

Université de Limoges

Ecole Doctorale Science-Technologie-Santé

Faculté de Médecine

UMR-S850 Pharmacologie des immunosuppresseurs en
transplantation

N° []

**Document de THESE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**

Discipline : Pharmacologie

Présentée et soutenue publiquement par

Anne-Laure GAGEZ

Le 29 Novembre 2010

Applications de la spectrométrie de masse aux études du métabolisme et à la pharmacodynamie des immunosuppresseurs

Thèse dirigée par le Pr. Louis GASTINEL et le Pr. Pierre MARQUET

Jury :

Rapporteurs :

Pr. Olivier Laprévotte, Professeur des Universités (Université de Paris Descartes)

Pr. Michel Sève, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (Université de Grenoble)

Examineurs :

Dr. Joost Schanstra, Chargé de Recherche (Université de Toulouse)

Pr. Louis Gastinel, Professeur des Universités (Université de Limoges)

Pr Pierre Marquet, Professeur-Praticien Hospitalier (Université de Limoges)

Remerciements

Je tiens à remercier très chaleureusement Monsieur le Professeur Pierre Marquet de m'avoir accueillie au sein de l'unité INSERM UMR-S850 et aidé dans les démarches administratives pour l'inscription hors délai à cette thèse. Merci de votre confiance, de votre rigueur et de vos remarques pertinentes tout au long de ce travail.

Je remercie également Monsieur le Professeur Louis Gastinel ainsi que le Docteur Nicolas Picard pour l'encadrement et le suivi de l'avancement des travaux réalisés pendant ces trois ans, des nouvelles idées, des réflexions, et des discussions.

Merci à Monsieur le Professeur Gérard Lachâtre pour m'avoir accueillie au sein du service de Pharmacologie, de Toxicologie, et de Pharmacovigilance au Centre Hospitalier et Universitaire de Limoges, ainsi que de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie Messieurs les Professeurs Olivier Laprèvote et Michel Sève d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ces travaux et à Monsieur le Docteur Joost Schanstra pour sa présence et sa participation à ce jury.

Un grand merci à François-Ludovic Sauvage, le maître de la spectrométrie de masse, pour son aide, sa disponibilité et ses conseils.

Je tiens également à remercier le personnel du service de Pharmacologie, de Toxicologie et de Pharmacovigilance du CHU de Limoges : Karen Pool, Magali, Pascale, Rozenn, Sylvain, Hélène Roussel et Jérôme Lacouture ...

Je remercie tous les membres de l'équipe INSERM UMR-S850 pour leur aide et leur bonne humeur : Patricia Festa, Virginie de Merindol, Elodie Mestre, Koukeb Rouguieg, Jana Stojanova, Aurélie Prémaud, Annick Rousseau, Gyasi Johnson, Franck Saint-Marcoux, Jean-Hervé Comte, Olivier Gensburger, Jean-Baptiste Woillard, le surnommé BAC +11 ...

Je remercie très chaleureusement toute ma famille, et tout particulièrement mes parents, qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans tous mes projets.

Un merci tout particulier à Michel et Marie pour m'avoir accueilli en Charente et dégourdi l'esprit grâce aux feux d'artifice.

Je tiens à remercier le Docteur Philippe Solal-Celigny, le Professeur Hervé Watier, ainsi que le Docteur Guillaume Cartron pour m'avoir permis d'effectuer mon premier stage dans un laboratoire de recherche et de m'avoir conforté dans l'idée de continuer ma voie dans la recherche.

Résumé

Ces travaux de thèse s'inscrivaient dans l'étude par la spectrométrie de masse de la pharmacodynamie, dont l'objectif est de caractériser des effets biochimiques et physiologiques des médicaments sur l'organisme : transport vers leur cible, fixation à leur cible, biotransformation, et excrétion.

L'appréciation du degré de formation d'adduits covalents entre le dérivé acyl-glucuronide de l'acide mycophénolique (AcMPAG) et l'albumine sérique humaine, l'inosine monophosphate déshydrogénase ou les uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférases (UGT) hépatiques a été réalisée. L'utilisation de la tolmétine acyl-glucuronide (produit non disponible), comme contrôle positif serait nécessaire afin de nous permettre de recréer les conditions expérimentales de Ding et al. en 1993, confirmant ou infirmant ainsi nos résultats avec l'AcMPAG.

Le phénotypage (détermination d'activités de glucuroconjugaison *in vitro*) des 6 UGTs hépatiques principalement impliquées dans la détoxification médicamenteuse a été mise au point grâce à une seule analyse chromatographique liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

Des études préliminaires (cinétiques et inhibition) concernant la mise en place d'un dosage de l'activité phosphatase de la calcineurine par LC-MS/MS ont été réalisées. Mais d'autres sont nécessaires afin de développer une méthode reproductible applicable en routine, qui pourra servir d'indicateur de l'efficacité des traitements administrés aux patients ciblant la voie de signalisation de la calcineurine.

La recherche de candidats biomarqueurs urinaires potentiels a permis de déterminer des peptides (p) permettant de discriminer les états : stable (ST), néphropathie chronique de grade 1 (CAN1) et rejet aigu (AR) dans une population de patients transplantés rénaux. La sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) ont été calculées pour chacun de ces peptides (ou combinaison peptidique) spécifiques d'un état de biopsie : p4 pour les patients ST avec Se = 72.7% et Sp = 74.3% ; p17-p35 pour les patients CAN1 avec Se = 76.5% et Sp = 87.5% ; et p17-p24 pour les patients AR avec Se = 91.7% et Sp = 84.4%.

Mots-clés : spectrométrie de masse, adduits covalents, phénotypage, calcineurine, protéomique urinaire.

Abstract

This work is concerned with the study of pharmacodynamics by mass spectrometry, which aims to characterize biochemical and physiological effects of drugs on the organism: drug transportation, target fixation, biotransformation, and excretion.

The degree of formation of covalent adducts between mycophenolic acid acyl-glucuronide (AcMPAG) and human serum albumin, inosin monophosphate dehydrogenase or hepatic uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT) were estimated. Tolmetin acyl-glucuronide (unavailable product), should be used as positive control to recreate the experimental conditions of Ding et al. in 1993, to confirm our results with AcMPAG.

Determination of glucuronidation activities *in vitro* (phenotyping) of 6 major UGTs implicated in drug detoxification was determined by single liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Preliminary results (kinetics and inhibition) for the quantification of phosphatase activity of calcineurin by LC-MS/MS were obtained. Further experiments are needed for a reproducible method to be used in routine laboratory practice. This may serve as an indicator for calcineurin activity in the context of iatrogenic immunosuppressant.

Results from the final logistic regression model identified certain natural peptides that could successfully discriminate between AR and non-AR [p17 (Odds ratio (OR) = 62.2; 95% confidence interval (CI) (5.9-650.4); $p = 0.0006$) and p24 (OR = 22.9; 95% CI (2.5-212.2); $p = 0.0058$)]; CAN1 and non-CAN1 [p 17 (OR = 12.4; 95% CI (2.6-60.7); $p = 0.0018$) and p35 (OR = 0.04; 95% CI (0.005-0.4); $p = 0.0065$)]; and ST and non-ST [p4 (OR = 7.7; 95% CI (2.3-25.7); $p = 0.0009$)].

Key-words : mass spectrometry, covalent adducts, phenotyping, calcineurin, urinary proteomic

Table des matières

Introduction.....	1
Généralités.....	3
1. Transplantation rénale.....	3
1.1. La transplantation rénale de nos jours.	3
1.2. Les complications après transplantation.	4
1.2.1. Le rejet d'allogreffe.	4
1.2.2. Le mécanisme d'activation des lymphocytes T.	6
1.2.3. Les infections virales et le rejet d'allogreffe.....	8
2. Le traitement immunosuppresseur en transplantation rénale.....	9
2.1. Le traitement d'induction.....	9
2.2. Le traitement d'entretien.....	10
2.2.1. Les corticoïdes.....	10
2.2.2. Les agents antiprolifératifs.....	12
2.2.3. Les inhibiteurs de la calcineurine.....	12
2.2.4. Les substances en devenir.....	13
3. Le fractionnement protéique et la détection par spectrométrie de masse.....	14
3.1. Les techniques de fractionnement des mélanges protéiques complexes.....	14
3.1.1. L'électrophorèse.....	15
3.1.2. La chromatographie.....	15
3.2. La spectrométrie de masse.....	18
3.2.1. Le système d'introduction de l'échantillon dans l'analyseur.....	18
3.2.2. Les sources d'ionisation.....	18
3.2.3. Les analyseurs ou séparateurs de masse.....	20
3.2.4. Le détecteur.....	22
Chapitre 1. Recherche de métabolites glucuronidés de l'acide mycophénolique fixés de manière covalente sur des protéines.....	25
1. Le mécanisme de la réaction de glycation.....	25
2. Réactions de glycation sur des produits glucuronidés : revue de littérature.....	27

2.1. Mise en évidence des adduits covalents par immunoprécipitation et western-blots.	28
2.2. Mise en évidence des adduits covalents par fluorescence ou radiomarquage.	29
2.3. Mise en évidence des adduits covalents par HPLC-UV.	30
3. Recherche de fixations covalentes de l'AcMPAG sur des protéines..	31
3.1. Introduction.....	31
3.2. Matériel et méthodes.....	31
3.2.1. Digestion trypsique de protéines natives : BSA, HSA et IMPDH.....	31
3.2.2. Formation d'adduits et digestion trypsique protéique.	32
3.2.3. Formation d'adduits de l'AcMPAG sur l'UGT2B7.	32
3.2.4. Séparation chromatographique HPLC et détection UV.....	33
3.2.5. Electrophorèse sur gel en conditions dénaturantes : dodécylsulfate de sodium.	33
3.2.6. Dosage protéique de Bradford.	33
3.2.7. Détection par spectrométrie de masse.....	33
3.3. Résultats.	35
3.3.1. Détection HPLC-UV : longueurs d'onde de travail pour les peptides totaux et dérivatisés par l'AcMPAG.....	35
3.3.2. Digestion trypsique de protéines natives : BSA, HSA et IMPDH, analysé par HPLC-UV.	35
3.3.3. Effet du sodium cyanoborohydrure sur la digestion trypsique de la BSA, analysé par HPLC-UV.	36
3.3.4. Temps de rétention des produits utilisés : MPA, MPAG et AcMPAG, analysé par HPLC-UV.	36
3.3.5. Seuil de détection du MPA en HPLC-UV.	37
3.3.6. Perte protéique lors de la dialyse pendant l'étape de formation des adduits covalents.	38
3.3.7. Capacité de la colonne à supporter 0.6 M de guanidine, analysé par HPLC-UV.....	39
3.3.8. Détection d'adduits covalents sur l'HSA.....	40
3.3.9. Confirmation par spectrométrie de masse à temps de vol, d'adduits covalents potentiels sur l' HSA.....	42
3.3.10. Recherche d'adduits covalents par spectrométrie de masse quadrupolaire en tandem.....	48
3.4. Discussion.	66

Chapitre 2. Méthode de phénotypage *in vitro* d'enzymes métaboliques de phase II : les uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférases..... 68

1. Le métabolisme des xénobiotiques. 68

2. Les modèles biologiques utilisés pour l'étude du métabolisme *in vitro*. 68

2.1. Les enzymes recombinantes.	68
--------------------------------------	----

2.2. Les microsomes.	70
3. Les études métaboliques <i>in vitro</i> pour le phénotypage enzymatique.	70
3.1. Les études de compétence.....	71
3.2. Les études d'inhibition.....	72
3.3. Les analyses de corrélation.....	72
4. Les uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférases.	73
5. L'évaluation d'activités enzymatiques humaines de glucuronidation <i>in vitro</i> par une approche de cocktail par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.....	77

Chapitre 3. Dosage de l'activité de la calcineurine par spectrométrie de masse. 79

1. La calcineurine..... 114

1.1. La structure de la calcineurine.....	114
1.2. Le rôle physiologique de la calcineurine.....	115
1.3. La distribution tissulaire de la calcineurine.....	115

2. Les techniques de dosage de l'activité de la calcineurine. 116

2.1. Les méthodes radioactives de dosage de l'activité de la calcineurine.....	116
2.2. Les méthodes non-radioactives de dosage de l'activité de la calcineurine.....	117
2.2.1. Détection par immunoblots.....	117
2.2.2. Détection du phosphate inorganique non radiomarké.....	117
2.2.3. Détection du peptide RII non phosphorylé par HPLC-UV.....	118
2.2.4. Détection du peptide RII déphosphorylé en fluorescence.....	118

3. Travail personnel : mise au point d'une méthode de dosage de l'activité calcineurine par LC-MS/MS. 119

3.1. Introduction.....	119
3.2. Matériel et méthodes.....	119
3.2.1. Produits chimiques et réactifs.....	119
3.2.2. Cinétique enzymatique.....	119
3.2.3. Etude d'inhibition de la calcineurine.....	120
3.2.4. Méthode LC-MS/MS.....	120
3.2.5. Courbes de calibration.....	121
3.3. Résultats.....	121
3.3.1. Cinétique enzymatique.....	121
3.3.2. Etude d'inhibition de la calcineurine.....	122
3.4. Discussion.....	123

Chapitre 4. La recherche de biomarqueurs urinaires : approches protéomiques et peptidomiques.....	124
1. Diagnostic et prédiction exacte dans la gestion de maladies.	124
2. Protéomique et biomarqueurs : définitions.....	126
3. La recherche de biomarqueurs : définitions et concepts.	127
3.1. Le concept de recherche de biomarqueurs.....	128
3.1.1. Considérations à prendre en compte et questions à se poser.	128
3.1.2. Les échantillons.	129
3.1.3. La technique d'analyse des échantillons.	129
3.1.4. La découverte de candidats potentiels.	130
3.1.5. La validation des candidats choisis à l'étape de découverte.....	130
3.1.6. La confirmation des biomarqueurs.	130
3.1.7. Les inconvénients liés à la recherche de biomarqueurs.	131
3.2. L'analyse des données.	131
3.2.1. Le pre-processing.....	131
3.2.2. Le post-processing.	132
3.2.3. La conservation des données.	132
3.3. Les sources de variabilités lors d'une recherche de biomarqueurs.....	132
3.3.1. La variabilité physiologique intra- et interindividuelle.	132
3.3.2. La variabilité technique et analytique.	133
4. Mise au point d'un test non invasif pour la détection d'état de rejet aigu et de néphropathie chronique chez des patients transplantés rénaux.....	134
4.1. Protocole d'essai clinique ML 19912 « OPERA ».	134
4.1.1. Objectifs du protocole OPERA.....	134
4.1.2. Schéma de l'étude.	134
4.1.3. Population de l'étude.	136
4.1.4. Données recueillies pour l'analyse du protéome urinaire.	136
4.2. Biomarqueurs urinaires candidats indicateurs du rejet aigu de greffe et de néphropathie chronique chez des patients transplantés rénaux.....	137
4.2.1. Analyses du protéome et du peptidome urinaires pour la découverte de biomarqueurs potentiels chez des patients transplantés rénaux.....	137
4.2.2. Travaux complémentaires.	172
Conclusion.	176

