



Université Claude Bernard



# DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **09 mai 2022**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur GUILLAUBEZ Jean-Valery**

Titre de la thèse : « *Couplage de la photodissociation laser et la spectrométrie de masse pour la caractérisation de l'oxydation des cystéines protéiques* »

## Résumé



Dans un contexte de population vieillissante, la découverte de nouveaux biomarqueurs de pathologies lourdes telles que les maladies neurodégénératives est un des enjeux clefs de notre ère. Grâce aux progrès technologiques, la recherche de biomarqueur se tourne vers des phénomènes minoritaires et transitoires jusque-là impossibles à quantifier. Les variations de l'oxydation des fonctions thiols des cystéines en acide sulfénique (Cys-SOH) ou leur suroxydation traduit la présence d'un dérèglement de l'équilibre redox du corps humain, le stress oxydant. Cependant, de par l'importante gamme de concentration dynamique des échantillons biologiques, la quantification de ces Cys-SOH très peu concentrés représente un défi analytique. La plupart des méthodes de détection et de quantification des Cys-SOH emploient la spectrométrie de masse qui permet une localisation des sites d'oxydation grâce à la fragmentation des peptides issus des protéines oxydées. Cependant, ces techniques nécessitent généralement des étapes d'enrichissement/fractionnement des échantillons afin d'obtenir la sensibilité requise.

Cette thèse porte sur l'amélioration de la sensibilité analytique pour la quantification des Cys-SOH endogènes d'échantillons biologiques en substituant la dissociation classique par collision (HCD) par la photodissociation induite par laser (LID) afin d'ajouter une spécificité optique à la spectrométrie de masse. En effet, le mode de fragmentation HCD est non-discriminant et l'intégralité des ions isobares est fragmentée, générant des interférences responsables du bruit analytique. Les peptides n'absorbant pas dans le visible, le greffage spécifique des Cys-SOH avec un chromophore absorbant à 473 nm, le dabcyI cyclohexanedione (DabDn), permet de cibler et fragmenter spécifiquement les peptides à Cys-SOH. La fragmentation laser du chromophore DabDn, synthétisé par le laboratoire de Chimie de l'ENS Lyon, a tout d'abord été étudiée et plusieurs mécanismes de fragmentation ont été proposés. La dérivation des Cys-SOH de peptides et protéines modèles dont les cystéines ont été oxydées *in vitro* a été optimisée et leur fragmentation étudiée. Il a également été démontré que la LID permet d'atteindre des limites de détection et de quantification plus basses que celles obtenues en HCD, grâce à la réduction du bruit interférent. La détection et la quantification des Cys-SOH endogènes de protéines plasmatiques par LID, via leur dérivation, de six échantillons de plasma humain ont été réalisées avec succès, permettant une quantification relative entre les échantillons.

Cette méthode a ensuite été optimisée et appliquée pour le dosage multiplexé de protéines à Cys-SOH endogènes au sein d'une cohorte de plasma de patients sains, atteints de la maladie d'Alzheimer et positifs au COVID-19. Afin de pallier les biais dus à la variation instrumentale ou de la quantité de protéines entre individus, une stratégie de normalisation interne a été mise en place. Ainsi, les peptides à cystéine non

oxydée, i.e. thiols libres (Cys-SH), ont été suivis après dérivation par un chromophore dabcyyl maléimide, permettant lui aussi une fragmentation spécifique par LID. Le rapport des aires des pics peptides à Cys-SOH et Cys-SH dérivés par les deux chromophores fournit un ratio d'oxydation qui permet de comparer les différents niveaux d'oxydation des protéines plasmatiques suivies. Parmi les 54 plasmas analysés, des variations du taux d'oxydation des échantillons issus de patients positifs au COVID-19 par rapport au reste de la cohorte ont été observées pour cinq peptides issus de quatre protéines plasmatiques. La méthode développée permet donc une quantification relative des Cys-SOH endogènes directe, sensible, robuste, non-biaisée avec un protocole simple exempt d'étapes d'enrichissement ou de fractionnement.

Mots clefs : Spectrométrie de masse haute résolution, photodissociation, chromophore, protéomique, oxydation des cystéines, Alzheimer, COVID-19.