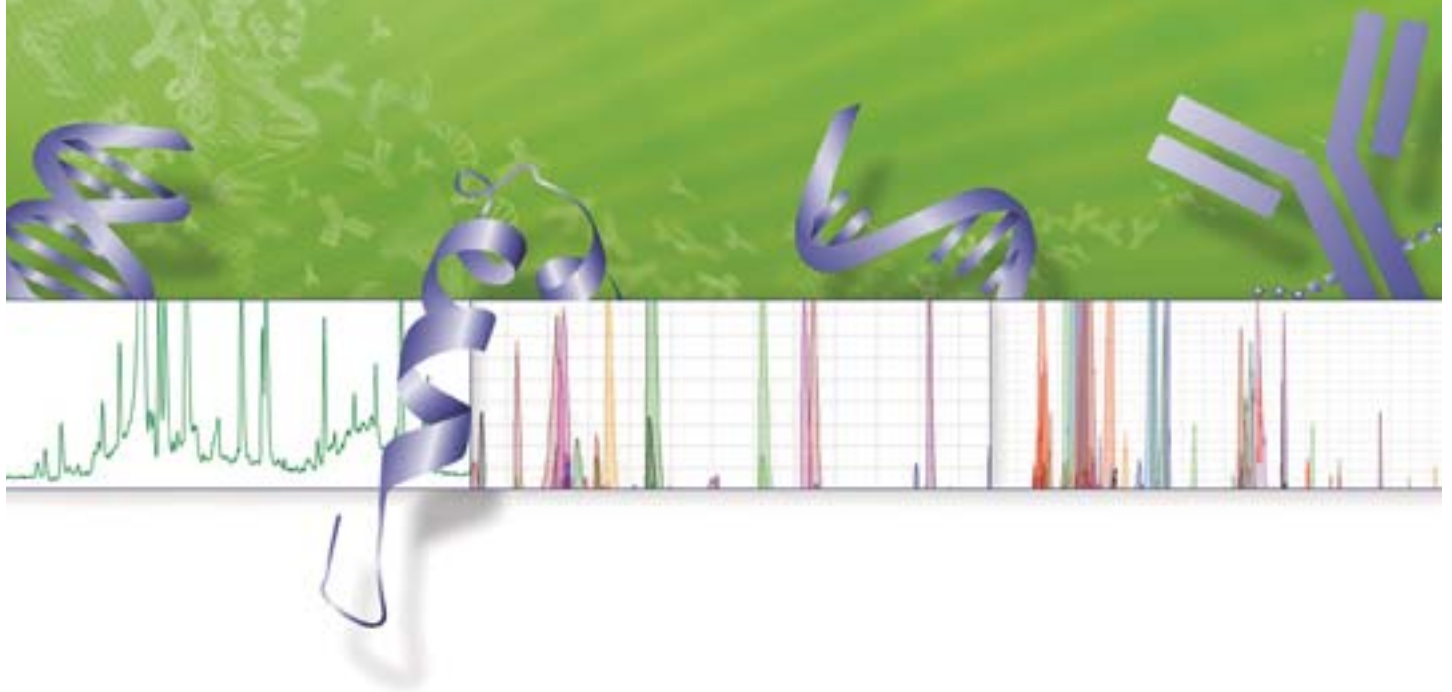




# FACTEURS CLÉS PERMETTANT DES CARACTÉRISATIONS OPTIMALES DE PEPTIDES :

Un guide d'instruction sur la cartographie des peptides

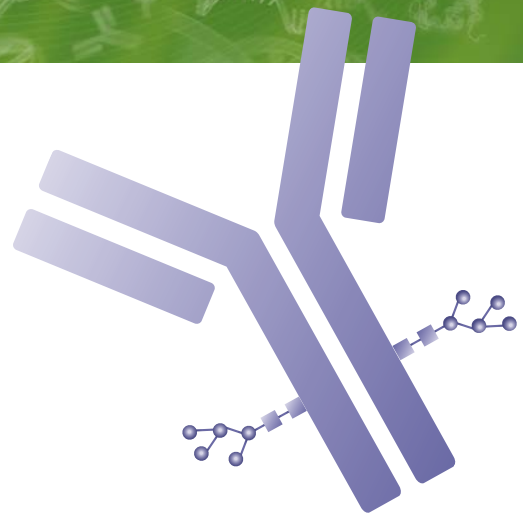
The Measure of Confidence



**Agilent Technologies**



# INTRODUCTION



La carte peptidique – un outil précieux pour les produits biopharmaceutiques – constitue une méthode très puissante et est le test d'identité le plus utilisé pour les protéines, en particulier celles produites par des moyens recombinants. Cette méthode implique le plus souvent la digestion enzymatique (généralement à l'aide de trypsine) d'une protéine pour produire des fragments de peptides, suivie de la séparation et de l'identification des fragments de manière reproductible, ce qui permet la détection et le suivi de changements d'acides aminés simples, de l'oxydation, de la désamidation et autres produits de dégradation. Elle permet aussi la détection directe des variantes d'anticorps monoclonaux courantes (par exemple, cyclisation N-terminale, traitement de lysine C-terminale et N-glycosylation) et d'autres modifications post-traductionnelles.

Une carte peptidique constitue l'empreinte d'une protéine et le produit final de plusieurs processus permettant une compréhension globale de la protéine en cours d'analyse. Elle implique quatre étapes majeures : l'isolation et la purification de la protéine ; le clivage sélectif des liaisons peptidiques ; la séparation chromatographique des peptides ; l'analyse validée des peptides.

La carte peptidique est considérée comme une procédure comparative qui confirme la structure principale de la protéine et détecte les altérations dans la structure. En outre, elle démontre la cohérence des processus et la stabilité génétique. Une carte peptidique doit comporter l'identification positive de la protéine et une couverture maximale de toute la séquence de peptides et fournir des informations supplémentaires et une identification de séquence allant au-delà de celle obtenue au niveau de la protéine non digérée.

La sélection d'une technique chromatographique pour séparer les peptides et générer des cartes peptidiques dépend de la protéine, des objectifs de l'expérience et du résultat attendu. Cependant, le pouvoir de résolution excellent de la chromatographie en phase inverse (RPC) fait de cette technique la technique HPLC prédominante pour les séparations de cartes peptidiques. Elle est aussi idéale pour les séparations analytiques et préparatives en raison de la disponibilité des éluants de phase mobile volatils. Il est important de noter que les colonnes préférées pour les séparations de cartes peptidiques sont similaires à celles utilisées pour les petites molécules, mais, dans la mesure où la plupart des séparations de cartes peptidiques sont effectuées à faible pH et à température élevée, les colonnes présentant une excellente stabilité au pH et des effets de silanol minimum sont utilisées de manière routinière.

Une inspection soignée de toute la stratégie de caractérisation est requise pour générer des cartes peptidiques réussies. Un profil peut comporter plus de 100 pics représentant des peptides individuels et leurs dérivés, ce qui nécessite une connaissance des méthodes de préparation d'échantillon, des techniques de séparation puissantes et des protocoles validés. Disposer du savoir-faire et des informations nécessaires pour développer une carte peptidique réussie vous aidera à obtenir une séparation optimale de vos digestions protéolytiques et une caractérisation réussie et fiable des peptides.

L'objectif de ce guide pratique sur la cartographie de peptides est de mettre l'accent sur les aspects importants de la génération de cartes peptidiques par chromatographie en phase inverse, de partager certaines des techniques fondamentales utilisées dans les procédures de cartographie de peptides et de souligner les points à considérer pour optimiser vos séparations de cartes peptidiques afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles.



# Digestion des protéines : préparation de votre protéine pour améliorer la séparation de cartes peptidiques

Une bonne compréhension des étapes de la digestion d'une protéine avant l'analyse vous aidera à obtenir une digestion complète et vous permettra d'être pleinement confiant dans la stratégie de votre choix. La méthode de digestion nécessite souvent son propre ensemble de protocoles de développement afin de fournir un échantillon adéquat et stable pour l'injection LC. Bien

qu'il existe de nombreuses options à considérer pour optimiser la digestion, plusieurs approches communes doivent être observées. Les cinq étapes utilisées dans la digestion des protéines, résumées dans le Tableau 1, sont : (1) préparation de l'échantillon (2) sélection des agents de clivage (3) alkylation/réduction (4) processus de digestion (5) enrichissement/extraction.

Tableau 1

## Cinq étapes pour la digestion des protéines

Procédure	Effet désiré	Expérience globale
1. Préparation de l'échantillon	Préparation de l'échantillon pour la digestion	Élimination, enrichissement, dialyse, dessalage
2. Sélection de l'agent de clivage	Conditions de clivage spécifiques	Aucun
3. Réduction et alkylation	La réduction réduit les liaisons disulfure L'alkylation protège les groupements -SH	Réduction : DTT, 45 min, 60 °C Alkylation : IAM, 1 h, à l'abri de la lumière
4. Processus de digestion	Clivage des protéines	Digestion : pH 8, 37 °C, 12 heures Neutralisation : Ajout TFA
5. Enrichissement/Extraction	Préparation de l'échantillon pour l'analyse LC ou LC/MS	Embouts-pipettes C18, concentration, dialyse, colonnes d'affinité

Pour en savoir plus sur les colonnes Agilent de cartographie des peptides, visitez le site [agilent.com/chem/advancebio](http://agilent.com/chem/advancebio)

# Étape 1 : préparation de l'échantillon

Selon la taille ou la configuration de la protéine, il existe différentes approches dans le prétraitement de votre échantillon. Dans certaines conditions, il peut être nécessaire d'enrichir l'échantillon ou de séparer la protéine des substances et stabilisants ajoutés dans la formulation du produit, en particulier si ceux-ci interfèrent avec la procédure de cartographie. Il existe de nombreuses méthodes pour effectuer ces procédures et chaque protéine comporte son propre ensemble de mesures ou processus d'extraction. Cependant, certaines des approches plus courantes utilisées pour l'extraction des échantillons avant digestion incluent l'élimination/enrichissement, la dialyse et le dessalage par filtration sur gel.

Des stratégies d'élimination et d'enrichissement ont été développées pour, respectivement, supprimer les protéines surabondantes ou isoler les protéines cibles dans l'échantillon. L'élimination est plus souvent utilisée dans les applications protéomiques pour réduire la complexité des échantillons biologiques qui contiennent des concentrations élevées d'albumine et d'immunoglobulines tels que le sérum. Les colonnes HPLC Multiple Affinity Removal System (MARS) d'Agilent et les cartouches de centrifugation permettent d'identifier et de caractériser les protéines de haute valeur en faible abondance et les biomarqueurs présents dans le sérum, le plasma et autres liquides biologiques. Par l'élimination des 14 protéines surabondantes avec MARS, environ 94 % de la masse protéinique totale sont éliminés. Le processus d'élimination est robuste, facilement automatisé et hautement efficace.



Le kit MARS est disponible dans une variété de dimensions de colonne de LC et dans des formats de cartouche de centrifugation. Les protéines déplétées incluent l'albumine, l'IgG, l'antitrypsine, l'IgA, la transférine, l'haptoglobine, le fibrinogène, l'alpha2-macroglobuline, l'alpha1 glycoprotéine acide, l'IgM, l'apolipoprotéine AI, l'apolipoprotéine AII, le complément C3 et la transthyréine.