Liste des abréviations

Aa: Acide aminé
AcMPAG: Acyl glucuronid mycophenolic acid (Acide mycophénolique acyl-glucuronide)
ADN: Acide déoxyribonucléique
AGE: Advanced glycation end-product (Produits terminaux de glycation avancée)
AMM: Autorisation de mise sur le marché
ARNm: Acide ribonucléique messenger
ASC: Aire sous la courbe
BSA: Bovine serum albumin (Albumine sérique bovine)
CA_n: Cancer antigen number (Antigène cancer (suivi d'un) numéro)
CD40L: Cluster of differentiation 40 ligand ("cluster" de différenciation 40 ligand)
CD_n: Cluster of differentiation number ("cluster" de différenciation (suivi d'un) numéro)
CE: Capillary electrophoresis (Electrophorèse capillaire)
CMH: Complexe moléculaire d'histocompatibilité
CMV: Cytomégalovirus
CPA: Cellule présentatrice d'antigène
CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (Lymphocyte T cytotoxique associé à l'antigène 4)
CYP: Cytochrome P450
DTT: DL-Dithiothréitol
EDTA: Acide éthylène diamine tétra acétique
ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay (Essai d'immunocaptation enzymatique)
EMS: Enhanced mass spectrometry
EPI: Enhanced product ion
ER: Enhanced resolution
ESI: Electrospray ionisation (Ionisation par électrospray)
FKBP12: FK 506-binding protein 12 (Protéine 12 liant le FK 506)
FTICR: Fourier transform ion cyclotron resonance (Analyseur à transformation de Fourier à résonance cyclotronique d'ion)
GRE: Glucocorticoid response element (Elément de réponse aux glucocorticoïdes)
HCG: Human chorionic gonadotropin (Gonadotropine chorionique humaine)
HLA: Human leucocytes antigens (Antigènes leucocytaires humains)
HPLC: High performance liquid chromatography (Chromatographie liquide à haute performance)
HSA: Human serum albumin (Albumine sérique humaine)
HSV: Herpes simplex virus
ICAM-1: Endothelial intercellular adhesion molecule-1 (Molécule intercellulaire endothéliale 1)
Ig: Immunoglobuline
IMP: Inosine monophosphate
IMPDH: Inosine monophosphate dehydrogenase-2 (Inosine monophosphate déshydrogénase)
ISEF: Inter-system extrapolation factor (Facteur d'extrapolation inter-système)
JAK kinase: Janus kinase

K_{Ca}3.1: Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (Canal potassique à conductance intermédiaire calcique)

LB, T: Lymphocyte B, T

LFA-1: Lymphocyte function-associated antigen-1 (Antigène associé à la fonction du lymphocyte 1)

m/z: masse to charge ratio (Rapport masse sur charge)

MALDI: Matrix assisted laser desorption ionisation (Desorption ionisation assistée par matrice)

MAP-kinases: Mitogen-activated protein kinases (Kinase protéique active par une substance mitogène)

MMF: Mycophenolate mofetil (Mycophénolate mofétile)

MPA: Mycophenolic acid (Acide mycophénolique)

MPAG: Mycophenolic acid glucuronid (Acide mycophénolique glucuronide)

MRM: Multiple reaction monitoring

MS: Mass spectrometry (Spectrométrie de masse)

MS/MS: Tandem mass spectrometry (Spectrométrie de masse en tandem)

mTOR: Mammalian target of rapamycin (Cible de la rapamycine mammifère)

NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells (Facteur nucléaire des cellules T activées)

NF-κB: Nuclear factor-kappa light chain enhancer of activated B-cells (Facteur nucléaire kappa des cellules B actives)

NK: Natural killer

pH: Potentiel hydrogène

pI: Point isoélectrique

PI3 kinase: Phosphoinositide 3 kinase (Kinase phosphoinositide 3)

PP: Protein phosphatase (Phosphatase protéique)

PSA: Prostate specific antigen (Antigène spécifique prostatique)

QTrap: Spectromètre de masse hybride de type triple quadrupôle à trappe à ions linéaire

RAF: Relative activity factor (Facteur d'activité relative)

RcT: Récepteur T lymphocytaire

RE: Reticulum endoplasmique

ROC: Receiver operating characteristic (Caractéristiques opérateur-receveur)

RT-PCR: Reverse transcription-polymerase chain reaction (Transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne)

SB-209247: acide E-3-[6-[[[(2,6-dichlorophényle)-thio]méthyle]-3-(2-phénylethoxy)-2-pyridinyle]-2-propénoïque

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (Gel d'électrophorèse polyacrylamide en conditions dénaturantes sodium dodécyl sulphate)

TIC: Total ion chromatogram (Courant ionique total)

TOF: Time of flight (Temps de vol)

UDPGA: Uridine diphosphate-glucuronic acid (Uridine diphosphate-acide glucuronique)

UGT: Uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransferase (Uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférase)

UV: Ultra-violet

XIC: Extracted ion chromatogram (Extraction du courant ionique)

Zap-70: Zeta chain-associated protein of 70 kDa (Protéine de 70 kDa associée à la chaîne zéta)

Liste des figures

Figure 1. Activation des lymphocytes T en présence d'une cellule présentatrice d'antigène : les 3 signaux nécessaires à leur activation (Halloran, 2004).	7
Figure 2. Sites d'action des différents médicaments immunosuppresseurs (Halloran, 2004).	10
Figure 3. Schéma de l'ionisation – désorption laser assistée par une matrice (MALDI)	19
Figure 4. Schéma de l'ionisation par électrospray	20
Figure 5. Schéma d'un spectromètre de masse à temps de vol équipé d'un réflectron	21
Figure 6. Mécanisme de la réaction de Maillard. R-NH ₂ , molécule aminée (protéine) ; X, structure chimique non connue formée par réaction d'un composé α -dicarbonyl avec une autre molécule aminée (d'une autre protéine) ou par un processus de crosslink (Priego and Sanchez, 2009).	26
Figure 7. Mécanisme de réarrangement et de liaisons covalentes d'un acyl glucuronide à des protéines. R-COO, radical du médicament couplé à l'ion carboxylate (Wang et al., 2001).	27
Figure 8. Schéma de la procédure expérimentale de la formation d'adduits et de la digestion trypsique protéique	32
Figure 9. Détection de peptides tryptiques des protéines natives BSA, HSA et IMPDH, analysé par HPLC-UV. Détection à 215 nm (noir) et à 310 nm (bleu) de 500 μ g de BSA (A), d'HSA (B) ou de 2% d'IMPDH (C) trypsinisées.	35
Figure 10. Effet du sodium cyanoborohydrure sur la digestion trypsique de la BSA, analysé par HPLC-UV. Détection à 215 nm de 500 μ g de BSA native traitée en présence (bleu) ou en absence (noir) de NaCNBH ₃	36
Figure 11. Temps de rétention du MPA, du MPAG et de l'AcMPAG purs, analysés par HPLC-UV. Détection à 215 (noir) et 310 nm (bleu) de 78 nmol de MPA (A), de 50 nmol de MPAG (B) et de 50 nmol d'AcMPAG (C) purs.	37
Figure 12. Seuil de sensibilité de détection du MPA, analysé par HPLC-UV. Détection à 215 nm de 78 nmol (noir), de 39 nmol (bleu foncé), de 19.5 nmol (rose), de 9.75 nmol (vert clair), de 4.88 nmol (bleu clair) et de 1.22 nmol (gris) de MPA pur.	38
Figure 13. Visualisation de la perte protéique due à la dialyse sur gel SDS-PAGE 12%. Dépôt du marqueur de taille (MT) (colonne 1), de 10 μ g d'HSA seule, avant dialyse (colonnes 2 et 3), et de 10 μ g d'HSA seule, après dialyse (colonnes 4 et 5).	38
Figure 14. Capacité de la colonne chromatographique à supporter l'injection d'une solution à 0.6 M de guanidine. Détection à 215 nm (noir) et à 310 nm (bleu) de 250 μ L d'un mélange contenant 0.6 M de guanidine.	39
Figure 15. Artefacts des différentes solutions utilisées lors de l'étape n°2 de la préparation d'échantillons. Séparation HPLC et détection à 215 nm (noir) et à 310 nm (bleu) de 250 μ L d'un mélange contenant tous les produits utilisés lors de l'étape n°2 de la formation d'adduits covalents.	40

Figure 16. Détection d'adduits covalents sur l'HSA, analysé par HPLC-UV.	
Détection à 215 nm de 20 nmol d'HSA seule (noir), d'HSA + MPA (bleu), d'HSA + MPAG (rose), et d'HSA + AcMPAG (marron).....	41
Figure 17. Détection d'adduits covalents sur l'HSA. Détection à 310 nm de 20 nmol d'HSA + MPA (rose), d'HSA + MPAG (bleu), et d'HSA + AcMPAG (noir).	41
Figure 18. Collection et numérotation des fractions intéressantes de la condition HSA + AcMPAG. Détection à 215 nm (noir), à 250 nm (bleu), à 305 nm (rose), et à 310 nm (marron) de 20 nmol d'HSA + AcMPAG.	42
Figure 19. Structure chimique et fragmentation du MMF, du MPA, du MPAG et de l'AcMPAG.	42
Figure 20. Analyse MS à temps de vol des produits purs. Spectres obtenus pour 1 µg/spot de MPA (A), de MPAG (B) et d'AcMPAG (C), en mode positif.	44
Figure 21. Analyse MS à temps de vol en mode positif des différentes fractions F65 (A), F66 (B), F66'30 (C), F67 (D), F74 (E), et F78 (F).	46
Figure 22. Analyse MS/MS à temps de vol en mode positif des analytes précurseurs des fractions F65 (A), F66'30 (B), F74 (C), et F78(D).	47
Figure 23. Analyse de l'AcMPAG pur en mode nanospray, par le QTrap 4000. EMS en mode positif (A), EMS en mode négatif (B) et EPI sur le précurseur ayant un m/z à 495 détecté en B en mode négatif (C), de 10 pmol d'AcMPAG.	49
Figure 24. Analyse de l'α-caséine en mode « Precursor Ion Scan » focalisé à 79 m/z en mode négatif, par le QTrap 4000. Courant ionique total en fonction du temps de rétention (A), ER du précurseur ayant un m/z à 975.5 (B) et EPI du précurseur ayant un m/z à 976.67 (C) d'1 pmol d' α -caséine traitée.	51
Figure 25. Analyse de l'AcMPAG pur en mode « Precursor Ion Scan » focalisé à 319 m/z en mode négatif, par le QTrap 4000. Courant ionique total (A) et du XIC entre un m/z de 494.5 et de 495.5 (B) de 10 pg d'AcMPAG.	52
Figure 26. Analyse de l'AcMPAG trypsinisé en mode « Precursor Ion Scan » focalisé à 319 m/z en mode négatif, par le QTrap 4000. Courant ionique total (TIC) (A), spectre extrait entre 47.3 et 49.3 min (B) et entre 69.5 et 70.4 min (C), EPI sur les précurseurs ayant un m/z à 992 (D), un m/z à 495 (E), un m/z à 960 (F) et un m/z à 640 (G) de 10 pg d'AcMPAG.	55
Figure 27. Détermination d'adduits covalents de l'AcMPAG sur l'HSA en mode « Precursor Ion Scan » focalisé à 319 m/z en mode négatif, analysé par le QTrap 4000. Courant ionique total pour les 3 conditions suivantes : HSA seule (A), HSA + AcMPAG ratio 1/3 (B) et HSA + AcMPAG ratio 1/20 (C), avec 15 µg de protéines traitées.	56
Figure 28. Identification du contenu protéique d'un pool de microsomes intestinaux et hépatiques sur gel DSD-PAGE 10%. Dépôt du marqueur de taille (colonnes 3 et 6), de 7.5 µg de protéines issues d'un pool de microsomes hépatiques (colonne 1) et intestinaux (colonne 4) et de 15µg de protéines issues d'un pool de microsomes hépatiques (colonne 2) et intestinaux (colonne 5).	57
Figure 29. Identification du contenu protéique de supersomes, sur gel SDS-PAGE 10%. Dépôt du marqueur de taille (colonne 1 et 10), de 50 (colonne 2) et de 25 µg (colonne 3) de supersomes surexprimant l'UGT1A4, de 50 (colonne 4) et de 25 µg (colonne 5) de supersomes surexprimant l'UGT1A3, de 50 (colonne 6) et de 25 µg	

(colonne 7) de supersomes surexprimant l'UGT2B7, de 50 (colonne 8) et de 25 µg (colonne 9) de supersomes contrôle.....	60
Figure 30. Structure chimique et fragmentation du naproxène et du naproxène acyl-glucuronide.	62
Figure 31. Analyse du naproxène pur par LC-MS/MS en modes EMS négatif (A) et EPI négatif sur le précurseur ayant un m/z à 229 détecté en A (B).	63
Figure 32. Analyse du naproxène acyl-glucuronide pur par LC-MS/MS en modes EMS négatif (A) et EPI négatif sur le précurseur ayant un m/z à 405 détecté en A (B), courant ionique total (TIC) en fonction du temps de rétention du naproxène acyl-glucuronide analysé en mode « Precursor Ion Scan » focalisé à un m/z de 193 en mode négatif (C), XIC entre un m/z de 404.5 et de 405.5 à partir du TIC précédent (D).	65
Figure 33. Détermination d'adduits covalents du naproxène acyl glucuronide sur l'HAS, analyse par le QTrap 4000. Analyse EMS (A), et courant ionique total en mode « Precursor Ion Scan » focalisé à un m/z de 193 en mode négatif (B) et à un m/z de 229 en mode négatif (C).	66
Figure 34. Organisation commune de différents domaines des uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférases (UGTs). (A) Structure primaire des différents domaines fonctionnels des UGTs. (B) Représentation schématique d'une UGT ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE).	74
Figure 35. Représentation schématique du locus UGT1 en 2q37 chez l'Homme. Les 13 isoformes de l'exon 1 sont représentés en gris et les exons 2 à 5 en commun sont blancs. Un « p » indique les isoformes donnant naissance à un pseudogène.	75
Figure 36. Représentation schématique du locus UGT2 en 4q13 chez l'Homme. Les gènes 2A sont représentés en blanc, tandis que les gènes 2B sont en gris. Un « p » indique les isoformes donnant naissance à un pseudogène.	75
Figure 37. Les domaines structuraux de la calcineurine. La sous-unité catalytique (CaNA) est composée de : CaNB, le domaine de liaison de la sous-unité régulatrice ; CaM, le domaine de liaison de la calmoduline ; AI, le domaine de liaison de molécules inhibitrices. La sous-unité régulatrice (CaNB) contient quatre sites de liaison du calcium (Ca ²⁺).....	114
Figure 38. Chromatogramme LC-MS/MS des peptides RII, RII phosphorylé et GluFib (MRM en mode positif).	121
Figure 39. Cinétique enzymatique de la calcineurine pure de cerveau bovin. Représentation de Lineweaver et Burk afin de déterminer les constantes cinétiques : K _M = 34.7 µM et V _{max} = 20.8 nmoles/min/mg protéines (n = 2).....	122
Figure 40. Activité relative de la calcineurine pure de cerveau bovin. Contribution de l'apport en calcium (Ca ²⁺) et inhibition de l'activité phosphatase par un peptide auto-inhibiteur (AI). Les barres représentent les déviations standard (n = 2).....	122
Figure 41. Modèle de discrimination correct avec distinction entre les états sains et malades (Soreide, 2009).....	125
Figure 42. Courbes de ROC hypothétiques. Fort pouvoir discriminant (trait plein) ou non (trait en pointillé) (Linden, 2006).	126
Figure 43. Schéma du protocole d'essai clinique « OPERA ». Le traitement immunosuppresseur se compose de plusieurs produits : traitement d'induction par anti-IL-R2 (flèche bleue) après la transplantation, corticothérapie (triangle gris) stoppant à J7, ciclosporine (rectangle bleu) adaptée diminuant dans le temps et CellCept® (rectangle	

vert) à dose fixe ou adaptée. Les prélèvements biopsiques et urinaires sont réalisés systématiquement (flèche rouge) ou en cas de suspicion de rejet du greffon (flèche orange). 135

