methyladenosine from human urine. *Anal. Chim. Acta* *659*, 167–171.
- Spychala, J. (2000). Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.* *87*, 161–173.
- Stagg, J., and Smyth, M.J. (2010). Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* *29*, 5346–5358.
- Studzińska, S., and Buszewski, B. (2013). Effect of mobile phase pH on the retention of nucleotides on different stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* *405*, 1663–1672.
- Thomas, D., Herold, N., Keppler, O.T., Geisslinger, G., and Ferreirós, N. (2015). Quantitation of endogenous nucleoside triphosphates and nucleosides in human cells by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* *407*, 3693–3704.
- Tuytten, R., Lemièrre, F., Dongen, W.V., Esmans, E.L., and Slegers, H. (2002). Short capillary ion-pair high-performance liquid chromatography coupled to electrospray (tandem) mass spectrometry for the simultaneous analysis of nucleoside mono-, di- and triphosphates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *RCM 16*, 1205–1215.
- Vainchtein, L.D., Rosing, H., Schellens, J.H.M., and Beijnen, J.H. (2010). A new, validated HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of the anti-cancer agent capecitabine and its metabolites: 5'-deoxy-5-fluorocytidine, 5'-deoxy-5-fluorouridine, 5-fluorouracil and 5-fluorodihydrouracil, in human plasma. *Biomed. Chromatogr. BMC* *24*, 374–386.
- Vela, J.E., Olson, L.Y., Huang, A., Fridland, A., and Ray, A.S. (2007). Simultaneous quantitation of the nucleotide analog adefovir, its phosphorylated anabolites and 2'-deoxyadenosine triphosphate by ion-pairing LC/MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *848*, 335–343.
- Vo Duy, S., Besteiro, S., Berry, L., Perigaud, C., Bressolle, F., Vial, H.J., and Lefebvre-Tournier, I. (2012). A quantitative liquid chromatography tandem mass spectrometry method for metabolomic analysis of *Plasmodium falciparum* lipid related metabolites. *Anal. Chim. Acta* *739*, 47–55.
- Walter, P., and Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* *334*, 1081–1086.
- Wang, S., and Kaufman, R.J. (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *J. Cell Biol.* *197*, 857–867.
- Wang, J., Lin, T., Lai, J., Cai, Z., and Yang, M.S. (2009). Analysis of adenosine phosphates in HepG-2 cell by a HPLC-ESI-MS system with porous graphitic carbon as stationary phase. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *877*, 2019–2024.
- Wang, J., Chu, Y., Li, W., Wang, X., Guo, J., Yan, L., Ma, X., Ma, Y., Yin, Q., and Liu, C. (2014a). Simultaneous determination of creatine phosphate, creatine and 12 nucleotides in rat heart by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *958*, 96–101.
- Wang, Z.V., Deng, Y., Gao, N., Pedrozo, Z., Li, D.L., Morales, C.R., Criollo, A., Luo, X., Tan, W., Jiang, N., et al. (2014b). Spliced X-Box Binding Protein 1 Couples the Unfolded Protein Response to Hexosamine Biosynthetic Pathway. *Cell* *156*, 1179–1192.

Wenkui Li, Jie Zhang, and Francis LS Tse Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations (John Wiley & Sons).

Wilhelm, T., Magdalou, I., Barascu, A., Técher, H., Debatisse, M., and Lopez, B.S. (2014). Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 763–768.

Wittmann, C., Krömer, J.O., Kiefer, P., Binz, T., and Heinzle, E. (2004). Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Anal. Biochem.* *327*, 135–139.

Wu, S., Tan, L., Wang, G., Peng, G., Kang, C., and Tang, Y. (2013). Binding characteristics of homogeneous molecularly imprinted polymers for acyclovir using an (acceptor-donor-donor)-(donor-acceptor-acceptor) hydrogen-bond strategy, and analytical applications for serum samples. *J. Chromatogr. A* *1285*, 124–131.

Yamaoka, N., Kudo, Y., Inazawa, K., Inagawa, S., Yasuda, M., Mawatari, K., Nakagomi, K., and Kaneko, K. (2010). Simultaneous determination of nucleosides and nucleotides in dietary foods and beverages using ion-pairing liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *878*, 2054–2060.

Yamaoka, N., Inazawa, K., Inagawa, S., Yasuda, M., Mawatari, K., Nakagomi, K., Fujimori, S., Yamada, Y., and Kaneko, K. (2011). Simultaneous determination of purine and pyrimidine metabolites in HPRT-deficient cell lines. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* *30*, 1256–1259.

Yang, F.Q., Li, D.Q., Feng, K., Hu, D.J., and Li, S.P. (2010). Determination of nucleotides, nucleosides and their transformation products in *Cordyceps* by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* *1217*, 5501–5510.

Yoshio, N., Kawai, Y., Hori, H., and Ueda, T. (2005). Resistance to 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoro-adenine due to reduced incorporation into DNA from competition by excess deoxyadenosine triphosphate: implications for different sensitivities to nucleoside analogues. *Int. J. Hematol.* *81*, 405–412.

Yu-Rui Zhang, L.S. (2014). Urinary modified nucleosides as novel biomarkers for diagnosis and prognostic monitoring of urothelial bladder cancer. *Tumori* *100*, 660–666.

Zhang, G., Walker, A.D., Lin, Z., Han, X., Blatnik, M., Steenwyk, R.C., and Groeber, E.A. (2014). Strategies for quantitation of endogenous adenine nucleotides in human plasma using novel ion-pair hydrophilic interaction chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* *1325*, 129–136.

Zhang, W., Tan, S., Paintsil, E., Dutschman, G.E., Gullen, E.A., Chu, E., and Cheng, Y.-C. (2011). Analysis of deoxyribonucleotide pools in human cancer cell lines using a liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry technique. *Biochem. Pharmacol.* *82*, 411–417.

Zhao, H., Chiaro, C.R., Zhang, L., Smith, P.B., Chan, C.Y., Pedley, A.M., Pugh, R.J., French, J.B., Patterson, A.D., and Benkovic, S.J. (2015). Quantitative analysis of purine nucleotides indicates that purinosomes increase de novo purine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *290*, 6705–6713.

Zhao, Y., Liu, G., Liu, Y., Yuan, L., Hawthorne, D., Shen, J.X., Guha, M., and Aubry, A. (2013). Improved ruggedness of an ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the quantitative analysis of the triphosphate metabolite of a nucleoside reverse transcriptase inhibitor in peripheral blood mononuclear cells. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *RCM 27*, 481–488.

Zhou, G., Wang, M., Xu, R., and Li, X. (2015). Chemometrics for comprehensive analysis of nucleobases, nucleosides and nucleotides in *Siraitiae Fructus* by hydrophilic interaction ultra high performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole linear ion-trap tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 38, 3508-3515.

Zinellu, A., Sotgia, S., Pasciu, V., Madeddu, M., Leoni, G.G., Naitana, S., Deiana, L., and Carru, C. (2008). Intracellular adenosine 5'-triphosphate, adenosine 5'-diphosphate, and adenosine 5'-monophosphate detection by short-end injection capillary electrophoresis using methylcellulose as the effective electroosmotic flow suppressor. *Electrophoresis* 29, 3069–3073.