Les stratégies d'élimination utilisent des techniques d'immunoaffinité (par exemple, immunoprécipitation, co-immunoprécipitation et chromatographie d'immunoaffinité). Les techniques d'enrichissement isolent aussi des sous-classes de protéines cellulaires en fonction de l'activité biochimique unique, de modifications post-traductionnelles (MPT) ou de la localisation spatiale au sein d'une cellule. Les modifications post-traductionnelles (par exemple, la phosphorylation et la glycosylation) peuvent être enrichies à l'aide de ligands d'affinité tels que, respectivement, la chromatographie par affinité ion-métal (IMAC) ou les lectines immobilisées. Pour introduire des modifications uniques au niveau de la protéine, d'autres techniques impliquent l'incorporation métabolique ou enzymatique d'acides aminés modifiés ou de MPT.

Qu'ils soient simples ou complexes, les échantillons doivent souvent faire l'objet d'une dialyse ou d'un dessalage afin d'être compatibles et optimisés pour la digestion. Par exemple, parce que la spectrométrie de masse (MS) mesure des ions chargés, les sels (en particulier les sels de sodium et de phosphate) doivent être éliminés avant la spectrométrie de masse pour limiter leur interférence avec la détection. Les produits de dialyse et de dessalage permettent de changer de tampon, de dessaler ou d'éliminer des petites molécules pour empêcher les interférences avec les processus post-traitement.

La dialyse est une procédure établie permettant de réduire la concentration de sel dans les échantillons. Elle nécessite de remplir une poche de dialyse (membrane d'une porosité définie), de la nouer puis de la placer dans un bain d'eau ou de tampon dans lequel la concentration de sel s'équilibre par diffusion. Les molécules trop grosses pour traverser la membrane restent à l'intérieur de la poche. Si le bain est de l'eau, la concentration des petites molécules dans la poche diminue lentement jusqu'à ce que la concentration à l'intérieur et à l'extérieur soit la même. Une fois l'équilibre atteint, la poche est rompue et la solution vidée dans un tube de récupération. La dialyse peut s'effectuer sur des volumes pouvant atteindre quelques litres mais ne convient pas aux volumes d'échantillons élevés car l'extraction du sel peut alors nécessiter plusieurs jours.

Pour dessaler les échantillons avant la digestion, la filtration sur gel (GF) est la procédure de laboratoire la plus pratique. Cette méthode constitue une technique chromatographique non adsorptive qui sépare les molécules en fonction de leur taille. Le dessalage est utilisé pour éliminer entièrement ou réduire la concentration de sel ou autre composant de faible poids moléculaire dans l'échantillon, tandis que l'échange de tampon permet de remplacer le tampon de l'échantillon par un nouveau tampon.



Les colonnes Bio SEC Agilent peuvent efficacement classer (par taille) et dessaler les mélanges de protéines avant les applications de cartes peptidiques.

La filtration sur gel est l'une des méthodes chromatographiques les plus simples car les échantillons sont analysés dans des conditions isocratiques. Dans sa forme analytique, la filtration sur gel (dite également "chromatographie d'exclusion stérique") peut séparer des molécules (c'est-à-dire des protéines) dont la masse moléculaire diffère d'un facteur inférieur à 2. Dans ces applications, la différence de taille entre les substances séparées est considérable (par exemple protéines et sels). Un système de filtration sur gel est choisi qui exclut complètement les molécules plus grosses mais permet aux plus petites de diffuser dans l'ensemble des pores. La colonne est équilibrée par un tampon, qui

peut être ou non le même que celui de l'échantillon. Après l'injection de l'échantillon, à la colonne, le tampon d'éluion transporte les molécules de l'échantillon vers la sortie de la colonne. Les molécules plus grosses – qui ne peuvent pas pénétrer dans les pores de la phase stationnaire – éluent d'abord de la colonne, suivies des molécules plus petites qui diffusent dans les pores, en les ralentissant par rapport aux molécules plus grosses. Si le tampon d'éluion est différent du tampon de l'échantillon, les molécules plus grosses sont déplacées des sels originaux et éluent dans ce nouveau tampon, complètement séparées du tampon d'échantillon original.

## Filtres Captiva à faible interaction protéique

Quelle que soit la préparation d'échantillon que vous effectuez, il est judicieux de filtrer votre échantillon avec un filtre à faible binding de protéines.

Les filtres PES Agilent offrent une faible interaction protéique cohérente avec la filtration des protéines. Les membranes du filtre PES constituent une meilleure option que les membranes PVDF pour la plupart des analyses LC. Le filtre PES Agilent présente une compatibilité similaire à celle des filtres PVDF pour les solvants LC courants et s'avère supérieur en terme d'interaction protéique et de propreté. Pour en savoir plus, visitez le site [agilent.com/chem/filtration](http://agilent.com/chem/filtration)

### Filtres PES Captiva

Diamètre (mm)	Taille pore (µm)	Certification	Boîtier	Référence
15	0,2	LC/MS	Polypropylène	5190-5096
4	0,45	LC	Polypropylène	5190-5095
4	0,2	LC/MS	Polypropylène	5190-5094
15	0,45	LC	Polypropylène	5190-5097
25	0,2	LC/MS	Polypropylène	5190-5098
25	0,45	LC	Polypropylène	5190-5099



Pour en savoir plus sur les colonnes Agilent de cartographie des peptides, visitez le site [agilent.com/chem/advancebio](http://agilent.com/chem/advancebio)

## Étape 2 : Sélection des agents de clivage

Deux méthodes permettent d'opérer le clivage de liaisons peptidiques : chimique et enzymatique. Le clivage chimique implique l'utilisation de réactifs nucléophiles non enzymatiques (par exemple, le bromure de cyanogène (CNBr)) pour opérer le clivage chimique de la liaison peptidique dans une région spécifique. Les enzymes protéolytiques (par exemple, la trypsine) se sont révélées extrêmement utiles pour une variété d'emplacements de clivage spécifiques au site. La méthode et l'agent de clivage dépendent de la protéine faisant l'objet du test et des attentes spécifiques quant aux résultats de l'analyse. En outre, le processus de sélection implique un examen attentif du processus intégral de cartographie des peptides et les caractérisations annexes doivent être prises en compte. La trypsine est l'agent de clivage le plus courant utilisé pour les cartes peptidiques, en raison de sa spécificité bien définie. La trypsine n'hydrolyse que les liaisons peptidiques où le groupement carbonyle est suivi soit d'une arginine (Arg), soit d'une lysine (Lys). Le **Tableau 2** présente des agents de clivage courants et leur spécificité.

Tableau 2

Type de clivage		
Type de clivage	Agent de clivage	Spécificité
Enzymatique	Trypsine	Côté C-terminal de l'arginine (Arg) et de la lysine (Lys)
	Pepsine	Non spécifique
	Chymotrypsine	Côté C-terminal des résidus hydrophobes
	Endopeptidase glutamyl	Côté C-terminal de Glu et Asp
Chimique	Bromure de cyanogène	Côté C-terminal de la méthionine (Met)
	Acide dilué	Asp et Pro
	BNPS-skatole	Trp

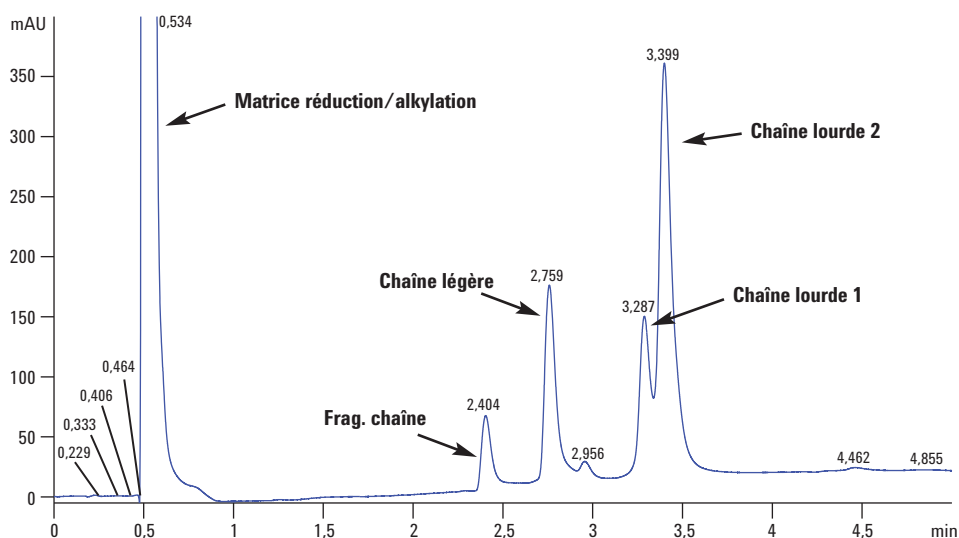
## Étape 3 : Dénaturation, réduction et alkylation

Pour que l'enzyme protéolytique effectue un clivage efficace des chaînes peptidiques, la plupart des échantillons doivent être dénaturés, réduits et alkylés à l'aide de divers réactifs. La dénaturation et la réduction peuvent souvent s'effectuer simultanément par une combinaison de chauffage et de réactif (par exemple, 1,4-dithiothréitol (DTT), mercaptoéthanol ou tris(2-carboxyethyl)phosphine). Le réactif le plus utilisé est le DTT, un agent réducteur puissant qui réduit les liaisons disulfure et empêche la formation de disulfure inter et intramoléculaire entre les cystéines d'une protéine. Combiner dénaturation et réduction des liaisons disulfure permet d'éviter la renaturation (un problème

lors de l'utilisation seule de la chaleur comme agent de dénaturation). Après la dénaturation et la réduction des protéines, l'alkylation de la cystéine est nécessaire pour réduire encore la renaturation potentielle. Les agents les plus utilisés pour l'alkylation d'échantillons de protéines avant digestion sont les acides iodoacétamide (IAM) et iodoacétique (IAA).

La **Figure 1** offre un bon exemple de méthode de séparation chromatographique en phase inverse utilisée pour évaluer l'exhaustivité de réduction et d'alkylation d'un anticorps monoclonal avant digestion.

Figure 1 – Profil de réduction/alkylation par chromatographie en phase inverse



**Figure 1** – Séparation en phase inverse d'un anticorps monoclonal réduit et alkylé avant protocole de digestion avec une colonne Haute Définition à Résolution Rapide (RRHD) Agilent, 2,1 x 50 mm (réf Agilent 857750-906). La séparation a été effectuée à 0,5 mL/min, 75 °C avec des conditions d'eau multisegmentées (0,1 % TFA)/ACN (0,08 %) sur un système de LC Agilent 1290 Infinity.

## Étape 4 : Digestion

Comme indiqué, la trypsine est la protéase la plus utilisée pour la digestion en raison de sa spécificité bien définie. Étant une protéine, elle peut se digérer elle-même dans un processus appelé autolyse. Cependant, le Ca<sup>++</sup>, naturellement présent dans la plupart des échantillons, se fixe à la boucle de liaison Ca<sup>++</sup> dans la trypsine et empêche l'autolyse. Avec la trypsine modifiée actuellement utilisée dans la plupart des laboratoires, l'autolyse est en outre réduite et ne pose généralement pas de problème.

La digestion trypsique s'effectue à un pH optimal compris dans la plage 7,5-8,5 et généralement à une température de 37 °C. Afin de fournir un pH optimal pour l'hydrolyse enzymatique, un tampon est ajouté (habituellement, 50 mM de bicarbonate de triéthylammonium (tABC) ou 12,5 mM de bicarbonate d'ammonium (ABC)) avant l'ajout de la trypsine. Un tampon 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol (Tris) peut aussi être utilisé à cette fin, mais il faut savoir que le tampon Tris n'est pas compatible avec l'analyse MS (par exemple, MALDI et ESI-MS) et doit être éliminé via une extraction en phase solide (SPE) ou ZipTips. Afin d'assurer une quantité suffisante – mais pas trop élevée – d'enzyme pour effectuer la digestion, il est crucial que le rapport enzyme-protéine soit le bon.