Figure 1 Annexe 2. Schéma d'un système hybride triple quadrupole à trappe à ions linéaire. Q1 représente le premier quadrupôle et Q3 le 3e quadrupôle. Ce dernier peut être utilisé comme une trappe à ions grâce à la présence à l'entrée et à la sortie de barrières électromagnétiques. Q2 correspond à la cellule de collision. 182

Figure 2 Annexe 2. Mode quadrupolaire : Multiple Reaction Monitoring. 183

Figure 3 Annexe 2. Mode quadrupolaire : Precursor Ion Scan. 183

Figure 4 Annexe 2. Mode trappe à ions linéaire : Enhanced Mass Spectrometry.. 183

Figure 5 Annexe 2. Mode trappe à ions linéaire : Enhanced Product Ion. 184

Figure 6 Annexe 2. Mode trappe à ions linéaire : Enhanced Resolution...... 184

Liste des tableaux

Tableau 1. Principales molécules immunosuppressives utilisées lors du traitement de patients transplantés rénaux.	11
Tableau 2. Avantages et inconvénients des différentes techniques de fractionnement utilisées en protéomique. Electrophorèse en gel (Gygi et al., 2000) et chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Issaq and Blonder, 2009).	17
Tableau 3. Avantages et inconvénients des deux spectromètres de masse utilisés. Spectromètres de masse : MALDI TOF/TOF (Olthoff et al., 1988) et QTrap (Jonscher and Yates, III, 1997).	24
Tableau 4. Détermination de la perte protéique par dosage de Bradford.	39
Tableau 5. Tableau récapitulatif des m/z des analytes précurseurs choisis pour l'analyse MS/MS pour chaque fraction collectée.	45
Tableau 6. Identification du contenu protéique d'un pool de microsomes intestinaux. Séparation en gel 1D suivi d'une analyse par LC-MS/MS en modes EMS et EPI. Index de qualité des peptides : *score>30 et **score >2.....	58
Tableau 7. Identification du contenu protéique d'un pool de 6 µg de microsomes hépatiques. Séparation en gel 1D suivi d'une analyse LC-MS/MS en modes EMS et EPI. (Enzyme productrice d'AcMPAG, métabolite du MPA, rouge ; peptides uniquement identifiés par mascot, violet ; peptides uniquement identifiés par paragon, orange).....	59
Tableau 8. Identification du contenu protéique de supersomes : contrôle, UGT2B7, UGT1A3 et UGT1A4. Séparation en gel 1D suivi d'une analyse LC-MS/MS en modes EMS et EPI. Index de qualité des peptides : *score>30 et **score >2.....	60
Tableau 9. Identification du contenu protéique supersomal de l'UGT2B7 en fonction du temps d'incubation du MPA (métabolisé en MPAG et AcMPAG). Séparation en gel 1D et analyse LC-MS/MS en modes « Full scan » (EMS + EPI) et « Precursor Ion Scan ». Index de qualité des peptides lors de l'identification par Mascot : *score>30. ...	61
Tableau 10. Conditions LC-MS/MS pour les trois peptides : RII, RII phosphorylé et GluFib.	121
Tableau 11. Evaluation de l'exactitude d'un modèle prédictif de la présence ou de l'absence d'un diagnostic. Vrai positif (VP), faux positif (FP), vrai négatif (VN), faux négatif (FN).....	125
Tableau 12. Population du protocole d'essai clinique « OPERA ». Prélèvements urinaires classés, par centre investigateur. NC, non connu. PI, pas d'inclusion de patients.	136
Tableau 13. Comparaison des deux bases de données urinaires humaines: Mosaïques diagnostics vs OPERA.	172
Tableau 14. Comparaison des peptides séquencés correspondant aux 20 protéines retrouvées en commun dans les bases de données urinaires humaines Mosaïques diagnostics et OPERA.	174

Liste des annexes

Annexe 1. Classification de Banff de la pathologie rénale d'allogreffe : rejets cellulaire et humoral (Racusen et al., 1999b; Solez et al., 2008).	179
Annexe 2. Les modes d'acquisition utilisés sur le spectromètre de masse QTrap.	182
Annexe 3. Recommandations pratiques pour l'utilisation d'urine comme fluide biologique pour les programmes de détection de biomarqueurs.	185

Introduction.

L'étude des effets biochimiques et physiologiques des médicaments sur l'organisme est l'objectif de la pharmacodynamie. Cette discipline peut se dépeindre sous différentes formes : études des mécanismes d'actions des médicaments sur l'organisme, incluant les réponses pharmacologiques, le temps et l'intensité de la réponse observée relative à l'administration d'une concentration d'un médicament donné à un site actif dans l'organisme ; et la corrélation de l'action et des effets de ces médicaments avec leur structure chimique. De plus, il est possible d'analyser finement la pharmacodynamie d'une substance à diverses étapes de son action : transport vers sa cible, fixation à sa cible, biotransformation, et excrétion.

Un large panel de méthodes relativement invasives est disponible pour mesurer les effets de la pharmacodynamie dans des échantillons normaux ou tumoraux. Les méthodes moléculaires, comme le western-blot, l'ELISA, la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel ou l'expression différentielle de gènes sont très informatives (Workman, 2002)... Mais ces procédés, ainsi que le prélèvement chirurgical invasif ont des limites. C'est pourquoi, le développement de techniques de prélèvement moins invasives et de détection plus sensible couplée à une résolution spectrale importante (comme la spectrométrie de masse) s'avère nécessaire.

Ce travail consistait en l'étude de différents aspects de la pharmacodynamie par la spectrométrie de masse :

- l'étude de la formation d'adduits covalents entre un dérivé acyl-glucuronide de l'acide mycophénolique (AcMPAG : immunosuppresseur utilisé en transplantation) et diverses protéines. La fixation covalente des acyl-glucuronides aux protéines est considérée comme un évènement précoce, conduisant à la toxicité des molécules ayant un acide carboxylique. L'appréciation du degré de formation de ces adduits sur des protéines ainsi que leur identification conduirait donc à une estimation potentielle du degré de toxicité de l'AcMPAG.

- la détermination simultanée d'activités de glucuroconjugaison *in vitro*, d'enzymes du métabolisme de phase II, grâce à la mise au point d'une méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (phénotypage). Les uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférases font partie de ces enzymes qui catalysent les réactions de glucuroconjugaison. Cette biotransformation des substances endogènes et des xénobiotiques (dont font partie les médicaments) est indispensable à l'organisme pour une excrétion urinaire ou biliaire.

- l'établissement d'un dosage de l'activité phosphatase de la calcineurine, cible directe d'immunosuppresseurs, par spectrométrie de masse en tandem. Etant donné que la

calcineurine est capable d'induire différentes voies de signalisation cellulaire, la mesure de sa capacité à déphosphoryler des peptides et/ou des protéines s'avère importante, et pourrait être une cible potentielle à étudier comme indicateur d'efficacité des traitements administrés ciblant la voie de signalisation calcineurine.

- la recherche de biomarqueurs urinaires candidats indicateurs des états de rejet aigu de greffe et/ou de néphropathie chronique chez une cohorte de patients transplantés rénaux. La mise au point d'un test pour le diagnostic précoce du dysfonctionnement du greffon rénal sans geste médical invasif présente un intérêt certain.

Généralités.

1. Transplantation rénale.

1.1. La transplantation rénale de nos jours.

La transplantation rénale est, de loin la plus fréquente des greffes d'organes puisqu'elle représente 63,6% des transplantations d'organes en 2008 (rapport d'activité 2008 de l'agence de la Biomédecine concernant les greffes d'organes). Elle peut être réalisée à partir d'un donneur en état de mort cérébrale ou d'un donneur vivant apparenté, limité aux parents au premier degré (parents, enfants, frères et sœurs), voire exceptionnellement au conjoint, après accord du juge. La transplantation est réalisée chez des personnes en insuffisance rénale terminale, ne pouvant survivre sans des séances de dialyse, longues et pénibles. L'insuffisance rénale de ces patients peut être consécutive à une glomérulonéphrite chronique, à une polykystose rénale, à une néphropathie interstitielle chronique, ou au diabète. En France, environ 5 000 nouveaux cas d'insuffisance rénale terminale sont répertoriés chaque année. Ces patients doivent se soumettre à un régime très strict et se plier impérativement à plusieurs séances hebdomadaires de dialyse de 4 à 6 heures chacune, ou à des séances quotidiennes de dialyse péritonéale. Cette prise en charge lourde s'accompagne le plus souvent de difficultés d'insertion sociale, ainsi que de risques de complications. Le coût global pour l'assurance maladie s'élevait en 2005 à 2,1 milliards d'euros pour les techniques de dialyse dispensées à domicile et en centre (Benain et al., 2007). La transplantation rénale permet de retrouver une vie quasiment normale, sans régime strict ni limitation de l'activité, mais au prix d'un traitement immunosuppresseur à vie. De plus, les femmes peuvent mener à terme une grossesse.

Afin de limiter les risques de rejets d'origine immunitaire, il est nécessaire de greffer des reins les plus immuno-compatibles possibles. Au minimum, une compatibilité du groupe sanguin est requise entre le donneur et le receveur. La détection et l'identification d'éventuels anticorps anti-HLA chez le receveur sont réalisées avant la transplantation afin d'éviter tout risque de rejet immédiat du greffon. Quand le donneur potentiel est identifié, un examen supplémentaire est effectué : le cross-match. Il consiste à tester l'activité du sérum du receveur sur les lymphocytes du donneur. Si des anticorps cytotoxiques contre des antigènes de classe I du donneur sont détectés chez le patient, le greffon ne lui conviendra pas. De plus, la meilleure adéquation possible quant au groupe HLA reste souhaitable, surtout aux locus DR, DP et DQ (classe II) et dans une moindre mesure aux locus A, B et C (classe I) (Kolopp-Sarda et al., 2008).

En France, la survie globale du greffon rénal à un an post-greffe passe de 90,1% en 1995 à 92,8% en 2007 (rapport d'activités 2008 de l'agence de la Biomédecine

concernant la greffe rénale). La durée de vie moyenne d'un greffon est d'une douzaine d'années, ce qui demande plusieurs transplantations dans une vie. Cependant, certains greffons continuent à fonctionner correctement après 25 ans. Neuf personnes sur dix ayant reçu un rein d'un donneur cadavérique sont encore en vie 10 ans après l'intervention ; alors qu'un patient sur deux seulement est toujours vivant après 10 ans de dialyse.

Lorsque le rein greffé cesse de fonctionner, la dialyse redevient indispensable, et le patient peut à nouveau être inscrit sur la liste des demandeurs d'organe. Le rein transplanté n'est pas forcément enlevé.

Des bilans réguliers et lourds sont nécessaires tout au long de la vie du patient transplanté, afin de vérifier la fonctionnalité du rein, de dépister des signes de rejet et de contrôler les éventuels effets secondaires des médicaments administrés.

1.2. Les complications après transplantation.

1.2.1. Le rejet d'allogreffe.

Trois types de rejet d'allogreffes sont décrits, classés par leurs mécanismes et par leur chronologie d'apparition post-transplantation : rejets de greffe hyper-aigus, aigus et chroniques.

1.2.1.1. Les rejets de greffe hyper-aigus.

Ils se manifestent dans les minutes à quelques heures suivant le rétablissement de la continuité vasculaire du greffon.

Le rejet hyper-aigu est lié à une réponse humorale préexistante chez le receveur. Il est secondaire à la fixation, sur l'endothélium vasculaire du greffon, d'anticorps cytotoxiques préformés contre les antigènes du donneur. Ces anticorps peuvent être naturels, dirigés contre les antigènes de groupe sanguin ABO (Immunoglobuline M ou IgM), les antigènes d'histocompatibilité (en particulier anti-HLA de classe I, IgG), ou des antigènes de l'endothélium vasculaire. Ces anticorps, ayant reconnu l'antigène, fixent et activent le système du complément, provoquant des lésions des cellules endothéliales du greffon et l'accumulation de cellules polynucléaires dans les capillaires glomérulaires et pré-tubulaires, ce qui entraîne une réaction inflammatoire, l'extravasation de cellules et de plasma, l'agrégation et l'activation plaquettaire en plus des dépôts de fibrine conduisant à la thrombose des micro-vaisseaux et à l'arrêt de la circulation sanguine. Le greffon se nécrose alors en quelques minutes, le plus souvent au cours de l'intervention, et il doit être retiré immédiatement.

Les rejets hyper-aigus ne se rencontrent pratiquement plus de nos jours car, d'une part, la compatibilité ABO est une condition essentielle à la transplantation, et d'autre

part, la présence d'anticorps anti-antigènes du donneur préexistant dans le sérum du receveur est recherchée par un cross-match réalisé impérativement avant l'intervention.

1.2.1.2. Les rejets de greffe aigus.

En l'absence d'immunosuppression ou en présence d'une immunosuppression insuffisante, les rejets aigus se manifestent après une à deux semaines post-transplantation car ils nécessitent une immunisation du receveur vis-à-vis des antigènes du greffon. Dans les conditions normales de traitement immunosuppresseur, le rejet aigu survient essentiellement dans les quatre premiers mois après la transplantation, avec un pic de fréquence le premier mois. Néanmoins, il peut s'observer à tout moment en cas d'arrêt de ces traitements ou de doses insuffisantes.

Le rejet aigu est un désordre inflammatoire systémique, dont plusieurs symptômes sont dus à la libération de cytokines. L'expression de l'interleukine-2 (IL-2) et de l'interféron γ augmente le développement d'un infiltrat interstitiel typique.

Le mécanisme du rejet aigu est complexe car il met en jeu des réponses immunitaires, cellulaires et/ou humorales, spécifiques des allo-antigènes du donneur. Quatre-vingt-dix pour cent des rejets aigus sont à médiation cellulaire, et peuvent être traités plus facilement que les rejets à médiation humorale. En 2006, en France, le pourcentage de rejets aigus cellulaires dans la première année post-greffe était de 20% (Hertig et al., 2006). Le mécanisme cellulaire implique des lymphocytes T (LT) auxiliaires CD4+ et cytotoxiques CD8+, des cytokines pro-inflammatoires, responsables de lésions tissulaires (apoptose, fibrose) et vasculaires (vasoconstriction) irréversibles. Les LT CD8+ contiennent des granules cytolytiques qui libèrent le granzyme B et les perforines, causant des dommages membranaires et induisant l'apoptose des cellules du greffon (Colvin et al., 1997; Racusen et al., 1999c). Le mécanisme humoral met en jeu des allo-anticorps spécifiques des antigènes du donneur, mécanisme de cytotoxicité délétère pour les tissus greffés.

