DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **29 juin 2021**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Madame CHAPEL Soraya**

Titre de la thèse : *Développement de méthodes bidimensionnelles en ligne LC x LC en moins d'une heure pour l'analyse d'échantillons complexes*

Résumé

Grâce à son très haut pouvoir séparatif, la chromatographie liquide bidimensionnelle compréhensive en ligne (LC x LC) s'est imposée comme un outil puissant pour l'analyse d'échantillons complexes ces dernières années. Cependant, du fait de sa complexité par rapport à la chromatographie liquide unidimensionnelle classique (1D-LC), la prolifération de cette technique demeure relativement limitée. L'une des difficultés majeures de cette technique consiste à parvenir à maximiser l'occupation de l'espace de séparation bidimensionnel, tout en minimisant les effets néfastes qui bien souvent en découlent, sur les performances globales de la méthode. Dans cette thèse, une attention particulière a été portée à cette problématique.

Ce manuscrit montre le potentiel de la LC x LC en ligne pour la séparation d'échantillons complexes de protéines et de peptides en moins d'une heure. Tout d'abord, les avantages de la LC x LC combinant la chromatographie en phase inverse (RPLC) dans les deux dimensions, par rapport à la chromatographie liquide unidimensionnelle en phase inverse classique (1D-RPLC), sont mis en évidence, pour la séparation de digestions de protéines. Dans une deuxième partie, deux approches possibles pour améliorer l'occupation de l'espace de séparation bidimensionnel pour l'analyse de peptides sont explorées. La première approche implique l'utilisation de programmes de gradients variables dans la deuxième dimension, tandis que la deuxième approche repose sur le couplage de deux méthodes différentes et complémentaires, à savoir, la chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC) et la RPLC. Bien que ces deux approches soient efficaces à cet effet, chacune d'entre elles apporte son lot de difficultés, qui sont discutées en détail ici. Dans le cas de la HILIC x RPLC en ligne, la différence de force éluante entre les phases mobiles des deux dimensions, donne généralement lieu à des déformations de pics, qui dégradent la qualité de séparation dans la deuxième dimension. Une stratégie possible pour éviter ces effets est présentée ici. Cette stratégie est ensuite comparée à trois des approches les plus utilisées dans la littérature. Les avantages et inconvénients de chacune des stratégies explorées sont mis en exergues, dans le contexte spécifique de l'analyse de peptides. Pour finir, dans une dernière partie, l'intérêt de la LC x LC couplée à la détection ultraviolet et à la détection par spectrométrie de masse à haute résolution, pour la caractérisation de conjugués d'anticorps-

médicaments, est souligné, en utilisant la chromatographie à échange de cations en première dimension et la RPLC en deuxième dimension.

DISCIPLINE : Chimie Analytique

MOTS-CLES : Chromatographie liquide bidimensionnelle, 2D-LC, peptides, protéines, RPLC, HILIC, CEX, spectrométrie de masse haute résolution, HRMS

NOM ET ADRESSE DU LABORATOIRE: Institut des Sciences Analytiques (ISA), 5 rue de la Doua, 69100, Villeurbanne, France