Les protéines peuvent se comporter différemment dans divers environnements et lorsque des protéines modèles ont été digérées dans un mélange, et non pas séparément, des digestions moins efficaces ont été observées. L'une des raisons à cela pourrait être que les sites de clivage sur la trypsine font l'objet d'une compétition plus forte lorsque plus de protéines sont digérées ensemble. En outre, de nombreux facteurs et paramètres expérimentaux peuvent affecter l'exhaustivité et l'efficacité de la digestion des protéines, provoquant une variété de résultats anticipés. Si ces facteurs sont compris ou contrôlés avec plus de soin, les résultats de la digestion peuvent être considérablement améliorés. Le pH de la réaction, le temps et la température de la digestion, ainsi que la quantité d'agent de clivage utilisée, sont tous des facteurs essentiels à l'efficacité de la digestion.

- **pH de digestion.** En général, le pH du mélange de digestion est déterminé de manière empirique pour assurer l'optimisation des performances d'un agent de clivage donné. Par exemple, lorsque du bromure de cyanogène est utilisé comme agent de clivage, un environnement hautement acide (par exemple, pH 2, acide formique) est nécessaire. Toutefois, lorsque c'est de la trypsine qui est utilisée comme agent de clivage, un environnement légèrement alcalin (pH 8) est idéal. En règle générale, le pH du milieu de réaction ne doit pas altérer l'intégrité chimique de la protéine durant la digestion ou la réaction de fragmentation.
- **Temps de digestion et température.** Le temps et la température sont essentiels pour une digestion optimale. Pour limiter les réactions chimiques, une température comprise entre 25 et 37 °C est adéquate – et recommandée – pour la plupart des digestions de protéines (par exemple, les digestions de trypsine s'effectuent généralement à 37 °C). Toutefois, ce sont en définitive le type et la taille de la protéine qui déterminent la température de la réaction, car la protéine est dénaturée à mesure que la température de la réaction augmente. Le temps de réaction est également un facteur à considérer dans l'optimisation du protocole de digestion. Si l'échantillon est disponible en quantité suffisante, une étude expérimentale doit être considérée afin de déterminer le temps optimal pour obtenir une carte reproductible tout en évitant une digestion incomplète. Le temps de digestion varie de 2 à 30 heures, selon la taille et le type de l'échantillon, et la réaction est stoppée par l'ajout d'un acide qui n'interfère pas avec la séparation, ou par congélation.
- **Concentration des enzymes de clivage.** La concentration de l'agent de clivage doit être minimisée pour éviter qu'il n'interfère avec le profil de la carte. Une quantité excessive d'agent de clivage est généralement utilisée pour réaliser un temps de digestion raisonnablement rapide (c'est-à-dire, 6 à 20 heures). Toutefois, ces quantités accrues doivent être considérées avec soin. Un rapport protéine-protéase compris entre 10:1 et 200:1 est généralement utilisé et il est recommandé d'ajouter l'agent de clivage en deux phases ou plus pour optimiser le clivage. C'est de cette manière qu'est ajoutée la trypsine dans de nombreuses procédures standard de digestion trypsique. Néanmoins, le volume de réaction final demeure suffisamment restreint pour permettre la séparation – prochaine étape dans les cartes peptidiques. Pour éliminer les artéfacts de digestion susceptibles d'interférer avec l'analyse qui suit, une détermination à blanc est effectuée à l'aide d'un contrôle de digestion contenant tous les réactifs, à l'exception de la protéine test.

La méthode de digestion de trypsine décrite ci-dessous et résumée aux **Figures 2 et 3** est une procédure courante utilisée de manière routinière pour la réduction, l'alkylation, la digestion en solution et l'extraction d'une protéine (0,5 mg). Cette procédure peut être adaptée à des quantités plus petites de protéines et, en outre, fournit une liste utile de réactifs et références Agilent.

## Figure 2 – Procédure de digestion à la trypsine (parties I-V)

**0,5 mg de protéines**  
**25 µL de solution mère de bicarbonate d'ammonium**  
**25 µL de TFE**  
**1,0 µL de solution mère de DTT**



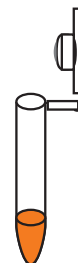
**1. Remettez en suspension, dénaturez et réduisez la protéine.**  
 (Vortex ; chauffage 1 h à 60 °C ou 20 min à 90 °C)

**Ajoutez 4,0 µL de solution mère d'IAM**



**2. Alkylez.**  
 Effectuez cette étape à l'abri de la lumière.  
 (1 h à temp. ambiante.)

**Ajoutez 1,0 µL de solution mère de DTT**



**3. Neutralisez l'IAM en excès.**  
 Effectuez cette étape à l'abri de la lumière.  
 (1 h à temp. ambiante.)

**Ajoutez 300 µL d'eau + 100 µL de solution mère de bicarbonate d'ammonium**



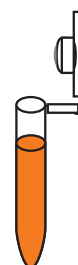
**4. Diluez et ajustez le pH.**  
 (pH 7-9)

**Ajoutez la solution mère de trypsine**



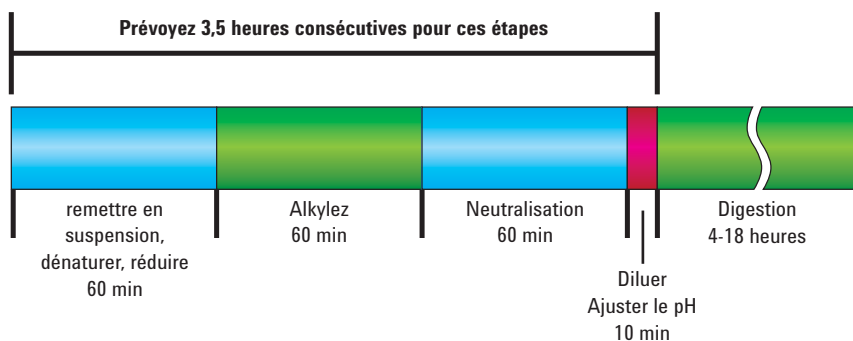
**5. Digestion**  
 (37 °C pour 4-18 heures)

**Ajoutez 1 µL d'acide formique ou TFA**



**6. Réduisez le pH à <4.**

## Figure 3 – Délai attendu de la procédure de digestion



## Réduction, alkylation, préparation de la solution de digestion : Récapitulatif

**100 mM de bicarbonate d'ammonium** : Ajoutez 100 mL d'eau à 0,7906 g de bicarbonate d'ammonium. Stockez au réfrigérateur à 4 °C pour une durée maximale de 2 mois.

**Solution mère de trypsine** : La trypsine modifiée peut être achetée : Trypsine qualité protéomique d'Agilent (réf. 204310, voir page suivante « Réactifs et équipement »). Elle est lyophilisée et peut être stockée sous cette forme à -20 °C pendant plus d'un an sans perte significative de l'activité. Lorsque nécessaire, préparez la solution mère de trypsine en hydratant la trypsine lyophilisée dans 100 µL d'acide acétique 50 mM, pour une concentration finale de 1 µg/mL. Pour minimiser les cycles de gel-dégel et accroître la stabilité du stockage, divisez la trypsine hydratée en quatre tubes d'environ 10 µL chacun. Stockez chaque aliquote à -20 °C dans un congélateur ne supprimant pas le givre. Cette solution 1 µg/µL est utilisée pour préparer la solution intermédiaire de trypsine selon les besoins (voir ci-dessous). Notez que la trypsine qualité protéomique d'Agilent est fournie avec les documents techniques indiquant un autre protocole pour la digestion tryptique. Nous avons utilisé la méthode ci-dessous et l'avons jugée simple et fiable.

**DTT 200 mM** : Ajoutez 1 mL d'eau à 0,031 g de DTT dans un tube Eppendorf 1,5 mL. Agitez. Divisez la solution DTT en aliquotes pratiques (par exemple, 100 µL) dans des tubes de microcentrifugeuse. Stockez chaque aliquote à -20 °C pour une durée maximale d'un mois dans un congélateur ne supprimant pas le givre. Ne recongelez pas après une décongélation.

**200 mM d'IAM (à préparer juste avant utilisation)** : Ajoutez 1 mL d'eau à 0,037 g d'IAM dans un tube Eppendorf 1,5 mL. Agitez.

### Protocole de digestion de la trypsine

#### Remise en suspension, dénaturation et réduction de la protéine

1. Ajoutez 0,5 mg de protéine en tout à un tube Eppendorf 0,5 mL.
2. Ajoutez 25 µL de solution mère de bicarbonate d'ammonium.
3. Ajoutez 25 µL d'agent de dénaturation TFE.
4. Ajoutez 1,0 µL de solution mère de DTT.
5. Agitez au Vortex pour mélanger.
6. Chauffez selon l'un des ensembles de conditions suivants pour dénaturer :
  - ✓ 60 °C pendant 45 minutes à 1 heure
  - ✓ 90 °C pendant 20 minutes (protéines hydrophiles) à 1 heure (protéines hydrophobes)
7. Refroidissez à la température ambiante.

#### Akylation

1. Ajoutez 4,0 µL de solution mère d'IAM.
2. Agitez au Vortex brièvement.
3. Incubez l'échantillon dans le noir (grille recouverte d'un papier aluminium) à température ambiante pendant 1 heure.

#### Neutralisation de l'IAM en excès

1. Ajoutez 1,0 µL de solution mère de DTT pour éliminer l'IAM en excès.
2. Laissez reposer 1 heure dans le noir (grille recouverte d'un papier aluminium) à température ambiante.

#### Ajustement de la dilution et du pH

1. Ajoutez 300 µL d'eau pour diluer le dénaturant.
2. Ajoutez 100 µL de solution mère de bicarbonate d'ammonium pour élever le pH.
3. Le cas échéant, vérifiez le pH en plaçant 0,5 à 1 µL sur une bande de papier indicateur de pH. La valeur standard est incluse entre 7,5 et 8,0. Il est plus important de vérifier le pH lorsque le pH de l'échantillon de départ n'est pas connu.
4. Ajoutez plus de base (bicarbonate d'ammonium) si le pH n'est pas compris dans la plage 7-9.

#### Digestion

1. Préparez une solution mère de trypsine à l'aide de la solution de stockage prévue à cet effet. Laissez 15 minutes pour la remise en suspension complète.
2. Si vous prévoyez de digérer moins de 20 µg de protéine au total, préparez une solution intermédiaire de trypsine en diluant la solution mère 10 fois par l'ajout de 45 µL d'eau ultrapure. Cette solution à 100 ng/µL peut être stockée à -20 °C pendant 2 mois sans perte d'activité significative.  
**ATTENTION : si l'IAM n'est pas détruit, il alkylera lentement les lysines.**
3. Ajoutez la solution mère de trypsine à 1:20 à 1:50 par masse d'enzyme:substrat. Par exemple, pour 500 µg de protéine, ajoutez entre 10 et 25 µg de trypsine (10 à 25 µL de solution mère de trypsine).
4. Agitez au Vortex brièvement.
5. Placez le tube dans le réchauffeur et incubez à 37 °C pendant 4 à 18 heures.
6. Refroidissez la solution.

#### Diminution du pH pour stopper l'activité de la trypsine

1. Ajoutez 1 µL d'acide formique ou de TFA pur pour réduire le pH et stopper l'activité de la trypsine.  
Si vous prévoyez de dessaler, utilisez le TFA car il aidera à retenir le peptide sur la résine pendant l'extraction.
2. Agitez brièvement.
3. Si le pH de l'échantillon original vous préoccupe, vérifiez le pH (3,0 à 3,3 généralement). Ajoutez plus d'acide si le pH est supérieur à 4.