Le diagnostic du rejet aigu est établi sur des signes cliniques et biologiques, dépendant de l'organe transplanté et traduisant son dysfonctionnement (évolution de la créatinine urinaire et sérique, filtration glomérulaire...). Mais ces signes sont non spécifiques et le rejet doit être confirmé par une biopsie du greffon pour une analyse histologique et immunohistochimique, montrant des infiltrats lymphocytaires et des lésions tissulaires et vasculaires caractéristiques (Takemoto et al., 2004). Les rejets humoraux sont mis en évidence par la présence de dépôts de facteurs du complément C4d, produit de dégradation du complément, recherchés en immunofluorescence sur la biopsie. L'ensemble de ces éléments permet de classer les rejets aigus en différents grades de gravité selon la classification de Banff (Annexe 1) (Racusen et al., 1999d; Solez et al., 2008). Le diagnostic précoce de ces rejets est très important car le rejet peut être réversible. Il permet alors une prise en charge rapide du patient avec une instauration

immédiate de traitements immunosuppresseurs adaptés à forte dose, afin de limiter les lésions tissulaires d'origine immunologique au sein du greffon (Takemoto et al., 2004).

La plupart des rejets aigus n'aboutissent pas à la perte du greffon à court terme, car ils sont diagnostiqués et traités rapidement. En revanche, ces rejets ont des conséquences à long terme. En effet, il a été observé que la fréquence, le nombre, le type (cellulaire ou humoral) et le délai d'apparition des rejets aigus sont des paramètres directement liés au devenir du greffon à plus long terme (Paul, 2001). Les épisodes répétés et tardifs de rejets aigus sont plus particulièrement prédictifs de rejets chroniques et de perte du greffon.

1.2.1.3. Les « rejets de greffe chroniques », ou dysfonction chronique du greffon.

Les atteintes anatomiques et fonctionnelles chroniques du greffon, autrefois appelées « rejet chronique », débutent certainement au moment de la transplantation pour se développer sur de nombreuses années, aboutissant à la perte du greffon. Les signes cliniques et biologiques traduisent une dysfonction progressive de l'activité rénale, accompagnée de fibrose interstitielle chronique, d'atrophie tubulaire, d'occlusions vasculaires et de sclérose glomérulaire.

Les facteurs de dysfonction chronique sont de deux ordres :

- immunologique : les épisodes de rejets aigus répétés et tardifs, et en particulier les rejets humoraux, sont incriminés dans les lésions tissulaires retrouvées dans les rejets chroniques ; mais leur rôle reste difficile à interpréter ;
- non-immunologique : l'âge du donneur, les lésions initiales de l'organe, le temps d'ischémie froide et les lésions de conservation du greffon (*ex-vivo*), les infections, les obstructions, la néphrotoxicité des immunosuppresseurs, et en particulier des inhibiteurs de la calcineurine (Nankivell et al., 2003; Racusen et al., 1999a), les désordres métaboliques, l'hypertension artérielle, la récurrence de la néphropathie initiale et les glomérulonéphrites de novo, les infections opportunistes comme le cytomégalovirus (CMV) (Fishman, 2007).

1.2.2. Le mécanisme d'activation des lymphocytes T.

Des antigènes du donneur sont présentés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du donneur et/ou du receveur, sous forme de peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les LT naïfs quittent le thymus, lieu de leur naissance, et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour y être activés grâce à l'interaction avec la CPA. La différenciation des LT naïfs en LT activés s'effectue en plusieurs étapes, dont chacune doit être couronnée de succès.

L'activation du LT est déclenchée par la reconnaissance entre l'ensemble CMH-antigène de la CPA et son complexe multimoléculaire exprimé à sa membrane, composé du récepteur T spécifique de l'antigène (RcT) et des chaînes polypeptidiques du CD3. Les molécules CD4 ou CD8, co-réceptrices du RcT, jouent un rôle important dans le processus. La transduction de signaux est alors induite, donnant ainsi naissance au « premier signal » (Hubert, 1996).

Des molécules d'adhésion comme LFA-1 (sur le LT) et ICAM-1 (sur la CPA) interviennent en augmentant l'affinité entre ces deux cellules. Cette première activation va entraîner l'augmentation de l'expression du ligand du récepteur CD40 (CD40L) à la surface du LT, qui va interagir avec le CD40 présent sur la CPA. L'augmentation du nombre de protéines CD80 ou CD86 à la membrane de la CPA est induite par les signalisations du CD40 et du CMH-antigène (« signal 1 »). Ces deux types de molécules se lient au CD28, qui est constitutivement exprimé sur le LT. Ce « deuxième signal » est donc non spécifique de l'antigène reconnu au premier signal (Halloran, 2004).

La présence de ces deux signaux active plusieurs cascades de signalisation intracellulaire aboutissant toutes à la production de l'interleukine 2 (IL-2) par le LT. Le complexe TcR/CD3 permet, via la phospholipase C et Zap-70, l'activation de la calcineurine et de la voie des MAP-kinases. La transcription du gène *IL-2* est augmentée par l'activation de facteurs de transcription NFAT, NF- κ B (voie de la calcineurine), Fos et Jun (voie des MAP-kinases). La cytokine IL-2 produite va interagir avec son récepteur CD25 induisant une nouvelle cascade de signalisation (« signal 3 »). Les JAK kinases et la PI3 kinase sont recrutées à la membrane, activant ainsi Akt, qui elle-même active la mTOR, conduisant à une prolifération autocrine du LT (Figure 1).

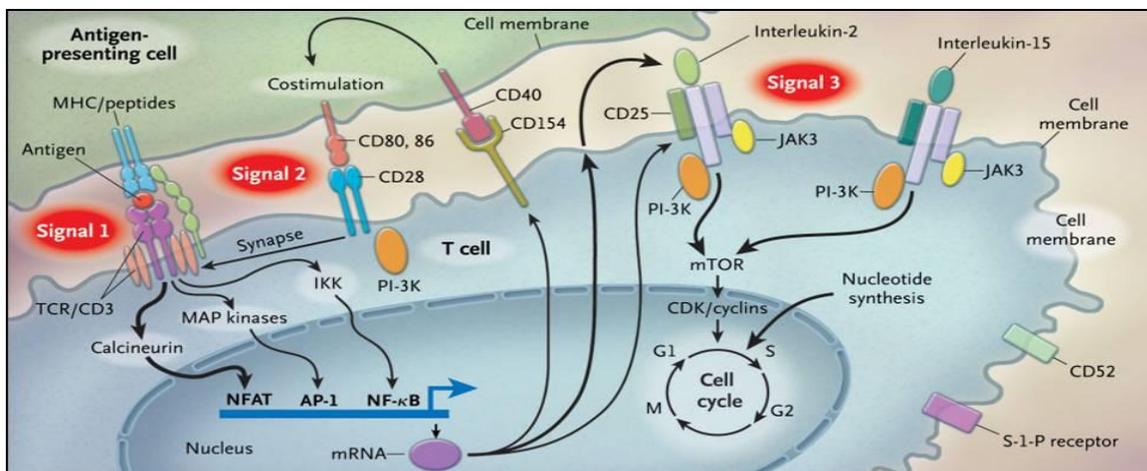


Figure 1. Activation des lymphocytes T en présence d'une cellule présentatrice d'antigène : les 3 signaux nécessaires à leur activation (Halloran, 2004).

La prolifération cellulaire requiert la synthèse nucléotidique des bases puriques et pyrimidiques.

1.2.3. Les infections virales et le rejet d'allogreffe.

Les infections ou réactivations virales, favorisées par les traitements immunosuppresseurs, sont également des événements favorisant les rejets aigus et chroniques. Leur prévention a permis de diminuer l'incidence des rejets. Les relations immunologiques entre infections et rejets sont complexes. Trois périodes post-transplantation particulières sont décrites pour le développement d'infections : 1 mois, 1 à 6 mois, et après 6 mois (Fishman, 2007).

1.2.3.1. Le mois suivant la transplantation.

La plupart des infections peuvent se développer, liées aux complications chirurgicales et techniques (infections bactériennes ou fongiques, infections nosocomiales, liées aux dispositifs médicaux...). Les infections virales les plus fréquentes durant cette période sont des réactivations du virus de l'Herpes Simplex (HSV), dont l'incidence a largement diminué depuis la mise en place de traitements préventifs.

1.2.3.2. Entre 2 et 6 mois post-transplantation.

Les infections propres à la transplantation apparaissent : les infections opportunistes virales (CMV, HSV, virus de la varicelle ...), fongiques (*Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis carinii* ...), bactériennes ou parasitaires (*Nocardia*, *Listeria*, *Toxoplasma* ...). Les infections à CMV sont les plus fréquemment rencontrées.

Des effets pathogènes directs pour le greffon sont attribuables aux infections virales du fait de la cytotoxicité du virus lors de sa réplication dans les cellules du greffon. De plus, les infections virales sont responsables d'une immunosuppression, par le biais de la sécrétion de molécules homologues de certaines cytokines, codées par le virus et synthétisées par les cellules infectées, qui aggrave l'immunosuppression thérapeutique chez les patients transplantés. Cette intensification du déficit immunitaire a comme conséquence d'augmenter le risque de développement d'autres infections opportunistes.

1.2.3.3. Au-delà de 6 mois post-transplantation.

Les patients peuvent développer les infections couramment rencontrées dans la population générale (infections à virus *Influenzae* ou pneumocoque, infections urinaires...) en plus des infections opportunistes.

Ces patients sont d'autant plus à risque de développer des infections qu'ils ont eu des épisodes fréquents de rejets aigus, traités par des doses massives d'immunosuppresseurs, ou un rejet chronique traité par une augmentation des posologies d'immunosuppresseurs maintenue à long terme.

La mémoire immunitaire du patient pour des infections perturbe la mise en place de la tolérance vis-à-vis de l'allogreffe.

2. Le traitement immunosuppresseur en transplantation rénale.

Le rejet est une réaction immunologique cellulaire entraînant une activation des lymphocytes, la production de médiateurs et une attaque du greffon conduisant à sa destruction. Le traitement immunosuppresseur qui devra être pris toute la vie a pour but de prévenir les épisodes de rejet du rein greffé, en inhibant la fonction des lymphocytes B et surtout T. Le rôle des cellules Natural Killer (NK) est controversé à ce sujet. Le risque de perte du greffon rénal est maximal au cours des six mois suivant la transplantation, mais ce risque peut être maîtrisé. Par la suite, le traitement peut être allégé, en fonction des bilans.

Actuellement, il existe diverses molécules immunosuppresseives pouvant inhiber une ou plusieurs des étapes de l'activation du LT précédemment décrites (Tableau 1).

Il faut noter qu'un même schéma immunosuppresseur ne doit pas être administré à tous les patients. En effet, les patients transplantés sont différents non seulement face au risque de rejet, mais aussi aux risques de l'immunosuppression.

Les protocoles immunosuppresseurs associent souvent plusieurs médicaments appartenant à des classes chimiques différentes. Deux groupes peuvent être distingués selon le moment de leur utilisation : le traitement d'induction et le traitement d'entretien.

2.1. Le traitement d'induction.

Ce traitement n'est pas systématique, toutefois il est classiquement utilisé en transplantation rénale en France. Il consiste en l'utilisation d'anticorps mono- ou polyclonaux avant l'implantation du greffon, afin de diminuer la réponse immune du receveur et le risque de rejet aigu et d'accélérer la reprise de la fonction rénale après la transplantation. Deux types d'anticorps anti-lymphocytaires sont principalement utilisés :

- les anticorps dits « non-déplétants » : anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de l'IL-2 (CD25) (basiliximab ou Simulect®, daclizumab ou Zenapax®) (Vincenti et al., 1998) ;

- les anticorps dits « déplétants » : (i) anticorps polyclonaux animaux dirigés contre les LT CD3+ (immunoglobulines anti-thymocytes humains tels que la thymoglobuline) (Peddi et al., 2002); (ii) anticorps monoclonaux dirigés contre les LT CD3+ (muromonab-CD3 ou Orthoclone OKT3®) (Halloran, 2004); (iii) anticorps monoclonaux dirigés contre le CD20 des lymphocytes B (rituximab ou MabThera®) (Buhaescu et al., 2005; McDonald and Leandro, 2009) (Figure 2).

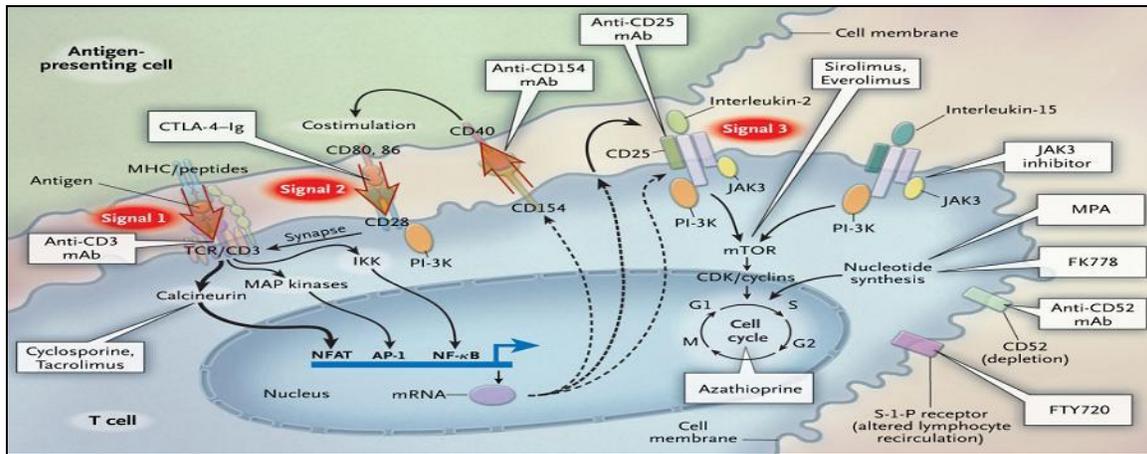


Figure 2. Sites d'action des différents médicaments immunosuppresseurs (Halloran, 2004).

2.2. Le traitement d'entretien.

Pour prévenir le rejet du greffon, un grand nombre de patients reçoivent de nos jours une trithérapie d'immunosuppresseurs, comprenant : un corticoïde, un agent antiprolifératif lymphocytaire et un inhibiteur de la calcineurine (ou plus récemment un inhibiteur de la mTOR).

2.2.1. Les corticoïdes.

Les corticoïdes agissent de trois manières différentes sur la régulation de la transcription génique par :

- activation, via leur fixation sur des éléments de réponse positive aux corticoïdes (GREs);
- répression, via leur fixation sur des GREs négatifs ;
- interférence transcriptionnelle, via leur interaction avec d'autres facteurs de transcription (Karin, 1998).

Les corticoïdes sont utilisés en première intention pour endiguer les rejets aigus, à fortes doses pendant les premiers jours suivant la greffe, puis à doses dégressives et généralement arrêt au bout de quelques mois chez l'adulte. Chez les enfants, les

Tableau 1. Principales molécules immunosuppressives utilisées lors du traitement de patients transplantés rénaux.

Type de traitement	Molécules thérapeutiques	Dénomination commune internationale et/ou commerciale	Références	
Induction	Anticorps dits « non-déplétants » : anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de l'IL-2 (CD25)	Basiliximab ou Simulect®, daclizumab ou Zenapax®	(Vincenti et al., 1998)	
	Anticorps polyclonaux animaux dirigés contre les LT CD3+	Immunoglobulines anti-thymocytes humains : thymoglobuline	(Peddi et al., 2002)	
	Anticorps dits « déplétants »	Anticorps monoclonaux dirigés contre les LT CD3+	Muromonab-CD3 ou Orthoclone OKT3®	(Halloran, 2004)
	Anticorps monoclonaux dirigés contre le CD20 des lymphocytes B	Rituximab ou MabThera®	(Buhaescu et al., 2005; McDonald and Leandro, 2009)	
Entretien	Analogues des bases puriques	Azathioprine ou Imurel®	(Poulter et al., 1974)	
	Agents antiprolifératifs lymphocytaires	Inhibiteurs de la voie de synthèse des purines	MMF ou Cellcept®/ Myfortic®	(Sollinger, 1995)
		Inhibiteurs de la mTOR	Sirolimus ou Rapamune®, évérolimus ou Certican®	(Schuler et al., 1997)
	Substances en devenir	Inhibiteurs de la calcineurine	Ciclosporine ou Néoral®, Sandimmun®, tacrolimus ou FK506, Prograf®	(Naesens et al., 2009)
		Inhibiteur interaction CD80 ou CD86 avec CD28	LEA29Y ou Belatacept®	(Emamaullee et al., 2009)
		Anticorps monoclonal anti-CD52	Alemtuzumab ou Mabcampath®	(Knechtle et al., 2003)
		Inhibiteurs des JAK kinases	R348, CP-690	(Deuse et al., 2008; Vincenti et al., 2010)
	Inhibition de la voie de signalisation CD40-CD40L		Anticorp monoclonal : 4D11	(Aoyagi et al., 2009)
Inhibiteurs des canaux K ⁺	TRAM-34	(Grgic et al., 2009)		

corticoïdes sont maintenus à faibles doses durant une longue période, ce qui pourrait favoriser des complications métaboliques, comme le diabète et l'ostéopénie fracturaire.

Par ailleurs, ils induisent, entre autres via le Pregnane X Receptor, l'expression de plusieurs protéines impliquées dans le transport (ex. P-glycoprotéine) et le métabolisme des xénobiotiques (ex. cytochrome P450 3A), en augmentant leur activité. Par conséquent, la pharmacocinétique des autres médicaments co-administrés peut en être modifiée (interaction médicamenteuse pharmacocinétique) (Anglicheau et al., 2003b; Anglicheau et al., 2003a).

2.2.2. Les agents antiprolifératifs.

Trois groupes de molécules peuvent être distingués selon leur mode d'action :

- Les analogues des bases puriques : l'azathioprine (ou Imurel®) a été l'un des premiers immunosuppresseurs mis sur le marché. Ce médicament et ses métabolites étant des analogues des bases puriques, ils entrent en compétition avec les bases physiologiques, interférant avec la synthèse d'ADN dans toutes les cellules de l'organisme en prolifération (Poulter et al., 1974). Il est de moins en moins utilisé depuis la découverte et l'utilisation du mycophénolate mofétil (MMF), sauf chez les patientes désirant une grossesse.

- Les inhibiteurs de la voie de synthèse des purines : le plus utilisé des agents antiprolifératifs est le mycophénolate mofétil (MMF ou Cellcept®), prodrogue de l'acide mycophénolique. C'est un inhibiteur spécifique de l'inosine monophosphate deshydrogénase (IMPDH), enzyme clé de la voie de recyclage des purines (Sollinger, 1995). Ses principaux effets secondaires sont des désordres gastro-intestinaux (diarrhées), et hématologiques (anémies, leucopénies). Leurs mécanismes d'apparition sont encore mal connus. Récemment, un sel sodique du mycophénolate a été commercialisé (Myfortic®). Il présente l'avantage d'être gastro-résistant, ce qui pourrait diminuer l'incidence des effets indésirables digestifs (Afssaps, 2005).

- Les inhibiteurs de la mTOR : le sirolimus (ou Rapamune®) et l'évérolimus (ou Certican®) se lient à la protéine FKBP12, formant un complexe qui inhibe la mTOR. Le signal 3 est bloqué, donc l'activation du cycle cellulaire par les récepteurs cytokiniques n'a pas lieu (Schuler et al., 1997) (Figure 2). Leurs principaux effets secondaires sont les hyperlipidémies, les thrombocytopénies, les ulcères muqueux, les retards de cicatrisation, ainsi que des pneumopathies, rares mais graves.

2.2.3. Les inhibiteurs de la calcineurine.

Ils ont été découverts il y a environ 30 ans. Les deux inhibiteurs les plus usuellement utilisés sont la ciclosporine (Néoral®, Sandimmun®) et le tacrolimus (FK506, Prograf®). Après fixation de la ciclosporine à la cyclophiline et du tacrolimus à

la FKBP12, ces deux complexes moléculaires inhibent la calcineurine, phosphatase dont la cible est le facteur de transcription NFAT. Ce dernier est normalement déphosphorylé par la calcineurine, ce qui lui permet de migrer dans le noyau pour activer la transcription du gène *IL-2*. La calcineurine est particulièrement exprimée au niveau des lymphocytes, ce qui confère à ces molécules un effet immunosuppresseur relativement spécifique, malgré l'ubiquité du NFAT (Naesens et al., 2009).

Les inhibiteurs de la calcineurine sont responsables d'effets secondaires graves, dont le diabète, l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, l'augmentation du risque de cancer, et la néphrotoxicité. Chez les nouveaux patients transplantés, le tacrolimus est plus fréquemment prescrit que la ciclosporine (Figure 2).

2.2.4. Les substances en devenir.

De nouvelles molécules ayant une activité immunosuppressive sont découvertes régulièrement et sont testées comme médicaments anti-rejet en transplantation (Figure 2) :

- Le LEA29Y (ou Belatacept®) : protéine de fusion constituée d'une région constante d'une immunoglobuline G1 et du domaine extracellulaire de CTLA-4 (molécule co-stimulatrice exprimée à la surface des LT_{CD4+} qui se lie au CD80 ou au CD86 de la CPA transmettant un signal inhibiteur via la molécule de co-stimulation CD28 présentée par le LT). Le LEA29Y se fixe aux ligands CD80 ou CD86 des CPAs, empêchant ainsi par inhibition compétitive leur interaction avec la molécule de co-stimulation CD28 du LT (Emamaullee et al., 2009).
- L'alemtuzumab (ou Mabcampath®) : anticorps monoclonal anti-CD52, qui diminue massivement les populations lymphocytaires. Il n'est pas encore indiqué en transplantation rénale (Knechtle et al., 2003).
- Les inhibiteurs des JAK kinases : inhibent la transmission du signal permettant la prolifération lymphocytaire au niveau des récepteurs cytokiniques. Sont en cours de développement : R348 (Deuse et al., 2008), CP-690 (Vincenti et al., 2010).
- Le blocage de la voie de signalisation CD40-CD40L (CD40L ou CD154) : anticorps monoclonaux en cours de développement. L'anti-CD154 a été abandonné pour cause de complications thromboemboliques. Le 4D11 (anti-CD40) a pris la relève, et les essais sur les primates semblent prometteurs (Aoyagi et al., 2009).
- Le TRAM-34 : bloqueur spécifique des canaux K^+ activés par le calcium, $K_{Ca3.1}$, aurait un rôle anti-fibrotique (Grgic et al., 2009). Cette molécule prometteuse n'est pas encore disponible pour les cliniciens.

L'immunomodulation de la greffe rénale, qui correspond à la préparation immunologique du receveur et aux traitements immunosuppresseurs employés après la greffe, est une balance constante entre la nécessité d'induire une immunosuppression

élevée et la prévention des complications infectieuses induites par l'immunosuppression et des effets indésirables de ces médicaments, prescrits à long terme.

3. Le fractionnement protéique et la détection par spectrométrie de masse.

Les fluides biologiques se caractérisent par une très grande complexité. En effet, des milliers de protéines sont présentes (Anderson and Anderson, 2002), pouvant porter différentes modifications post-traductionnelles, mais aussi subir des dégradations protéolytiques dues aux protéases présentes dans le milieu. Le protéome de ces fluides biologiques se caractérise par une large gamme dynamique, avec des masses moléculaires de 1 à 1 000 kDa et des concentrations variant de la femtomole/L à la millimole/L.

En raison de cette grande hétérogénéité, le protéome entier d'un mélange protéique complexe ne peut être analysé en une seule fois (et même probablement pas analysé en totalité en l'état actuel des connaissances et des techniques). Il est donc nécessaire de le simplifier. Pour diminuer la complexité du mélange, et ainsi obtenir une meilleure identification des protéines présentes, deux approches peuvent être utilisées et/ou combinées :

- dépler une partie des peptides et/ou protéines composant le mélange : membrane poreuse à seuil massique, précipitation, anticorps spécifiques dirigés contre des protéines majoritaires les plus communes ;
- fractionner les peptides et/ou les protéines, selon leurs propriétés physico-chimiques : électrophorèse bidimensionnelle, électrophorèse capillaire, chromatographie liquide à haute performance.

L'analyse qualitative et/ou quantitative des protéines ou peptides fractionnés est effectuée essentiellement par spectrométrie de masse. En effet, l'utilisation des techniques d'ionisation couplées à des analyseurs de masses de plus en plus résolutive, sensibles et rapides rend possible l'analyse de quantités très faibles (jusqu'à quelques femtomoles) de protéines et/ou peptides (Aebersold and Mann, 2003).

3.1. Les techniques de fractionnement des mélanges protéiques complexes.

L'électrophorèse est, avec la chromatographie liquide, la principale des techniques utilisées en biologie pour la séparation et la caractérisation des molécules. Les avantages et les inconvénients de ces deux techniques sont exposés dans le tableau 2.

3.1.1. L'électrophorèse.

Le principe de l'électrophorèse est fondé sur le déplacement d'ions sous l'effet d'un champ électrique. Le support de ce dernier peut être solide ou liquide.

L'électrophorèse de zones.

Le mélange à séparer est déposé sur un support homogène, poreux et imprégné du tampon de migration. Les différents types d'électrophorèse de zones sont souvent nommés en fonction du support utilisé : électrophorèse sur papier, sur acétate de cellulose, ou sur gel (amidon, agarose, polyacrylamide...).

Les spots protéiques sont révélés sur le gel par différents procédés de coloration plus ou moins sensibles (bleu de Coomassie, nitrate d'argent...). Plus la protéine sera abondante, et plus le spot sera intense.

Les protéines ayant une variation significative d'intensité entre deux conditions données sont alors analysées par spectrométrie de masse après un protocole de digestion trypsique en-gel.

L'électrophorèse est largement utilisée, bien qu'elle présente des limites : les protéines peu abondantes ne sont pas détectées, les protéines hydrophobes et très basiques sont mal séparées, et les protéines ayant une taille inférieure à 10 kDa sont perdues (Gygi et al., 2000).

3.1.2. La chromatographie.

La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique qualitative et quantitative, sépare les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé).

Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixes et mobiles sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille, la polarité, la charge électrique, la présence d'atomes formant des sites particuliers. Les différents types de chromatographie résultent du fait que l'effet de l'un de ces facteurs est privilégié, mais l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique.

Les méthodes chromatographiques, bien que très diverses, mettent en jeu un certain nombre de principes communs :

- les substances se répartissent entre deux phases non miscibles, selon un équilibre lié à un coefficient de partition, dépendant à la fois de la nature des composés et de celle des deux phases considérées ;

- le renouvellement continu de la phase mobile remet en cause cet équilibre et entraîne une succession d'autres équilibres, se traduisant par une migration des substances le long de la phase stationnaire ;
- la séparation est obtenue car chaque composé migre avec une vitesse qui lui est propre.

La chromatographie liquide à haute performance.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est utilisée en protéomique pour concentrer et séparer un mélange complexe de protéines et/ou de peptides. Plus le volume dans lequel est éluée la molécule est petit, plus sa concentration est importante, et meilleure est l'intensité du signal. En effet, la réponse de l'analyseur est en général dépendante de la concentration du produit analysé, et non du débit utilisé.

Actuellement, pour étudier les protéines et/ou les peptides les moins abondants d'un mélange complexe, la nano-HPLC est couramment utilisée, en couplage direct (« on-line ») ou indirect (« off-line ») avec un spectromètre de masse.

Plusieurs colonnes chromatographiques peuvent être combinées en ligne pour obtenir une meilleure séparation en utilisant différentes propriétés physico-chimiques (la charge, l'hydrophobicité ...). L'automatisation ainsi que le couplage direct de l'HPLC avec un spectromètre de masse rendent possible l'étude d'un nombre important d'échantillons, nécessaire pour la découverte et la validation de biomarqueurs (Issaq and Blonder, 2009).

Tableau 2. Avantages et inconvénients des différentes techniques de fractionnement utilisées en protéomique. Electrophorèse en gel (Gygi et al., 2000) et chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Issaq and Blonder, 2009).

Technique de fractionnement	Avantages	Inconvénients
Electrophorèse en gel	Bonne résolution ; adaptée aux protéines ; possibilité de récupérer les protéines dénaturées après séparation.	Nécessite une grande quantité de protéines ; mauvaise séparation des protéines ayant des pI extrêmes ; pas adaptée aux petites molécules (<10 kDa) ; peu reproductible ; temps de réalisation long ; difficilement automatisable.
HPLC	Bonne résolution ; reproductible ; adaptée aux protéines comme aux peptides ; plusieurs types de colonnes disponibles et possibilité de les combiner ; automatisable ; peut être couplée à plusieurs types de détecteurs.	Nécessite une grande quantité d'échantillons (sauf nano-HPLC) ; séparations longues ; perte d'échantillon à l'injection (peut être évitée avec certains types d'injecteurs) ; effets mémoires.

3.2. La spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse (MS) est une technique physique permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse sur charge (m/z) et de caractériser leur structure chimique par fragmentation. Son principe réside dans la séparation sous vide de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z), avec pour certains détecteurs la mesure de leur temps d'atteinte du détecteur (TOF).

Par définition, un spectromètre de masse se compose d'une source d'ionisation, d'un analyseur de masse qui sépare les analytes ionisés selon leur ratio m/z et d'un détecteur qui enregistre le nombre d'ions relié directement à leur abondance pour chaque valeur de m/z .

Les avantages et les inconvénients des deux appareils de spectrométrie de masse utilisés dans nos études sont exposés dans le tableau 3.

3.2.1. Le système d'introduction de l'échantillon dans l'analyseur.

Les échantillons peuvent être introduits de deux manières :

- directement dans la source d'ionisation : sous forme gazeuse, liquide (infusion), ou solide (canne d'introduction directe, dépôt sur plaque ...) ;
- par l'association à une méthode séparative : électrophorèse capillaire, chromatographie en phase gazeuse ou liquide.

3.2.2. Les sources d'ionisation.

La source d'ionisation est le dispositif qui permet d'ioniser les substances à analyser. Elle peut être utilisée en mode positif comme en mode négatif. Plusieurs types de sources existent et sont utilisés en fonction : de l'énergie interne transférée pendant le processus d'ionisation, et de la nature physico-chimique des analytes qu'elles peuvent ioniser.

Les sources d'ionisation peuvent être classées en trois catégories : l'ionisation en phase gazeuse, l'ionisation en phase liquide, et l'ionisation à l'état solide.