#### Extraction de la digestion

1. Selon l'origine de l'échantillon, il sera peut-être nécessaire de procéder à un dessalage avant l'analyse MS.
2. Si le dessalage n'est pas nécessaire, mais que l'échantillon est opaque, filtrez-le avant la MS. Utilisez des filtres à centrifuger Agilent, réf. 5185-5990. L'opacité peut être due à des débris cellulaires dans l'échantillon.
3. Diluez un aliquote d'échantillon selon les besoins de l'analyse.  
Si la protéine présente une masse moléculaire de 50 kDa, et si la digestion est arrivée à terme, la solution est d'environ 20 pmol/µL.  
Si vous disposez d'un échantillon moins complexe, diluez pour obtenir une solution à 50 fmol/µL.

Pour en savoir plus sur les colonnes Agilent de cartographie des peptides, visitez le site

[agilent.com/chem/advancebio](http://agilent.com/chem/advancebio)

# Étape 5 : Traitement et enrichissement des digestions

Avant l'établissement de cartes peptidiques, une extraction et/ou un enrichissement sont généralement nécessaires pour la réussite de l'analyse. Il existe de nombreux types de méthodes pour procéder à l'extraction et à l'enrichissement, selon le type d'échantillon et le but recherché. Ainsi, l'enrichissement de MPT spécifiques (par exemple, phosphorylation, ubiquitination et glycosylation) s'effectue par la purification d'affinité à l'aide d'anticorps ou de ligands MPT, tandis que les phosphopeptides peuvent être enrichis par IP à l'aide d'anticorps anti-phospho ou par déroulement à l'aide de TiO<sub>2</sub>, qui lie de manière sélective la sérine phosphorylée, la tyrosine ou la thréonine.

Après l'enrichissement des peptides, les sels et les tampons peuvent être éliminés en utilisant des pipettes ou des colonnes C-18 ou graphite, et les détergents éliminés en utilisant des colonnes d'affinité ou des réactifs de précipitation. Les échantillons dilués peuvent aussi être concentrés à l'aide de concentrateurs de plages de seuils de poids moléculaire (MWCO) variables. Une fois purifiés, les échantillons de peptides sont prêts pour la préparation finale précédant l'analyse MS, qui varie selon le type d'analyse. Pour l'analyse LC/MS ou LC-MS/MS, le choix adéquat des phases mobiles et des réactifs d'appariement d'ions est nécessaire pour obtenir des résultats analytiques et une résolution LC corrects. La technique MALDI-MS nécessite de combiner les échantillons de peptides à des matrices spécifiques (molécules de colorant absorbant l'énergie cristalline), qui sont alors séchées sur des plaques MALDI avant analyse.

## Réactifs et équipement

### Équipement nécessaire

Exemple	
Bicarbonate d'ammonium, qualité Réactif	Catalogue Sigma réf. A-6141
Dithiothréitol (DTT), >99+ %	Catalogue Sigma réf. D-5545
Iodoacétamide (IAM), 97 %	Catalogue Sigma-Aldrich réf. I-670-9
Trifluoroéthanol (TFE), 99+ %	Catalogue Sigma-Aldrich réf. T63002-100G
Trypsine, modifiée	Trypsine qualité protéomique d'Agilent (réf. 204310)
Eau, 18 mégohm ou équivalent	Agilent réf. 8500-2236
Acide formique, qualité Analyses ou acide trifluoroacétique, qualité Séquençage	Agilent réf. G2453-85060
Tubes Eppendorf Safe-Lock, naturels, non siliconé	Eppendorf réf. 022363611 (0,5 mL, boîte de 500)ou réf. 022363204 (1,5 mL, boîte de 500)

### Micropipettes et embouts : plage 1-1000 µL

Réchauffeur/agitateur de tube	Thermomixer Eppendorf
Papier indicateur de pH, plages de pH 2,5-4,5 et 7,0-9,0	Languettes EM Science ColorpHast, n° de catalogue 700181-2

### Balance analytique

Embouts Bond Elut OMIX, 10 µL (volume d'élution 2-10 µL)	1 x 96 embouts (réf. Agilent A5700310) ; 6 x 96 embouts (réf. Agilent A5700310K)
Embouts Bond Elut OMIX, 100 µL (volume d'élution 10-100 µL)	Embouts 1 x 96 (réf. Agilent A57003100) ; embouts 6 x 96 (réf. Agilent A57003100K)



## Pour les faibles volumes de peptides à extraire : Embouts Bond Elut OMIX

### Méthode Bond Elut OMIX (volume de 10 µL) pour l'extraction de digestion de peptide

<b>Prétraitement de l'échantillon</b>	Ajustez l'échantillon à une concentration d'acide trifluoroacétique (TFA) de 0,5 %-1,0 % en utilisant une solution TFA à 2,5 %.
<b>Conditionnement et équilibrage</b>	Aspirez 10 µL d'ACN:eau 50:50 et jetez le solvant. Répétez l'opération. Aspirez 10 µL d'une solution TFA à 1,0 % et jetez le solvant. Répétez l'opération.
<b>Dépôt de l'échantillon</b>	Aspirez jusqu'à 10 µL d'échantillon prétraité dans un embout OMIX. Aspirez et repoussez les échantillons 3 à 5 fois pour une efficacité optimale. Jusqu'à 10 cycles peuvent être utilisés pour une rétention améliorée.
<b>Rinçage</b>	Aspirez 10 µL de tampon contenant 0,1 % de TFA et jetez le solvant. Répétez l'opération.
<b>Élution</b>	Analyse LC/MS ou LC/MS/MS : Aspirez 2-10 µL d'une solution composée d'acide formique 0,1 % et 50 à 75% d'acétonitrile ou méthanol puis transférez dans un flacon ou une plaque 96-puits.

Pour des résultats optimaux, ajustez la pipette en fonction du volume d'embout – 10 µL – pour les étapes de stabilisation, de dépôt de l'échantillon et de rinçage. Pour l'élution, aliquotez le volume exact de solution d'élution dans un contenant et maintenez votre pipette sur le paramètre de volume maximal en fonction du volume d'embout, 10 µL.

## Pour des applications de peptides à hauts débits : Solutions de préparation d'échantillons automatisées pour cartes peptidiques

*"Combiner une digestion parallélisée extrêmement cohérente avec une extraction en phase inverse automatisée via AssayMAP nous a permis d'envisager des études collaboratives d'une ampleur sans précédent."*

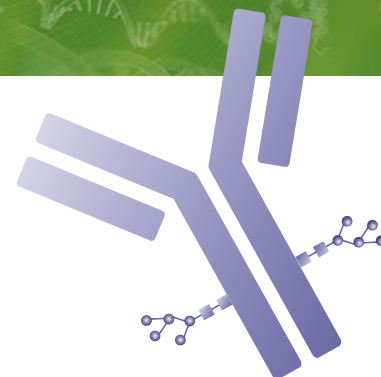
*Jacob D. Jaffe, Ph.D.  
Directeur adjoint – Plateforme  
protéomique*



pour plus d'informations sur la préparation automatisée des échantillons pour cartes peptidiques **page 22**.

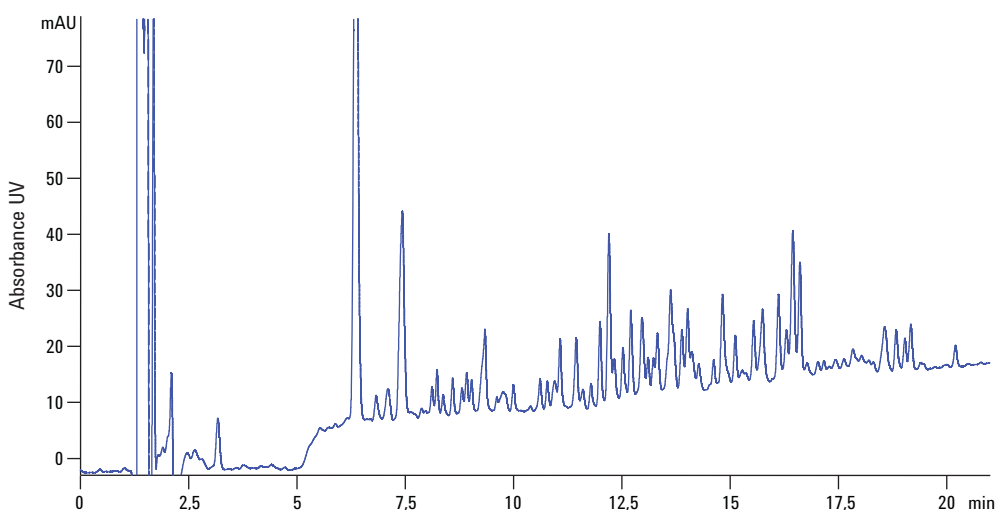
Pour en savoir plus sur les colonnes Agilent de cartographie des peptides, visitez le site  
[agilent.com/chem/advancebio](http://agilent.com/chem/advancebio)

# Chromatographie en phase inverse – Le choix qui s'impose pour les cartes peptidiques



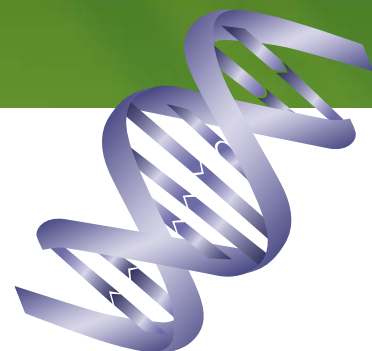
La sélection d'une colonne et d'une méthode pour générer des cartes peptidiques dépend en définitive de la protéine mise sur carte et des objectifs de productivité. La technique chromatographique la plus utilisée pour les cartes peptidiques, en particulier dans l'industrie biopharmaceutique, est la chromatographie en phase inverse (RPC). Un pouvoir de résolution excellent et l'utilisation de phases mobiles volatiles (compatibles avec la spectrométrie de masse) ont permis à cette technique de s'imposer comme la méthode HPLC prédominante pour la plupart des séparations de peptides. Elle est supérieure aux autres modes de séparations HPLC à la fois en termes de vitesse et d'efficacité. La **Figure 4** affiche une séparation de peptides bien résolue utilisant de l'albumine de sérum de bovin et illustre la multitude des fragments de pics de peptides pouvant être résolus en employant la RPC pour les cartes peptidiques.

**Figure 4 – Cartographie peptidique en phase inverse**



**Figure 4** – Séparation en phase inverse de BSA avec une colonne 2,0 x 150 mm Agilent Polaris C18-A, (réf. Agilent A2001150X020).

# Prérequis pour une Cartographie peptidique réussie



L'approche générale dans le développement d'une méthode RPC pratique pour les cartes peptidiques nécessite une bonne compréhension des prérequis des colonnes peptidiques et du développement de la méthode chromatographique. Bien qu'un grand nombre des mêmes principes chromatographiques s'appliquent à la séparation des peptides en comparaison avec les séparations de petites molécules, il existe des variables dépendant

des conditions pour optimiser la méthode peptidique et obtenir une séparation reproductible et solide. La sélection et la qualité des colonnes, la sélection de la phase mobile et les besoins en détection sont chacun un composant essentiel aux séparations peptidiques et peuvent améliorer considérablement la qualité de vos cartes peptidiques.