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux deux types de sources d'ionisations utilisés au cours de ces études : l'ionisation – désorption laser assistée par une matrice (MALDI) et l'ionisation électrospray (ESI).

3.2.2.1. L'ionisation - désorption laser assistée par une matrice.

Cette technique fait appel à une matrice organique solide aromatique (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique, acide sinapinique, acide 2.5-dihydroxybenzoïque ...) ayant une forte absorption à la longueur d'onde du laser, dans laquelle est dispersée l'échantillon (10^4 molécules de matrice pour une molécule d'échantillon, l'ensemble étant co-cristallisé). Le mélange matrice-échantillon doit être déposé préalablement sur une plaque métallique conductrice.

L'irradiation laser se produit sous vide à l'intérieur de la source du spectromètre de masse, et se traduit par une excitation électronique et thermique des molécules de la matrice qui peuvent céder des protons à l'échantillon, conduisant ainsi à son ionisation. La matrice sert donc de vecteur d'énergie entre le faisceau laser et la molécule d'échantillon (Karas and Hillenkamp, 1988) (Figure 3).

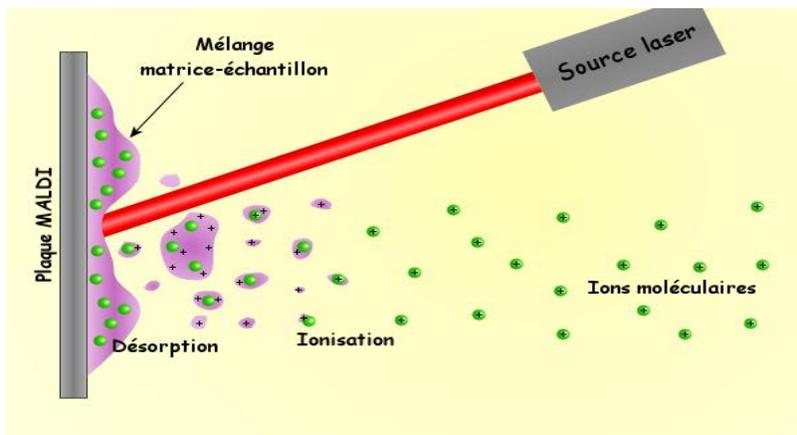


Figure 3. Schéma de l'ionisation – désorption laser assistée par une matrice (MALDI).

Cette source d'ionisation est généralement couplée à un analyseur à temps de vol (Olthoff et al., 1988).

3.2.2.2. L'ionisation électrospray ou électronébulisation.

Le principe de l'électronébulisation consiste en la formation d'ions chargés (positifs/négatifs) dans un liquide à faible débit (1 à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$), sous l'effet d'un champ électrique intense à pression atmosphérique. Ce phénomène peut être décomposé en trois étapes (Smith et al., 1990b) (Figure 4) :

- Formation de gouttelettes (1 μL) chargées de l'analyte en solution par application d'une tension sur un capillaire fin métallique.

- Rencontre des gouttelettes avec un flux d'azote chaud à contre-courant conduisant à l'évaporation progressive du solvant. Il en résulte une diminution de la taille des gouttelettes, avec augmentation de la densité des charges au sein de la solution. La fission de ces gouttelettes est réalisée par répulsion coulombienne en dessous d'un rayon critique, appelé rayon de Rayleigh.
- Emission des ions solvatés en phase gazeuse.

Au cours de cette ionisation, les molécules non volatiles peuvent être ionisées et transmises en phase gazeuse sans fragmentation ou destruction de la molécule. De ce fait, cette technique est parfaitement adaptée pour l'étude des molécules polaires et thermolabiles.

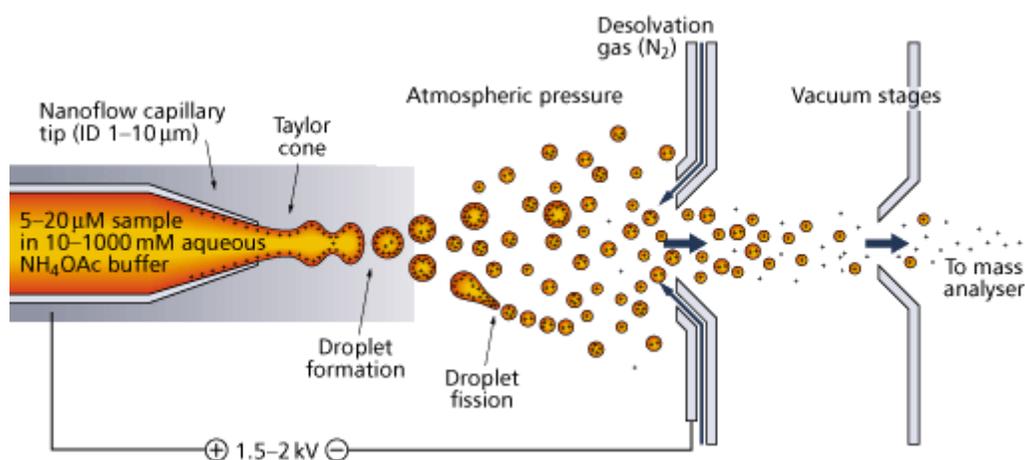


Figure 4. Schéma de l'ionisation par électrospray.

La source ESI a rapidement été couplée à la chromatographie en phase liquide (Whitehouse et al., 1985). De plus, elle a été miniaturisée afin d'être utilisable en couplage direct avec des systèmes chromatographiques de type nano-débit (Wilm and Mann, 1996). Elle peut être couplée à plusieurs types d'analyseurs de masse, dont les analyseurs quadripolaires, à temps de vol, à trappe d'ions, ou à résonance cyclotronique...

3.2.3. Les analyseurs ou séparateurs de masse.

L'analyseur permet de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z . Il en existe de basse et de haute résolution.

Ils peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem. En général, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision fragmente ces ions triés selon leur rapport m/z et un second analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs (comme les pièges à ions ou la résonance cyclotronique ionique à transformation de Fourier) sont constitués de plusieurs analyseurs

en un et permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement. Seuls les analyseurs à temps de vol, quadripolaire et à piège quadripolaire seront exposés plus en détail.

3.2.3.1. L'analyseur à temps de vol ou TOF.

Cette technique consiste en la mesure du temps que mettent les ions à parcourir une distance donnée dans une zone libre de champ, appelée tube de vol, après avoir été accélérés par un champ électrique. La séparation des ions ne dépend donc que de la vitesse acquise lors de la phase d'accélération. Par conséquent les ions ayant un rapport m/z très petit arrivent en premier au détecteur (Wiley, 1956).

Le mode réflectron permet de palier au manque de résolution de cet analyseur (Vestal and Campbell, 2005) : un miroir électrostatique impose un champ électrique de direction opposée à celle du champ accélérateur initial, et donc au mouvement des ions. Les plus énergétiques arrivent en premier au niveau du réflectron et vont y pénétrer plus profondément. Ils seront donc réfléchis dans un temps plus long. Ainsi, tous les ions ayant un rapport m/z identique se trouvent focalisés sur un même plan, le détecteur du réflectron étant placé sur le plan de focalisation de ces ions (Weickhardt et al., 2003).

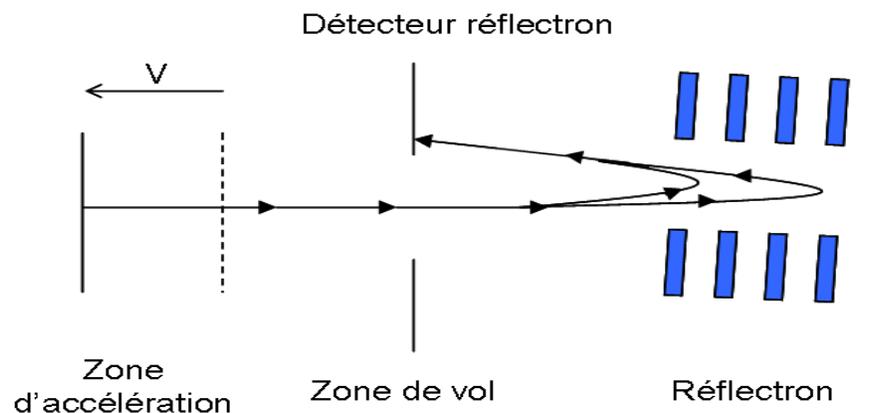


Figure 5. Schéma d'un spectromètre de masse à temps de vol équipé d'un réflectron.

3.2.3.2. Le quadripôle ou quadrupôle.

L'analyseur quadripolaire (Q) est constitué de quatre électrodes parfaitement parallèles, ayant une section circulaire ou, idéalement, hyperbolique. Les électrodes opposées deux à deux sont reliées entre elles et sont soumises au même potentiel (Annexe 2).

Les ions cheminant au centre des électrodes sont soumis à l'influence d'un champ électrique total constitué d'un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant. Le temps de traversée de l'analyseur doit être petit par rapport au temps

nécessaire pour passer d'une masse à l'autre, mais doit être au moins égal au temps de quelques oscillations de la tension alternative (De Hoffmann E. and Stroobant V., 1994).

Comme la vitesse de balayage peut être facilement très élevée, ce détecteur est bien adapté aux couplages chromatographiques.

3.2.3.3. Le piège ionique quadripolaire.

Le piège à ions quadripolaire (Ion-Trap ou Quistor) est constitué de trois électrodes à section hyperbolique : une électrode annulaire encadrée par deux électrodes (d'entrée et de sortie) formant les calottes supérieure et inférieure du dispositif. L'entrée des ions s'effectue à travers un orifice percé dans la calotte supérieure et leur sortie, au centre de l'électrode opposée (inférieure). Une tension en radiofréquence combinée ou non à une tension continue est appliquée entre l'électrode centrale et les deux électrodes calottes. Le champ résultant est alors tridimensionnel (Jonscher and Yates, III, 1997).

La préparation, l'analyse et la détection des ions sont réalisées dans un même espace, suivant des séquences temporelles successives. En augmentant de façon progressive la tension alternative, les ions sont déstabilisés de façon successive et expulsés de la trappe, ce qui permet l'enregistrement des spectres. Ces spectromètres sont très sensibles et ne tolèrent qu'un nombre d'ions limité dans l'enceinte. En effet, les répulsions mutuelles des ions induisent une augmentation du rayon de leur trajectoire, nuisant aux résultats. Afin de les garder confinés à proximité du centre, il est nécessaire d'introduire à l'intérieur du piège une pression de gaz neutre (généralement de l'hélium).

Le piège à ions linéaire quadripolaire peut être combiné avec différents analyseurs de masse : quadropôle (Annexe 2), temps de vol ... (Hopfgartner et al., 2004).

3.2.4. Le détecteur.

Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, doit être détecté et transformé en un signal électrique utilisable. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.

Cette détection fait appel à la charge, à la masse et à la vitesse des ions. Il existe différents types de détecteurs capables de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable.

La plaque photographique et le cylindre de Faraday permettaient une mesure directe des charges arrivant au détecteur, tandis que les détecteurs multiplicateurs d'électrons ou de photons permettent l'amplification de l'intensité du signal détecté. Les détecteurs à induction (Hilton et al., 1998) et les détecteurs cryogéniques (Christ et al., 2004; Frank et al., 1999) sont actuellement en cours de développement. Ils sont basés sur des principes physiques différents de ceux utilisés pour les détecteurs communément

utilisés et présentent une efficacité indépendante de la masse et de la vitesse des ions détectés.

Les récentes avancées des techniques de séparation, de spectrométrie de masse et de traitement informatique des données pour les sciences biologiques sont très utiles pour la recherche de biomarqueurs.

La spectrométrie de masse a donc nettement amélioré les capacités de détection, de quantification, et d'identification des biomarqueurs avec des analyses plus rapides et plus sensibles.

Tableau 3. Avantages et inconvénients des deux spectromètres de masse utilisés. Spectromètres de masse : MALDI TOF/TOF (Olthoff et al., 1988) et QTrap (Jonscher and Yates, III, 1997).

Technique d'analyse	Avantages	Inconvénients
MALDI TOF/TOF	Couplage « off-line » ; possibilité de ré-analyser l'échantillon spotté ; spottage manuel ou fractionnement HPLC ; analyse de masses élevées ; sensibilité importante.	Dépôt sur plaque métallique ; uniquement ions monochargés.
QTrap	Couplage « on-line » ; molécules polaires et thermolabiles ; ions multichargés ; souplesse d'utilisation ; grande vitesse de balayage.	Perte de l'échantillon après analyse ; si besoin de ré-analyser, nécessité de refaire le fractionnement HPLC.

Chapitre 1. Recherche de métabolites glucuronidés de l'acide mycophénolique fixés de manière covalente sur des protéines.

Alors que le génome humain contient 21 257 gènes codant pour des protéines (Ensembl, Assemblage GRCh37 Feb 2009, Database 59.37d), les prédictions avancent un nombre de 300 000 protéines, en tenant compte des épissages alternatifs et isoformes (Rai and Chan, 2004). A ce nombre, il faut rajouter la multitude de modifications post-traductionnelles que chacune d'entre elle peut subir et représentant des informations très précieuses devant permettre d'avancer dans la dissection des mécanismes cellulaires.

La complexité du glycome à cause de sa grande hétérogénéité de composés fait de la glycation non-enzymatique un des axes de recherche les moins fréquemment étudiés en protéomique. Pourtant, l'importance des protéines glyquées a largement été démontrée dans les processus physiologiques du vieillissement, ainsi que dans plusieurs pathologies : complications chroniques associées au diabète, insuffisance rénale ou artériosclérose par exemple.

Les modifications covalentes des protéines glyquées résultent en général d'interactions avec des acyl-glucuronides, par trans-acylation avec une perte de l'acide glucuronide, ou par glycation avec ouverture de la chaîne des différentes formes d'isomères (en gardant l'acide glucuronide) (Figures 6 et 7).

1. Le mécanisme de la réaction de glycation.

Le mécanisme de la réaction de glycation a été mis en évidence en premier par Maillard au début du XXe siècle en incubant des acides aminés avec différents sucres. Ainsi, il a pu décrire trois étapes essentielles (Figure 6) :

- La réaction entre un sucre réduit et un groupe amine d'une protéine conduit à la formation réversible d'un adduit appelé base de Schiff, par conversion d'un carbone aldéhydique (avec l'évacuation d'une molécule d'eau). Le composé Schiff base est une forme thermodynamiquement instable. Par conséquent, il est en équilibre avec les formes cycliques pyranose et furanose. Par des réarrangements successifs, le Schiff base devient un produit intermédiaire énaminoïde, puis un composé kétoamine relativement stable (ou composé d'Amadori).
- Le composé d'Amadori subit une série de réactions de déshydratation et de fragmentation, générant une variété de composés carbonyles, qui sont généralement plus réactifs que le carbohydrate original et agissent comme des catalyseurs en réagissant avec des groupes amino libres.

- La série de réarrangements aboutit à la formation d'une variété de formes ayant des structures hétérogènes irréversibles, communément dénommées produits terminaux de glycation avancée (« Advanced glycation end-products » AGEs), et caractérisés par une large diversité structurale et physicochimique (Priego and Sanchez, 2009).

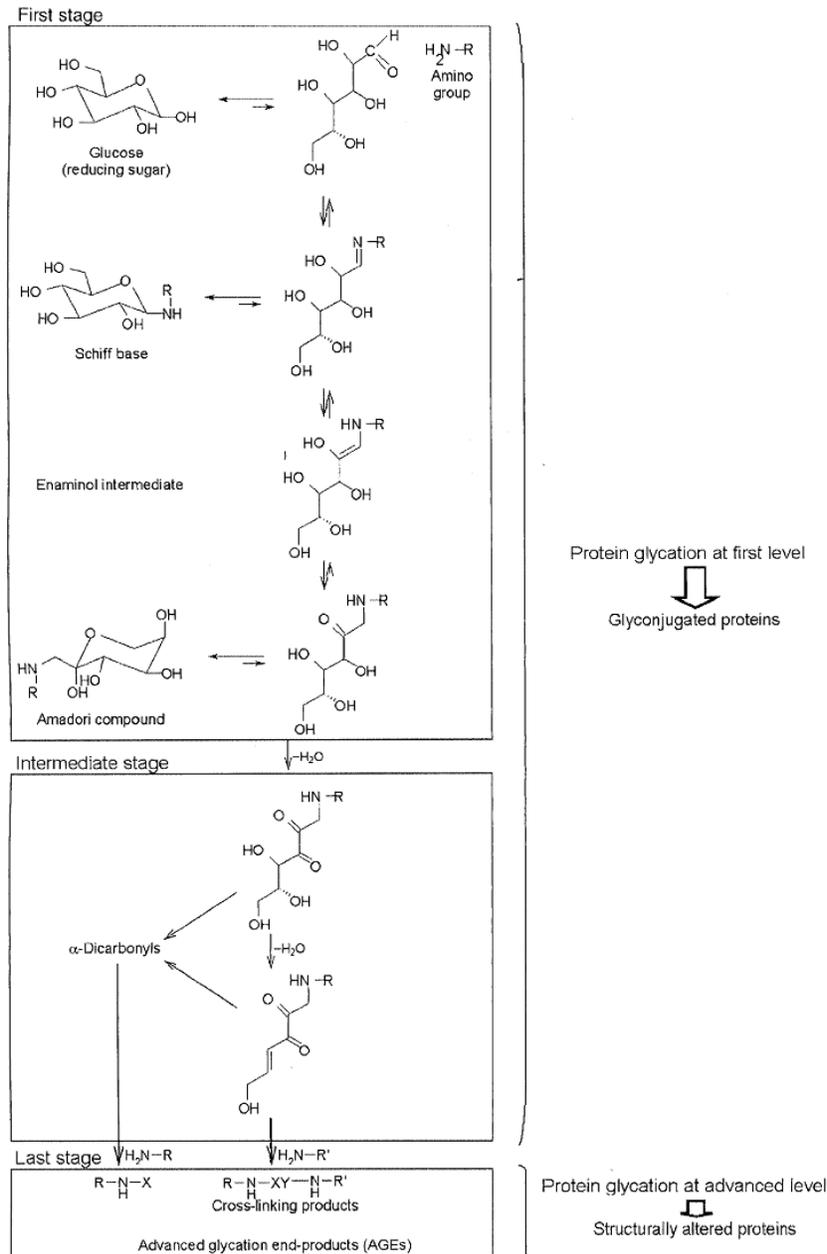


Figure 6. Mécanisme de la réaction de Maillard. R-NH₂, molécule aminée (protéine) ; X, structure chimique non connue formée par réaction d'un composé α -dicarbonyl avec une autre molécule aminée (d'une autre protéine) ou par un processus de crosslink (Priego and Sanchez, 2009).

Les AGEs sont à l'origine de nombreux dommages cellulaires, qui peuvent être regroupés en trois mécanismes : formation anormale de ponts croisés (crosslinks), interactions avec des récepteurs spécifiques et accumulation intracellulaire (Lapolla et al., 2005).

Une classification des protéines glyquées a été proposée en 2005 par Thornalley P. (Thornalley, 2005) : les résidus adduits glyqués (masse >12kDa), les peptides adduits glyqués (masse <12kDa), et les acides aminés glyqués (masse <500Da). Les peptides AGE ont la même activité toxique que les protéines AGE, et pour cette raison, une forte concentration de peptides AGE peut être considérée comme un marqueur de présence des protéines AGE modifiées (Priego and Sanchez, 2009).

Les protéines AGE peuvent être réparées par des mécanismes enzymatiques ou modifiées par reconnaissance avec des récepteurs spécifiques, internalisation et dégradation par les macrophages, le contenu des lysosomes ou les enzymes protéolytiques (Horiuchi et al., 1996; Priego and Sanchez, 2009).

2. Réactions de glycation sur des produits glucuronidés : revue de littérature.

Pour pouvoir former des adduits covalents avec des protéines, les produits glucuronidés doivent subir une succession de réarrangements : migration intramoléculaire de l'acyle et anomérisation des isomères (Figure 7).

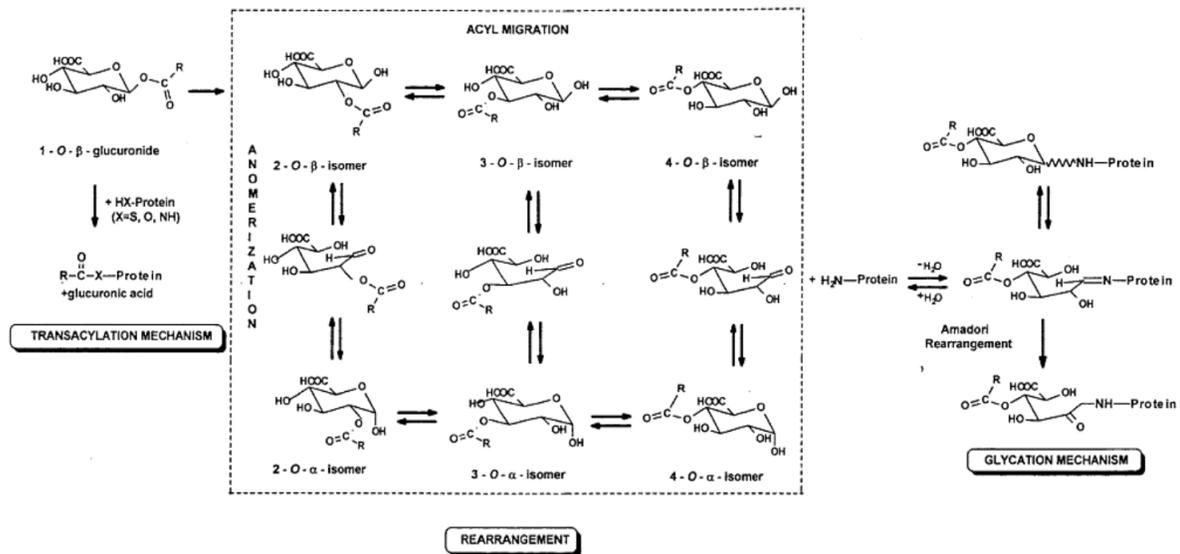


Figure 7. Mécanisme de réarrangement et de liaisons covalentes d'un acyl glucuronide à des protéines. R-COO, radical du médicament couplé à l'ion carboxylate (Wang et al., 2001).

Le but des études de glycation des xénobiotiques est d'essayer de prédire et de déterminer leurs possibles toxicités pour l'Homme. En effet, *in vivo*, certains adduits peuvent initier des réponses immunitaires ou toxiques. L'albumine est considérée comme une importante cible potentielle pour des liaisons covalentes, au contraire du fibrinogène et des gammaglobulines (Shipkova et al., 2003).

2.1. Mise en évidence des adduits covalents par immunoprécipitation et western-blots.

Amstrong *et al.* (Armstrong, 2004) ont mis en évidence des liaisons covalentes entre l'AcMPAG et l'enzyme IMPDH-2 par western-blot, en utilisant un anti-corps anti-MPA, après incubation de 4 à 24h. La formation d'adduits nécessite la présence d'inosine monophosphate (IMP), mais pas de NADH. Une co-incubation avec du MPA diminue significativement la formation d'adduits détectables par western-blot. La formation d'adduits est plus importante en présence de sodium cyanoborohydrure, ce qui confirme le mécanisme passant par la formation d'une imine entre une lysine de l'IMPDH-2 et un aldéhyde libre de la chaîne ouverte de l'acyl glucuronide. Par conséquent, l'AcMPAG se lie au complexe IMPDH-2/IMP par le site de liaison du NAD⁺.

En 2007, Asif *et al.* (Asif et al., 2007) ont identifié des protéines cibles de l'AcMPAG dans le rein de rats traités par le MMF (40 mg/kg/jour), après séparation sur gel 2-DE et western-blot (anticorps anti-MPA/AcMAPG). Aucune protéine n'a été détectée sur les extraits de rein de rat traité par un placebo. Les protéines ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse (Q-TOF) et ont pu être classées en 6 groupes en fonction de leur activité physiologique :

- les protéines intervenant dans le contrôle de l'état d'énergie et de l'oxydoréduction des cellules ;
- les protéines intervenant dans la détoxification des cellules ;
- les protéines intervenant dans la motilité et la stabilisation cellulaire ;
- les enzymes intervenant dans le métabolisme des carbohydrates, acides aminés et lipides ;
- les protéines formant des canaux ;
- les autres enzymes (n'ayant pas de propriétés communes).

L'identification protéique a été en partie confirmée par des expériences d'immunoprécipitation. Des différences en nombre et en intensité des spots marqués avec l'anticorps anti-MPA ont été observées entre des échantillons d'animaux divers.

Des expériences *in vivo* sur le rat, et *in vitro* en utilisant des enzymes recombinantes (Wang et al., 2001) ont été menées afin de démontrer par des immunoprécipitations et immunoblots que le zomépirac acyl glucuronide était capable de

former des liaisons covalentes, dans des conditions physiologiques, avec la peptidase dipeptidyl IV (ou CD26). Des anticorps monoclonaux anti-peptidase dipeptidyl IV et des antisérums polyclonaux du zomépirac ont été utilisés. Ces résultats ont été confirmés sur des souris déficientes en CD26. En effet, des adduits covalents entre le CD26 et le zomépirac acyl glucuronide ont été découverts chez les souris normales, mais pas chez les souris déficientes en CD26. A noter que le phénotype des souris avait été validé par plusieurs techniques : immunohistochimique, cytométrie en flux, RT-PCR... (Wang et al., 2002)

2.2. Mise en évidence des adduits covalents par fluorescence ou radiomarquage.

Le bénomaxapofène peut être détecté facilement grâce à ses propriétés fluorescentes, qui en font un bon modèle pour l'investigation de liaisons covalentes à des protéines. Qiu *et al.* (Qiu et al., 1998) ont établi par spectrométrie de masse la structure et les sites des adduits covalents formés entre le bénomaxapofène 1-O- β -glucuronide et l'albumine sérique humaine (HSA). Cette dernière a été co-incubée avec un excès de bénomaxapofène 1-O- β -glucuronide en présence de cyanoborohydrure de sodium, réduite, alkylée, dialysée contre du tampon d'ammonium bicarbonate, et trypsinisée. Le mélange tryptique a été séparé chromatographiquement selon un gradient eau/acétonitrile. Les peptides ont été suivis par fluorescence ($\lambda_{excitation} = 313\text{nm}$, $\lambda_{émission} = 365\text{nm}$). Les fractions montrant un pic d'absorbance à 365nm ont été collectées et analysées par spectrométrie de masse MALDI. La lysine 159 a été identifiée comme le site majeur de liaison du bénomaxapofène acyl glucuronide sur l'albumine.

Les microsomes hépatiques de différentes espèces (mouton, rat, chien, humain) peuvent être aussi utilisés afin d'étudier la formation de liaisons covalentes entre les protéines microsomales et les médicaments à analyser. Selon les cas, le médicament glucuronidé (Smith et al., 1990a), le co-facteur des UGTs (Kretz-Rommel and Boelsterli, 1994), l'uridine diphosphate acide glucuronique (UDPGA), étaient radiomarqués au carbone 14. La liaison des produits radiomarqués aux protéines microsomales était mesurée après élimination du produit non lié par un excédent de solvant. La formation de liaisons covalentes entre des dérivés de médicaments radiomarqués et les protéines hépatiques de trois espèces différentes était à la fois dépendante du temps d'incubation (5-35min) et de la concentration initiale de substrat (Kenny et al., 2005).

Kenny *et al.* (Kenny et al., 2005) ont montré que le métabolisme du SB-209247 marqué au carbone 14, ainsi que ses liaisons covalentes aux protéines hépatiques pouvaient aussi être étudiés sur des coupes de foie « maintenu en survie » provenant d'espèces différentes : chien, rat, humain.

2.3. Mise en évidence des adduits covalents par HPLC-UV.

L'HPLC-UV a été utilisée par plusieurs équipes afin d'étudier la stabilité de produits glucuronidés (Smith and Liu, 1993) ainsi que leur possible liaison irréversible à l'albumine.

La quantité de liaisons covalentes entre les suprofène glucuronides et l'albumine augmentait avec la basification du milieu, corrélée à une amplification du taux de dégradation des conjugués isomériques des suprofène glucuronides. Cette dernière était dépendante du pH. La liaison covalente des conjugués isomériques du suprofène glucuronide à l'albumine était temps dépendant, avec 38% d'augmentation de liaison du Suprofène acyl glucuronide avec l'HSA après 24h d'incubation. Aucune liaison covalente n'était détectée quand le suprofène était incubé avec l'albumine. Les mêmes auteurs (Smith and Liu, 1995) ont confirmé les résultats précédemment obtenus sur un modèle de rat ayant leur canal biliaire ligaturé, car l'excrétion du suprofène glucuronide est urinaire et l'élimination du suprofène est majoritairement biliaire. Les liaisons covalentes étaient présentes en plus grandes quantités lorsque le canal biliaire du rat était ligaturé (puisque le suprofène s'accumule quand il n'est plus excrété).

Ding *et al.* (Ding et al., 1993) ont été parmi les premiers à décrire l'utilisation de la spectrométrie de masse (MALDI) pour confirmer les résultats obtenus en HPLC-UV, et pour localiser des sites de liaisons et élucider le mécanisme de liaison *in vitro* qui intervenait dans la formation d'adduits covalents entre la tolmetine glucuronide et l'HSA. Cette dernière et un excès de tolmetine glucuronide étaient co-incubés en présence de cyanoborohydrure de sodium afin de piéger les imines intermédiaires. Le produit de la réaction était réduit, carboxyméthylé et digéré par la trypsine. Il a été trouvé 6 peptides contenant la tolmetine glucuronide, liée par des lysines de la protéine (suite à la formation de base de Schiff principalement, ou d'un déplacement nucléophile de l'acide glucuronide) (Ding et al., 1993). Ces résultats indiquent que la tolmetine glucuronide est capable de se lier à différents sites de la molécule d'HSA. Notons que la tolmetine seule ne permet pas de former des adduits avec l'HSA dans les conditions testées. De plus, le rapport tolmetine glucuronide (TG)/HSA doit être élevé afin d'avoir un nombre d'adduits formés suffisant pour être détecté (un ratio molaire TG:HSA de 3 donne un pourcentage de liaison molaire de 600 équivalents de tolmetine liée par molécule d'HSA) (Ding et al., 1995).