## Sélection de colonnes

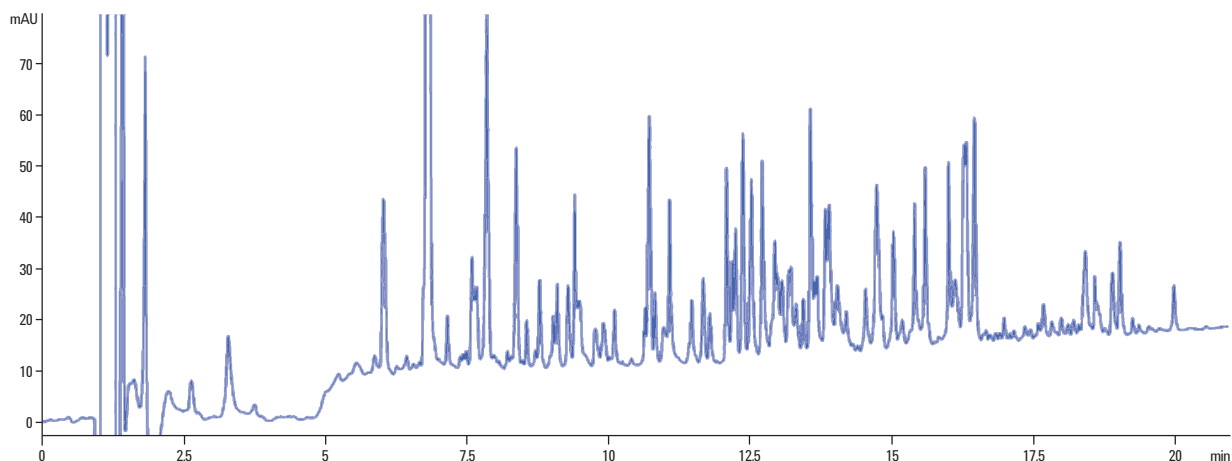
L'aspect majeur pour obtenir une carte peptidique bien résolue et fiable réside dans la sélection d'une colonne appropriée. La taille des pores, le type et la taille des particules, la phase stationnaire et la stabilité (greffage et remplissage) jouent tous un rôle significatif dans la séparation des cartes peptidiques, la stratégie d'optimisation et l'analyse spectrométrique. Pour les séparations peptidiques, les tailles de pore les mieux adaptées varient de 100 à 120 Å, tandis que la meilleure sélection de phase est généralement C18. Bien que certaines colonnes commerciales offrent des tailles de pore pour les peptides allant jusqu'à 60 Å, celles-ci sont généralement liées à des séparations de fragments de peptides plus petits ou à des analyses standard. De même, des longueurs de chaîne de carbone de phase greffée plus petites sont utilisées, mais celles-ci sont liées à des méthodes spécifiques et, dans la pratique, sont limitées dans l'obtention d'une rétention à travers un large spectre d'hydrophobicité peptidique.

Les séparations de peptides fournissent moins de plateaux en raison de leurs coefficients de diffusion plus élevés et ont favorisé l'utilisation de colonnes capillaires totalement poreuses de diamètre plus faible à des débits plus lents. Ceci a résulté en une augmentation des remplissages de moins de 2 µm pour obtenir des cartes peptidiques plus efficaces. Toutefois, plus récemment, les colonnes superficiellement poreuses se sont avérées de plus en plus appréciées pour les séparations biologiques – en particulier dans l'industrie biopharmaceutique – car elles prennent en compte les limitations de la diffusion en masse des protéines et des peptides. Ces colonnes offrent un chemin de diffusion plus court permettant les séparations de molécules plus grosses à des vitesses linéaires élevées, sans que se produisent les augmentations de contre-pression du système liées aux particules plus petites. La **Figure 5** fournit un exemple de carte peptidique à haute résolution rapide utilisant une colonne superficiellement poreuse.



Pour en savoir plus sur les colonnes Agilent de cartographie des peptides, visitez le site [agilent.com/chem/advancebio](http://agilent.com/chem/advancebio)

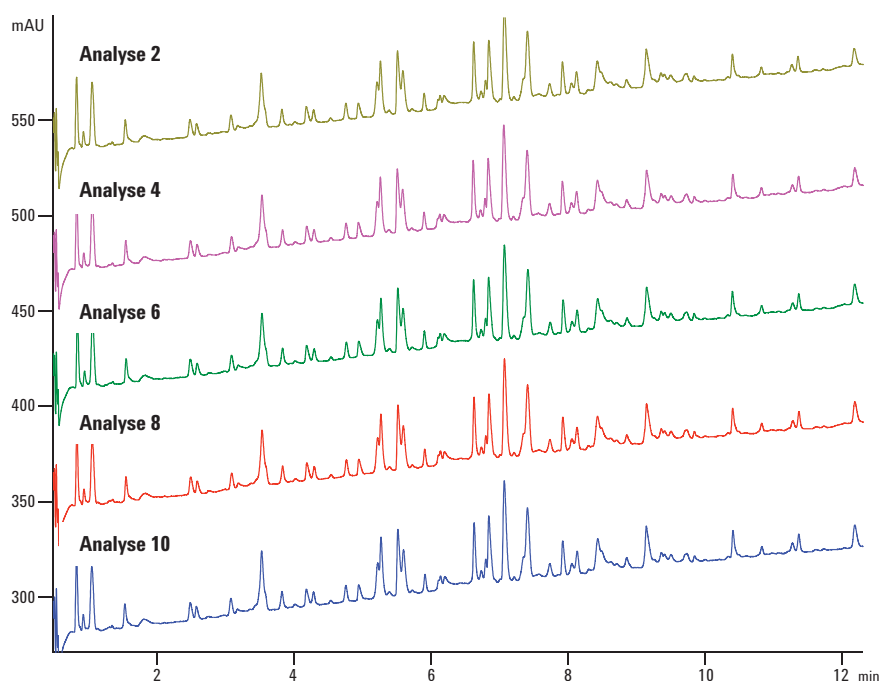
## Figure 5 – Séquence de carte peptidique haute résolution rapide et efficace d'albumine de sérum de bovin (BSA)



**Figure 5** – Séparation en phase inverse de BSA avec une colonne 2,1 x 150 mm AdvanceBio Peptide Mapping (réf. Agilent 653750-902). La séparation de cartes peptidiques a été effectuée à 0,3 mL/min, 40 °C avec un gradient linéaire eau (0,1 % TFA)/ACN (0,08 % TFA).

La qualité de la colonne – reproductibilité et stabilité d'une analyse à l'autre – est un prérequis critique, et parfois négligé, au maintien de séparations de cartes peptidiques reproductibles et solides. Les séparations de peptides en phase inverse sont généralement effectuées à un pH faible (pH<3) et à des températures élevées (>40 °C). Les cartes peptidiques peuvent reposer sur l'utilisation répétée de la colonne pour fournir des empreintes cartographiques précises et des protocoles de validation répétés. Dans le choix d'une colonne destinée à des cartes peptidiques, la qualité de la colonne doit être le facteur de décision numéro un. La **Figure 6** offre un excellent exemple d'une carte peptidique reproductible d'un digestat trypsique d'anticorps monoclonaux séparé à faible pH et à température élevée pendant une analyse LC/MS.

## Figure 6 – Reproductibilité de carte peptidique pendant une analyse en LC/MS



**Figure 6** – Cinq injections de réplicats d'un digestat trypsique des anticorps monoclonaux avec une colonne AdvanceBio Peptide Mapping 2,1 x 150 mm (réf. Agilent 653950-302) sur un système de LC Agilent 1200 couplé à un 6520 Q-TOF. La séparation a été effectuée à 0,3 mL/min, 40 °C avec un gradient eau (0,1 % HCOOH)/ACN (0,1 % HCOOH).

# Sélection de la phase mobile

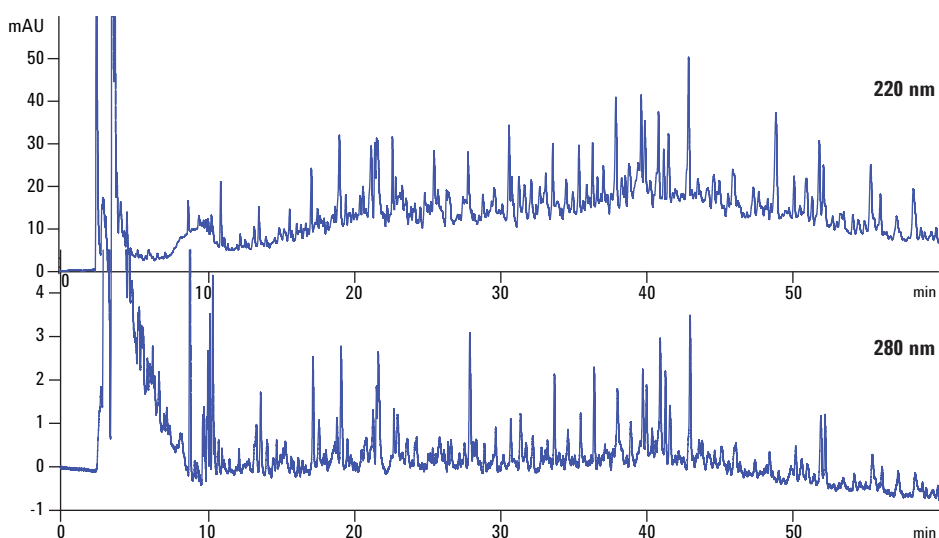
Le solvant le plus utilisé pour les cartes peptidiques est l'eau mélangée à l'acétonitrile qui sert de modifiant organique. Il est recommandé de ne pas utiliser plus de 0,1 % d'agents d'appariement d'ions. Dans certaines circonstances, du n-propanol ou de l'isopropanol peut être ajouté pour solubiliser les composants de digestion, à condition que cet apport n'augmente pas indûment la viscosité des composants. Des phases mobiles tamponnées contenant du phosphate sont utilisées pour apporter une certaine flexibilité dans la sélection des conditions de pH, car les décalages de pH dans la plage 3,0-5,0 améliorent la séparation des peptides contenant des résidus acides (par exemple, acides glutamiques et aspartiques). Des phosphates de sodium ou de potassium, de l'acétate d'ammonium et de l'acide phosphorique à un pH compris entre 2 et 7 (ou supérieur pour les supports à base de polymère) ont également été utilisés avec des gradients acétonitrile. L'acétonitrile contenant de l'acide trifluoroacétique est très souvent utilisé.

## Détection

La détection des peptides se produit généralement de 210 à 220 nm et/ou à 280 nm (Figure 7). La détection à 280 nm s'effectue souvent parallèlement à la détection à 210 nm dans les cartes peptidiques. Le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine sont sensibles à 280 nm tandis que la détection à 210 nm ne détecte pas un hôte d'autres substances biologiques dans la matrice d'échantillon. Toutefois, la sensibilité à 210 et 220 nm est deux à quatre fois supérieure à la sensibilité à 280 nm. En outre, un facteur relève d'une certaine importance pour le profil de détection

des cartes peptidiques : le mélange de 0,1 % TFA dans l'eau (solvant A) et de 0,08 % TFA dans l'acétonitrile (solvant B), qui est utilisé pour minimiser la dérive de la ligne de base provoquée par des changements dans l'absorbance au fil du gradient d'élution. La **Figure 7** fournit un exemple de comparaison d'une séparation de cartes peptidiques alors que la longueur d'onde varie entre 220 et 280 nm et détaille les différences dans la sensibilité d'absorbance et les profils de pics d'UV.

Figure 7 – Cartes peptidiques à différentes longueurs d'onde



**Figure 7** – Colonne AdvanceBio Peptide Mapping (réf. Agilent 651750-902), 2,1 x 250 mm, profilage de digestion e.coli à 220 nm (haut) et 280 nm (bas) sur un système de LC Agilent 1290 Infinity.

Pour en savoir plus sur les colonnes Agilent de cartographie des peptides, visitez le site

[agilent.com/chem/advancebio](http://agilent.com/chem/advancebio)

# Développement d'une méthode efficace de cartographie de peptides



L'approche générale dans le développement d'une méthode RPC pour une carte peptidique est la même que celle observée dans le développement des méthodes RP courantes. Toutefois, il existe des conditions spécifiques uniques au développement de cartes peptidiques. Cette section fournit une approche de base recommandée pour préparer une carte peptidique bien résolue via (1) l'optimisation des conditions de gradient pour la rétention, (2)

des variables pour le changement de la sélectivité et (3) l'optimisation accrue des conditions de colonne en vue d'un meilleur compromis entre le temps d'analyse et la résolution. À chaque étape du développement de cette méthode, une attention particulière doit être accordée au type d'échantillon et au but recherché de vos cartes peptidiques.

## (1) Optimisation des conditions de gradient

Un gradient tampon à pH acide/ACN est toujours hautement recommandé pour la séparation des peptides, car celui-ci :

- Permet la séparation d'un large éventail de types et structures de peptides.
- Élimine l'ionisation des silanols, qui peuvent donner des interactions indésirables avec les chaînes latérales aminées basiques dans la molécule avec pour conséquence de mauvaises formes de pics.
- Aide à dénaturer le fragment de peptide, ce qui améliore la rétention et la résolution.
- Permet une détection dans la région basse de l'UV (<210 nm) pour maximiser la sensibilité de la détection.
- Fournit des pics plus étroits grâce à la viscosité plus faible de la phase mobile.
- Augmente la rétention des peptides faiblement retenus de petite taille par appariement d'ions avec la terminaison amine libre et les acides aminés basiques (lorsque du TFA est utilisé dans le tampon).

Du propanol ou de l'isopropanol (IPA) peut remplacer l'ACN comme modifiant organique pour assurer une meilleure récupération des peptides hydrophobes. Toutefois, ils sont plus visqueux et induisent une contre-pression de colonne plus élevée et des pics un peu plus larges dans certains cas. Ces solvants nécessitent aussi une longueur d'onde plus élevée pour la détection (>220 nm) et perdent en sensibilité de détection.

La plupart des peptides sont élués avec moins de 60 % d'ACN, mais il arrive qu'une concentration en d'ACN plus élevée soit requise. 0 à 60 % en 45 minutes (2 %/min) constitue un bon point de départ pour l'établissement initial d'une carte peptidique. Toutefois, un gradient plus faible est souvent nécessaire dans la méthode finale pour obtenir la résolution souhaitée. La pente du gradient, ou le %B/min, détermine la rétention moyenne ( $k'$ ) d'une bande d'échantillon pendant sa migration à travers une colonne. La valeur de  $k'$  dépend des dimensions de la colonne, du débit, de la masse de l'échantillon et de la pente du gradient.

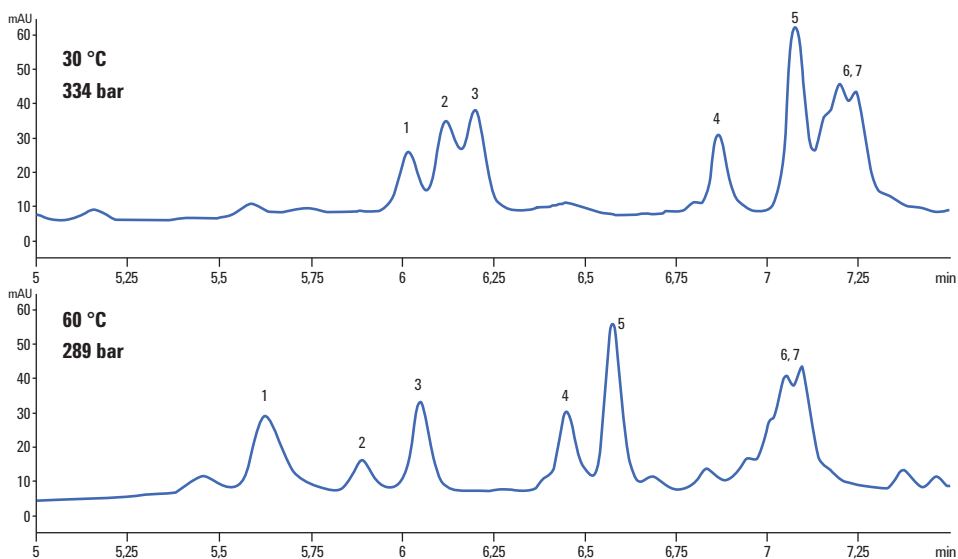
## (2) Variables de changement de la sélectivité ( $\alpha$ ) de la carte peptidique

Les chromatographistes utilisant des échantillons biologiques reportent généralement un changement des conditions de colonne (N) au moment où l'espacement des pics ( $\alpha$ ) est amélioré. Les changements dans la température et la pente du gradient sont pratiques à effectuer (aucun changement dans la phase mobile ou la colonne) et doivent être examinés en premier afin d'améliorer l'espacement des pics ( $\alpha$ ) pour optimiser une cartographie peptidique.

Un changement dans la température est un moyen puissant de changer la sélectivité et peut entraîner une inversion de la rétention pour les résidus peptidiques particuliers. Élever la température d'une cartographie peptidique produit des pics plus étroits, diminue la contre-pression du système et change la sélectivité. Une température initiale de 30-50 °C est recommandée. Cependant, la température optimale d'une séparation de peptides particulière dépendra de nombreux facteurs, selon le type et la composition de la digestion. Certains peptides très hydrophobes nécessitent une température de 60-80 °C pour une récupération maximale, tandis que la sélectivité pour un échantillon donné sera souvent idéale pour une température spécifique comprise dans la plage 30-60 °C.

La **Figure 8** détaille une comparaison entre deux régions de gradient identiques lorsque la température a été augmentée de 30 °C (chromatogramme supérieur) à 60 °C (chromatogramme inférieur) pour une digestion trypsique de myoglobine. À une température élevée de 60 °C, le profil de séparation montre des changements dans la forme et la position des pics 1-7. Clairement, certains des changements notables survenant dans cette région du chromatogramme résident dans la séparation améliorée entre les pics 1, 2 et 3 et les différences de positionnement des bandes (sélectivité) entre les pics 4 et 5.

**Figure 8 – Effet de la température sur la sélectivité pour une digestion trypsique de myoglobine**



**Figure 8** – Séparations en gradient d'une digestion trypsique de myoglobine à 5,0-8,0 min d'un gradient de 20 min avec une colonne AdvanceBio Peptide Mapping 2,1 x 150 mm (réf. Agilent 653950-302). Les deux séparations ont été effectuées avec un gradient linéaire (1,0 % TFA)/ACN (0,08 % TFA) d'eau, 0,3 mL/min à 215 nm sur un système de LC Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary. Le chromatogramme supérieur a été séparé à une température de 30 °C et le chromatogramme inférieur à une température de 60 °C.



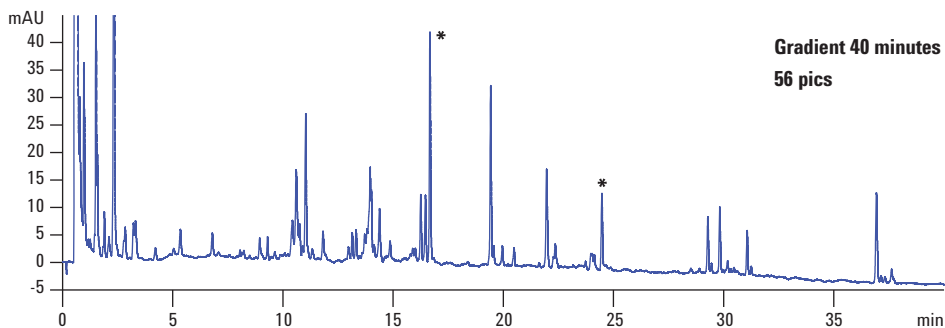
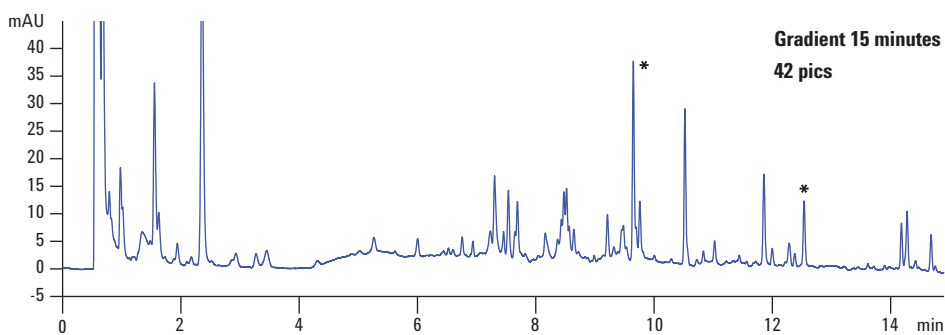
**BIO  
inert**

Pour en savoir plus sur les colonnes Agilent de cartographie des peptides, visitez le site [agilent.com/chem/advancebio](http://agilent.com/chem/advancebio)

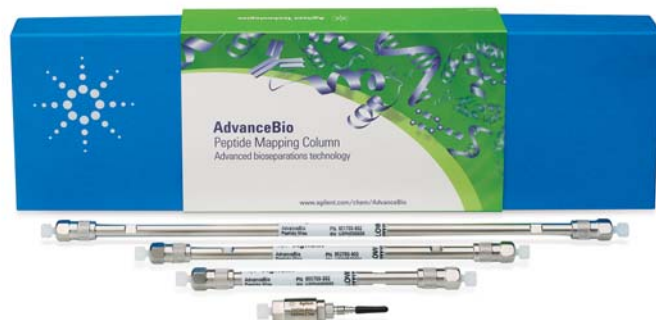
Des changements dans la pente du gradient peuvent aussi considérablement améliorer l'espacement des pics et modifier la sélectivité de la séparation des cartes peptidiques. On peut faire varier la pente du gradient de deux manières, soit en maintenant le débit constant et en redéfinissant le temps de gradient, plus court (augmentation de la pente) ou plus long (diminution de la pente), soit en maintenant le temps de gradient constant et en changeant le débit.

La **Figure 9** illustre les changements de sélectivité résultant de pentes de gradient variables. À l'aide d'une digestion de peptide tryptique de myoglobine, un gradient à forte pente de 15 minutes (chromatogramme supérieur) a été comparé à un gradient plus long de 40 minutes (chromatogramme inférieur), les deux séparations étant maintenues à un débit de 0,6mL/min à 50 °C. Une comparaison au niveau des chromatogrammes (et l'identification des mêmes pics (astérisques) pour chaque séparation) révèle de nombreux changements dans l'espacement entre les pics, le nombre de pics et la forme des pics.

**Figure 9 – Effet de la pente de gradient pendant une séparation d'une digestion tryptique de myoglobine**



**Figure 9 – Séparations en gradient d'une digestion tryptique de myoglobine avec une colonne AdvanceBio Peptide Mapping 2,1 x 150 mm (réf. Agilent 653950-302) sur un système de LC Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary utilisant un gradient linéaire (1,0 % TFA)/ACN (0,08 % TFA) d'eau, 0,6 mL/min à 50 °C. Le chromatogramme supérieur a été effectué en 15 minutes et le chromatogramme inférieur en 40 minutes. Les astérisques figurant dans chaque chromatogramme représentent les pics identiques.**



### (3) Ajustement des conditions de colonne pour une plus grande optimisation

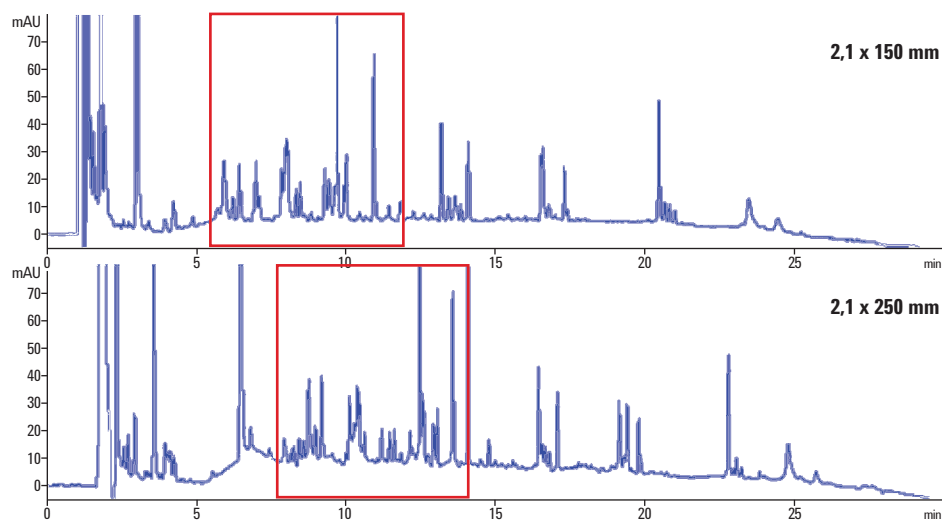
Une fois le gradient optimisé en termes de rétention ( $k'$ ) et de sélectivité ( $\alpha$ ), d'autres améliorations peuvent être apportées à la séparation en faisant varier la longueur de colonne et le débit. Le choix du paramètre d'analyse à faire varier dans l'élution en gradient est essentiellement le même que pour la séparation isocratique. Dans les deux cas, des valeurs d'efficacité ( $N$ ) plus élevées peuvent être obtenues au prix de temps d'analyse plus longs. Pour de faibles améliorations dans la résolution, où une augmentation du temps d'analyse est moins importante, il est conseillé de réduire le débit. Néanmoins, lorsqu'une augmentation plus grande de la résolution est nécessaire, une augmentation de la longueur de colonne est généralement préférable. Si la résolution est plus élevée que nécessaire après l'optimisation de la sélectivité, cette résolution excessive peut être échangée contre un temps d'analyse plus court en augmentant le débit et/ou en réduisant la longueur de colonne. La **Figure 10** fournit un exemple de résolution de cartes peptidiques améliorée pour une digestion trypsique de myoglobine une fois la longueur de colonne augmentée de 150 à 250 mm. Dans cette comparaison, les conditions et le temps de gradient ont été maintenus constants alors que la longueur de colonne passait de 150 à 250 mm. Un cadre rouge a été ajouté aux mêmes aires des séparations pour souligner la résolution accrue due à la longueur de 250 mm et mettre l'accent sur les gains en termes de capacité de pics par unité de temps.

L'élution en gradient, les variables ultérieures associées dans l'optimisation de la sélectivité et les optimisations de condition de colonne décrites aux points (1), (2) et (3) ci-dessus constituent des stratégies de base éprouvées pour améliorer une stratégie de séparation incluant des cartes peptidiques. Les méthodes décrites ci-dessus sont décrites au mieux dans les étapes suivantes :

#### Étapes du développement d'une méthode de séparation de cartes peptidiques

1. **Sélectionnez les conditions de gradient initiales : longueur des colonnes, composition de la phase mobile, débit, température et détection.** La séparation initiale doit être optimisée pour la rétention ( $k'$ ). Ceci nécessite un gradient ne présentant pas une pente trop forte.
2. **Optimisez le gradient.** Ceci permet de minimiser le temps d'analyse en éliminant l'espace gaspillé au début et à la fin du chromatogramme.
3. **Faites varier la sélectivité.** Si l'on observe des pics se chevauchant ou un temps d'analyse trop long, les options d'ajustement de la sélectivité peuvent être essayées.
4. **Pensez à la forme du gradient.** Un plus grand espacement entre les pics est possible en utilisant une forme de gradient non linéaire comme option d'amélioration supplémentaire de la préparation.
5. **Ajustez les conditions de colonne.** Lorsque l'espacement entre les pics et la sélectivité sont optimisés, envisagez de faire varier le temps d'analyse et/ou la longueur des colonnes pour améliorer la résolution et/ou la vitesse d'analyse.

Figure 10 – Effet de la longueur de colonne sur la résolution



**Figure 10** – Effet de la longueur de colonne sur la résolution, une comparaison de cartes peptidiques utilisant une digestion trypsique de myoglobine (réf. Agilent 651750-902). Les aires mises en surbrillance en rouge indiquent les zones de séparation identiques pour souligner la résolution et la forme de pic. Les séparations ont été effectuées avec une colonne AdvanceBio Peptide Mapping 2,1 x 150 mm (réf. Agilent 651750-902), sur un système de LC Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary utilisant un gradient linéaire (1,0 % TFA)/ACN (0,08 % TFA) d'eau, 10-60 % B en 30 minutes, 0,3 mL/min, 45 °C.

Pour en savoir plus sur les colonnes Agilent de cartographie des peptides, visitez le site

[agilent.com/chem/advancebio](http://agilent.com/chem/advancebio)

# Caractérisations de cartes peptidiques par spectrométrie de masse



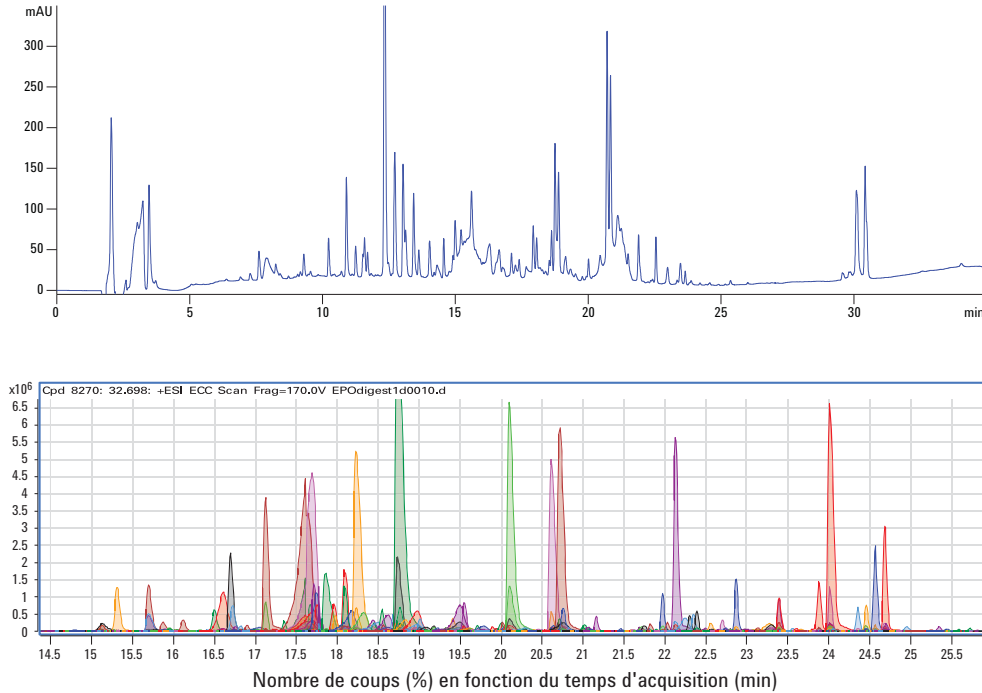
L'utilisation de RPC avec la spectrométrie de masse a fait de cette technique combinée la méthode de choix pour caractériser les peptides et les cartes peptidiques. Par exemple, dans l'industrie biopharmaceutique, établir et surveiller l'identité de séquence d'une cible thérapeutique est crucial et la stabilité d'une protéine biothérapeutique est un aspect important du développement thérapeutique pour surveiller les modifications telles que l'oxydation, la réduction, la glycosylation et la troncature. La MS peut être utilisée comme un test de pureté non obligatoire pour établir la stabilité génétique d'un produit à travers son cycle de vie. Les peptides sont analysés par spectrométrie de masse via l'infusion directe des peptides isolés (ou via l'utilisation d'un système LC/MS pour l'analyse de structure), puis mis en corrélation avec la séquence d'acides aminés de protéines. Les peptides identifiés confirment ainsi les séquences d'acides aminés spécifiques couvertes par la carte peptidique, ainsi que l'identité de la protéine. Les cartes peptidiques de spectrométrie de masse sont utilisés pour :

- Confirmer l'identité d'une protéine spécifique.
- Obtenir la caractérisation détaillée de la protéine (par exemple, la confirmation des peptides N-terminaux et C-terminaux, les cartes peptidiques de couverture haute séquence, les substitutions d'acides aminés, etc.).
- Analyser et identifier les modifications post-traductionnelles (par exemple, glycosylations, liaisons disulfure, acide pyroglutamique N-terminal, oxydation de méthionine et de tryptophane, etc.).

En général, les types d'analyse MS incluent l'électronébulisation et le MALDI-TOF-MS, ainsi que le bombardement atomique rapide (FAB). Une configuration MS en tandem a également été utilisée pour séquencer une protéine modifiée et déterminer le type de modification d'acides aminés qui s'est produit. En utilisant l'ionisation par électronébulisation (ESI) ou la technique MALDI-MS, les peptides protéolytiques peuvent être ionisés intacts dans la phase gazeuse et leurs masses mesurées précisément. La plupart des séparations de peptides s'effectuent avec des instruments de LC/MS d'ionisation par électronébulisation (ESI), en raison de l'aspect pratique du couplage LC et de la meilleure qualité du spectre de masse en tandem pour une identification fiable des protéines. Par exemple, un instrument MS quadripôle à temps de vol (QTOF) fournit souvent plus d'informations structurales, en particulier pour les peptides de plus grande taille, grâce à son pouvoir de résolution élevé et à sa précision en masse.

Selon les informations MS, des protéines peuvent être facilement identifiées dans lesquelles des masses mesurées sont comparées aux valeurs prédites dérivées de la protéine intacte ou de la base de données de protéines pour élucider les informations de couverture de masses et de séquences. L'objectif de la caractérisation d'une protéine via les cartes peptidiques est de procéder au rapprochement et à la représentation d'une couverture de séquence d'au moins 95 % de la composition théorique de la structure de la protéine. La **Figure 11** est un exemple de carte peptidique hautement optimisée de digestion d'érythropoïétine (EPO) obtenue en ESI-MS. Les conditions chromatographiques optimisées et les paramètres MS ont permis une couverture de séquence de 100 % et mettent en avant une séparation de cartes peptidiques bien caractérisée.

## Figure 11 – Carte peptidique optimisée de protéines EPO fournissant une couverture des séquences à 100 %



**Figure 11** – le chromatogramme supérieur affiche une séparation de cartes peptidiques de digestion EPO pleinement optimisée effectuée sur une colonne AdvanceBio Peptide Mapping 2,1 x 150 mm. Le chromatogramme inférieur indique l'analyse qualitative (utilisant un extracteur de motif moléculaire) pour la couverture des séquences générée par un système Agilent Q-TOF.

### Guide de commande

Pour les cartes peptidiques, Agilent recommande :

#### AdvanceBio Peptide Mapping – le premier choix pour la plupart des applications

Description	Référence	Fast Guard Référence
4,6 x 150 mm, 2,7 µm	653950-902	850750-911
3,0 x 150 mm, 2,7 µm	653950-302	853750-911
2,1 x 250 mm, 2,7 µm	651750-902	851725-911
2,1 x 150 mm, 2,7 µm	653750-902	
2,1 x 100 mm, 2,7 µm	655750-902	

\*Les précolonnes Fast Guards prolongent la durée de vie des colonnes sans ralentir la séparation ni affecter la résolution.

#### ZORBAX RRHD 300-C18 pour une digestion incomplète ou des échantillons contenant un cœur hydrophobe

Description	Référence
2,1 x 50 mm, 1,8 µm	857750-902
2,1 x 100 mm, 1,8 µm	858750-902



#### ZORBAX RRHD 300-HILIC pour des données supplémentaires sur les peptides hydrophiles et les glycopeptides

Description	Référence
2,1 x 50 mm, 1,8 µm	857750-901
2,1 x 100 mm, 1,8 µm	858750-901

#### Mélange étalon pour le Contrôle-Qualité des peptides

Utilisez le mélange étalon pour le Contrôle-Qualité 10-Peptide d'Agilent, le même étalon qu'Agilent utilise pour effectuer le contrôle qualité de ses colonnes, afin d'évaluer les performances de votre colonne au cours de sa vie. Il peut être utilisé pour l'HPLC ou la LC/MS. Environ 20 injections par flacon.

Description	Référence
Mélange étalon pour le Contrôle-Qualité des peptides, 71 µg dans un flacon 2 mL	5190-0583

Pour en savoir plus sur les colonnes Agilent de cartographie des peptides, visitez le site [agilent.com/chem/advancebio](http://agilent.com/chem/advancebio)

# Préparation des échantillons peptidiques pour l'analyse par spectrométrie de masse intelligemment automatisée

La préparation manuelle des échantillons de peptides est un processus long. Si vous effectuez des applications de cartes peptidiques sur un système MS, vous chercherez probablement à augmenter la fréquence. Et vous dépendrez d'un débit d'analyses de bout en bout hautement reproductible pour garantir des résultats cohérents.

AssayMAP transforme les protocoles de digestion, d'extraction et de fractionnement pour permettre une précision et un débit auparavant impossibles à obtenir :

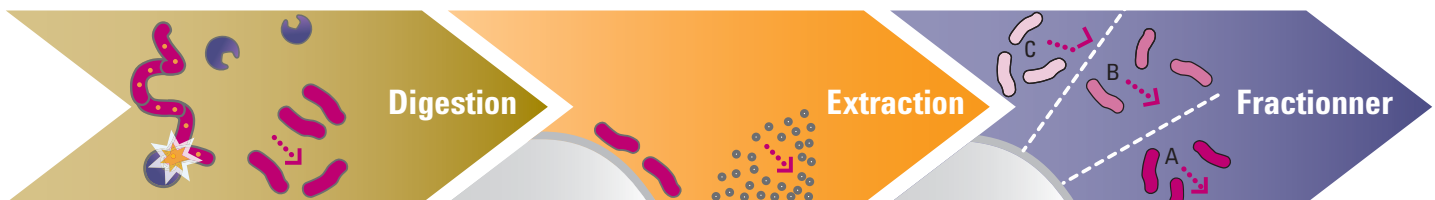
- Reproductibilité améliorée, due à moins d'erreurs humaines – <5 % CV
- Débit accru – jusqu'à 384 échantillons chaque jour
- Réduit significativement le temps de manipulation – ce qui libère les scientifiques qui peuvent alors effectuer des travaux analytiques
- Développement plus rapide des méthodes – la plateforme automatisée vous permet d'optimiser rapidement les méthodes



La solution de préparation d'échantillons de peptides AssayMAP repose sur la combinaison puissante de la chromatographie sur cartouche miniaturisée, la plateforme de manipulation des liquides Bravo d'avant-garde et une interface utilisateur d'applications qui crée un environnement d'accès libre pour les utilisateurs novices comme expérimentés et simplifie les protocoles de préparation d'échantillons les plus difficiles.

## Solution de préparation d'échantillons de peptides AssayMAP

Pour l'analyse de spectrométrie de masse



### Digestion :

- Digestion en solution avec des réactifs fournis par l'utilisateur
- Traitement en parallèle, jusqu'à 4 plaques 96-puits
- 1 étape de pipetage manuel

### Avantages :

- Réduction de la variabilité utilisateur
- Débit et reproductibilité améliorés

### Extraction :

- Méthode de séparation quantitative utilisant des cartouches en phase inverse
- Traitement en parallèle, 1 plaque 96-puits

### Avantages :

- Une élution de 10 µL équivaut à des temps d'évaporation courts ou à la méthode "diluer-et-injecter".
- Contrôle du processus – chaque échantillon est traité à l'identique.

### Fractionnement :

- Des cartouches échangeuses de cations (SCX) forts génèrent jusqu'à 6 fractions pour simplifier l'échantillon à l'aide d'une élution par étapes avec pH ou sel
- Traitement en parallèle, 1 plaque 96-puits

### Avantages :

- Augmente le débit LC/MS en effectuant le fractionnement hors ligne, ce qui réduit les temps de gradient LC longs.
- Un outil d'enrichissement puissant pour simplifier les échantillons et isoler les peptides cibles avant l'analyse

### Bénéfice global des flux de tâches :

- Les interfaces utilisateur des flux de tâches sont standardisées pour une utilisation facile et reliées pour l'intégration des flux de tâches.
- AssayMAP réduit les besoins en réplicats d'échantillons et nécessite moins d'échantillons répétés.

## Obtenez une reproductibilité totale des analyses de peptides avec la solution Agilent AssayMAP pour la préparation des échantillons avant l'analyse de spectrométrie de masse.

La solution de préparation d'échantillons de peptides AssayMAP a été utilisée pour digérer 64 répliqués de deux types d'échantillons chacun : de la BSA dans de l'urée et de la BSA dans du chlorhydrate de guanidine. Les échantillons ont été extraits avec des cartouches en phase inverse AssayMAP et analysés avec une colonne pour cartes peptidiques Agilent AdvanceBio, le système de LC Agilent 1290 et un spectromètre de masse Q-TOF Agilent 6550

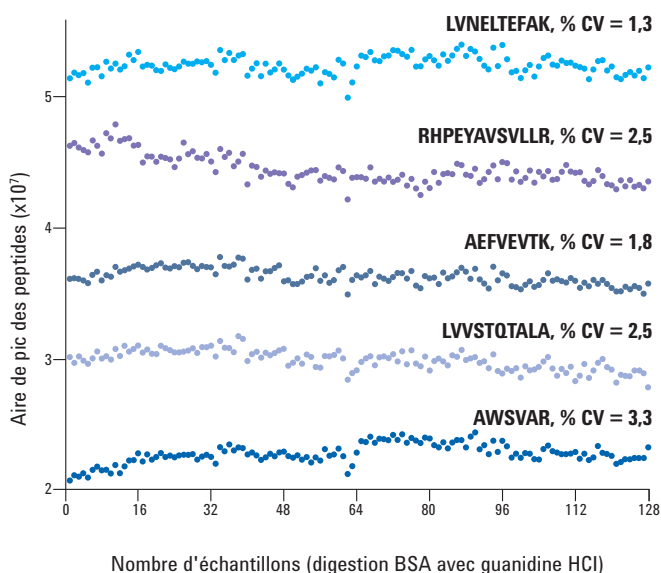


Figure 12 – Nuage de points indiquant l'aire de pic de 4 peptides sur 2 jours.

La préparation des échantillons AssayMAP a nécessité environ quatre heures par jour, avec seulement deux heures de manipulation par jour. Une préparation manuelle des échantillons pour le même flux de tâches nécessiterait environ huit heures par jour, avec quatre heures de manipulation par jour.

iFunnel. L'expérience a été répétée le deuxième jour pour examiner la reproductibilité. Le %CV a été déterminé pour 25 peptides dans chaque échantillon, comme indiqué au **Tableau 1**. Les différents intervalles de %CV sont présentés. Illustration des contributions du %CV moyen total. Pour mieux illustrer la reproductibilité, l'aire de pic des peptides représentatifs est présentée à la **Figure 12**.

25 peptides	Urée (n = 64, 62)		Guanidine HCl (n = 64, 64)	
	Jour 1	Jour 2	Jour 1	Jour 2
% CV aire de pic moyenne	3.3	3.7	2.3	2.6
Peptides avec % CV < 5	23	21	25	23
Peptides avec 5 < % CV < 10	2	3		1
Peptides avec % CV > 10		1		1

Tableau 1 – %CV par jour avec différents intervalles de % CV.

Les CV de flux de tâches totaux sont de <4 %. Le flux de tâches intégral inclut le système de préparation d'échantillons de peptides AssayMAP, une colonne AdvanceBio Peptide Mapping, le système de LC Agilent 1290 et un spectromètre de masse Q-TOF Agilent 6550 iFunnel.

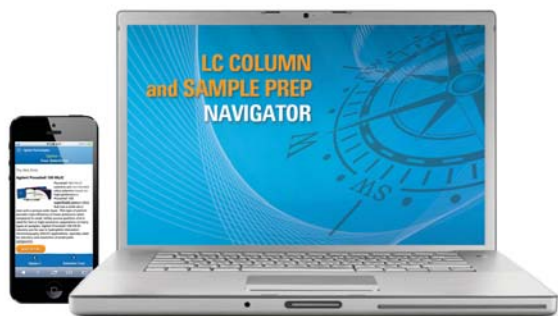
Pour plus de détails sur cette application, reportez-vous à la publication Agilent 4991-2474EN.

Pour en savoir plus sur les colonnes Agilent de cartographie des peptides, visitez le site [agilent.com/chem/advancebio](http://agilent.com/chem/advancebio)

# En partenariat avec vous pour des résultats fantastiques

De meilleures réponses pour des défis croissants. Grâce à nos solutions, les chercheurs en biopharmaceutique innovent dans l'étude des maladies, découvrent de nouveaux médicaments plus rapidement et affichent une plus grande confiance du développement à la fabrication des produits. Une large gamme de solutions Agilent destinées à la recherche sur le génome et aux technologies d'automatisation et de séparation/détection de composants – alliées à des solutions logicielles orientées sur les flux de tâches – aide à trouver les réponses nécessaires à la commercialisation de thérapies efficaces.

Pour en savoir plus sur les solutions Agilent pour la biopharmacie, visitez le site [agilent.com/chem/togetherbiopharma](http://agilent.com/chem/togetherbiopharma)



## Procédez à votre manière pour atteindre un résultat positif.

[agilent.com/chem/navigator](http://agilent.com/chem/navigator)

Avec les nombreuses biocolonnes et petites colonnes à sa disposition, Agilent a introduit son outil LC Column and Sample Prep NAVIGATOR, qui vous aidera à choisir la colonne correspondant à votre application.

Le NAVIGATOR offre quatre options de recherche faciles :

- Par référence – référence croisée des colonnes de LC et des produits de préparation d'échantillon pour trouver le meilleur remplacement Agilent
- Par colonne – recommandations basées sur la méthode
- Par composé – liste déroulante
- Par méthode USP

En outre, l'outil offre des conseils pour optimiser la chromatographie, des recommandations sur les produits de préparation d'échantillons et un accès rapide à des ressources d'assistance technique et autres outils.

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2013  
Imprimé aux États-Unis, le 13 novembre 2013  
5991-2348FR



**Agilent Technologies**