La détection UV suite à une HPLC peut servir de support pour déterminer des caractéristiques enzymatiques de produits glucuronidés. En effet, une équipe japonaise (Iwaki et al., 1999) a caractérisé les liaisons covalentes rapides entre l'HSA et deux (β -1-O-acyl-glucuronide et 2-O-acyl-glucuronide) des quatre isomères du naproxène glucuronide, par incubation à 37°C pendant 1h à pH 7,4. La constante apparente du taux de formation pour la liaison irréversible du 2-O-acyl glucuronide avec l'HSA ($k_f = 0,684 \pm 0,086 \text{ h}^{-1}$) était considérablement plus petite que pour le β -1-O-acyl-glucuronide ($k_f =$

3,55 ± 0,39 h⁻¹), ce qui indique que la formation d'adduits protéiques intervient à concentration plus faible pour le 2-O-acyl-glucuronide que pour le β-1-O-acyl-glucuronide. La demi-vie du naproxène acyl-glucuronide était de 210 min, mais lorsque ce métabolite était incubé en présence d'HSA (0,45mM), elle était diminuée d'un facteur 4, probablement suite à une redistribution du produit ou à une dégradation plus rapide. Par ailleurs, le maximum de formation d'adduits covalents entre le naproxène acyl-glucuronide et l'HSA était de 1 mmol naproxène/ mol protéine. Cette capacité de fixation était environ proportionnelle à la concentration de naproxène glucuronide initiale (Olsen et al., 2002).

3. Recherche de fixations covalentes de l'AcMPAG sur des protéines.

3.1. Introduction.

L'acide mycophénolique (MPA) est le métabolite actif de l'immunosuppresseur mycophénolate mofétil, qui est largement utilisé dans différents protocoles thérapeutiques prescrits chez les patients ayant reçu une transplantation d'organe. Même si le MPA est assez bien toléré, il entraîne des effets secondaires comme des infections, des leucopénies et des perturbations gastro-intestinales (nausées, vomissements, diarrhées, gastrites et ulcères). La voie de biotransformation principale du MPA conduit à la formation d'un composé pharmacologiquement inactif, le phényl-7-O-MPA-β-glucuronide (MPAG) et d'un composé présumé actif, l'acyl-glucuronide du MPA (AcMPAG).

Asif *et al.* en 2007 (Asif et al., 2007) ont identifié après séparation sur gel 2-DE et western-blot (anticorps anti-MPA) des protéines capables de former des adduits avec l'AcMPAG dans le rein de rat traité au MMF (40 mg/kg/jour).

Sur la base de ces travaux et d'autres travaux antérieurs faisant appel à la spectrométrie de masse (Ding et al., 1993), l'objectif de notre étude était de rechercher, par spectrométrie de masse si l'AcMPAG contracte des liaisons covalentes avec la BSA, l'HSA, l'IMPDH et dans un second temps avec les UGTs.

3.2. Matériel et méthodes.

3.2.1. Digestion trypsique de protéines natives : BSA, HSA et IMPDH.

Un mg de protéines (ou 4% (v/v) pour l'IMPDH) est dilué dans 250 pmoles de tampon ammonium bicarbonate, puis traité avec 1% (wt/wt) de trypsine (pour avoir un volume final de 50 μL) pendant une nuit, à 37°C, dans l'obscurité.

3.2.2. Formation d'adduits et digestion trypsique protéique.

La formation d'adduits s'effectue en 3 grandes étapes (Figure 8) :

- 0,45 μ moles d'HSA et 1,5 μ moles de produit (eau, MPA, MPAG ou AcMPAG) sont incubés en présence d'excès (20 μ moles) de sodium cyanoborohydrure (NaCNBH_3), pour piéger la formation de l'imine. Après 6 h à 37°C, la réaction est stoppée par une dialyse à travers une membrane de 30 kDa contre du tampon ammonium bicarbonate 50 mM.
- 20 nmoles du mélange protéique obtenu précédemment sont dénaturées dans 100 μ L de guanidine hydrochloride 6 M/Tris 100 mM/EDTA 1mM, réduits avec 6 μ moles de dithiothreitol (DTT) pendant 1 h à 60°C, alkylés avec 10 μ moles d'iodoacétamide (IAM) pendant 30 min à température ambiante, et enfin sont dialysés contre du tampon ammonium bicarbonate 50 mM.
- Les protéines dialysées sont traitées avec 1% (wt/wt) de trypsine pendant un minimum de 5 h à 37°C.

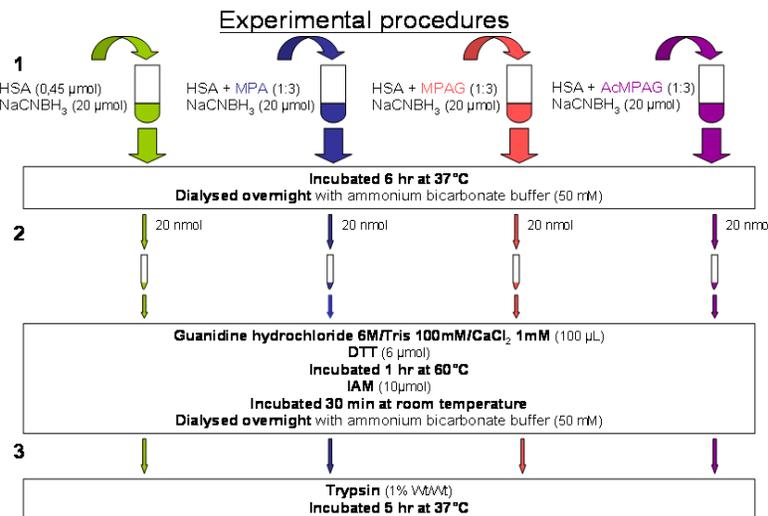


Figure 8. Schéma de la procédure expérimentale de la formation d'adduits et de la digestion trypsique protéique.

3.2.3. Formation d'adduits de l'AcMPAG sur l'UGT2B7.

La procédure d'incubation des supersomes s'opère en 3 étapes :

- 25 μ g de chaque préparation supersomale (Contrôle, UGT2B7, UGT1A3 ou UGT1A4) sont incubés pendant 30 min sur un lit de glace en présence de 5 μ g de triton X100 ;
- selon les conditions, l'eau (contrôle) ou 80 ng de substrat (MPA) est (sont) rajoutée(s), et une pré-incubation à 37°C est effectuée pendant 5 min ;
- 162,5 μ g de co-substrat (UDPGA) sont alors additionnés pour démarrer la réaction. L'incubation de 30 min ou d'1h est achevée par 10 μ L de FA à 24%.

3.2.4. Séparation chromatographique HPLC et détection UV.

Les produits purs ou les fragments tryptiques sont séparés par chromatographie en phase inverse grâce à une colonne C18 Hypersil ODS de 5 µm (250 × 4,6 mm) positionnée dans le compartiment thermique A550 d'un système HPLC 20 composé de pompes GS50 et d'un détecteur 4 canaux ED50 (Dionex, Sunnyvale, USA).

L'élution est effectuée selon un gradient linéaire de 99% de tampon A (0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) dans l'eau) à 50% de tampon B (0,1% de TFA dans de l'acétonitrile (ACN)) pendant 90 min, à un débit de 1 mL/min.

L'élution des composés est contrôlée aux 4 longueurs d'onde UV suivantes : 215 nm (pour les peptides), 250 nm, 305 nm et 310 nm.

La collection des pics a pu être réalisée manuellement ou automatiquement avec l'appareil Foxy Jr fraction collector (Teledyne isco, Lincoln, USA), positionné en ligne avec le détecteur UV.

3.2.5. Electrophorèse sur gel en conditions dénaturantes : dodécylsulfate de sodium.

Les échantillons sont dilués au ½ dans du tampon Laemmli 2X, et portés à 95°C pendant 5 min.

Les échantillons et le marqueur de taille (dilué au 1/20^e dans du tampon Laemmli 2X) migrent à voltage constant de 150 V pendant 1 h 30 min dans un maillage de gel acrylamide 12%.

Le gel est coloré une nuit dans du tampon de coloration (10% acide acétique, 40% méthanol) contenant du bleu de Coomassie (R250 à 0,1 g/100 mL), puis décoloré par plusieurs bains successifs de tampon de décoloration (10% acide acétique, 40% méthanol), afin de faire apparaître les bandes protéiques.

3.2.6. Dosage protéique de Bradford.

La méthode de dosage protéique utilisée a été décrite par M. Bradford en 1976 (Bradford, 1976) en prenant une gamme d'albumine comme standard de concentration de 0 à 1 mg/ml.

3.2.7. Détection par spectrométrie de masse.

3.2.7.1. Détection par spectrométrie de masse à temps de vol : MALDI TOF/TOF 4800.

Les différentes fractions liquides choisies lors de la séparation HPLC-UV sont séchées au Speed-Vac pendant une journée.

La purification et la concentration des échantillons sont réalisées en suivant le protocole ZipTip_{C18}, recommandé par Promega®.

Les échantillons sont dilués au ½ dans la matrice α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α CHCA) avant d'être déposés sur une plaque MALDI 384 spots prégravés (2 μ L/spot).

Lorsque les spots sont secs, la plaque est insérée dans le MALDI TOF/TOF 4800, et chaque échantillon est analysé selon les paramètres recommandés.

Afin d'identifier le (ou les) peptide(s) d'HSA et la position d'éventuelles liaisons covalentes avec l'AcMAPG, une analyse grâce au logiciel GPS explorerTM v3.6 (Applied Biosystems) a été réalisée (incrément de masse recherchée : 496 m/z (AcMPAG) et 624 m/z (AcMPAG liée à une lysine)).

3.2.7.2. Détection par spectrométrie de masse de type quadripolaire : QTrap 4000.

Pour l'infusion de produits purs, chacun est inséré dans une aiguille, et l'analyse est effectuée sur le QTrap 4000, en mode nano-spray, selon les paramètres recommandés.

Pour l'analyse des adduits covalents, les produits purs ou les fragments tryptiques sont séparés par nano-chromatographie en phase inverse grâce à un Ultimate 3000 de Dionex sur une colonne C18 de 3 μ m, 10 Å (75 μ m \times 15 cm I.D.). L'élution est effectuée selon un gradient linéaire de 80% de tampon A (0,1% de TFA dans l'eau) à 55% de tampon B (0,1% de TFA dans de l'ACN) pendant 90 min, à un débit de 300 nL/min. Les fractions éluées sont analysées par le QTrap 4000, en mode « Precursor Ion Scan », focalisé à 319 m/z (correspondant au composé MPA) en mode négatif (car la détection des fragments du MPA n'est possible qu'en mode négatif), suivi d'EPI en mode positif de 50 à 2000 m/z, selon les paramètres recommandés du constructeur.

Pour l'identification des protéines microsomales et supersomales, les fragments tryptiques sont séparés par nano-chromatographie en phase inverse grâce à une chaîne HPLC Ultimate 3000 de Dionex sur une colonne C18 de 3 μ m, 10 Å (75 μ m \times 15 cm). L'élution a été effectuée selon un gradient linéaire de 80% de tampon A (0,1% de TFA dans les mêmes conditions. Les fractions éluées sont analysées par le QTrap 4000, comme suit : enhanced mass spectrometry (EMS) de 400 à 1600 m/z en 0.3 secondes, enhanced resolution (ER) sur les 3 pics majoritaires détectés en EMS, et enhanced product ion (EPI) de 50 à 2000 m/z, en mode positif, selon les paramètres recommandés par le constructeur.

3.3. Résultats.

3.3.1. Détection HPLC-UV : longueurs d'onde de travail pour les peptides totaux et dérivatisés par l'AcMPAG.

Un spectre d'absorption de longueur d'onde variable a été réalisé sur le MPA pur, afin de déterminer les longueurs d'ondes auxquelles seulement les peptides potentiellement dérivatisés par l'AcMPAG absorbent. Deux longueurs d'onde ont été choisies : 305 et 310 nm. Par mesure de simplicité de représentation graphique, seuls les résultats obtenus à 310 nm sont présentés, s'ils ne diffèrent pas de ceux obtenus à 305 nm. Tous les peptides sont suivis à 215 nm.

3.3.2. Digestion trypsique de protéines natives : BSA, HSA et IMPDH, analysé par HPLC-UV.

Les profils de digestion trypsique de la BSA et d'HSA (Figure 9A et 9B) sont observés à 215 nm avec une intensité maximale de 500 mAU, indiquant que la colonne C18 Hypersil ODS offre une bonne séparation peptidique. Ces 2 profils tryptiques sont très proches l'un de l'autre, mais diffèrent tant dans l'intensité des pics, qu'en quantité. Ce résultat était attendu de l'origine différente, bovine et humaine, des deux protéines.

Nous n'observons aucun pic caractéristique d'une digestion trypsique pour l'IMPDH (Figure 9C), ce qui pourrait s'expliquer par une trop faible quantité de protéines natives traitées. En effet, la concentration réelle de l'IMPDH étant inconnue (75 mU/mL), nous avons utilisé la quantité maximale habituellement utilisée lors d'études d'activité enzymatique, c'est-à-dire 4% de la solution mère.

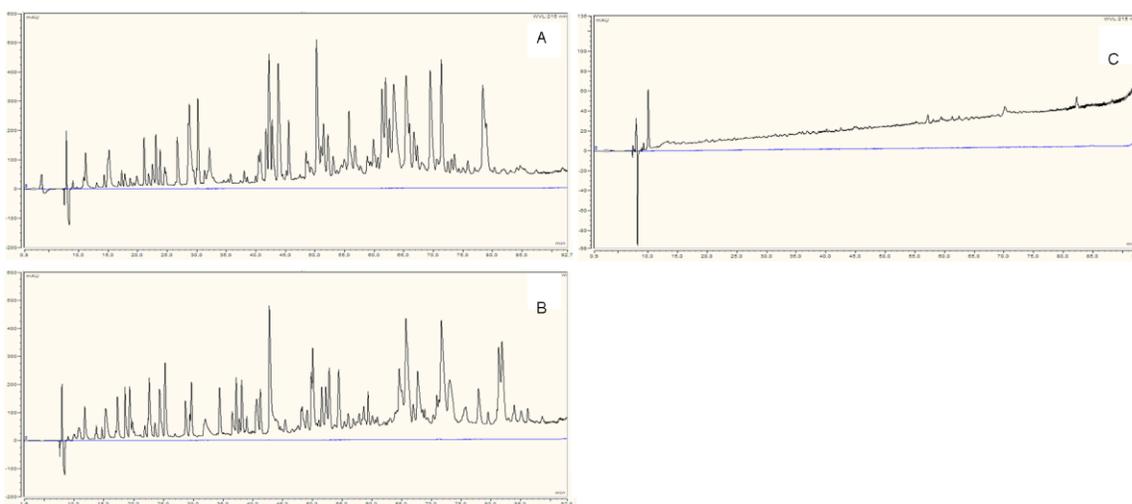


Figure 9. Détection de peptides tryptiques des protéines natives BSA, HSA et IMPDH, analysé par HPLC-UV. Détection à 215 nm (noir) et à 310 nm (bleu) de 500 µg de BSA (A), d'HSA (B) ou de 2% d'IMPDH (C) trypsinisées.

De plus, différents débits ont été testés allant jusqu'à 1 mL/min afin d'évaluer la capacité de la colonne à supporter les pressions exercées. Le débit maximal de 1 mL/min sera utilisé par la suite, concordant avec le débit utilisé par Ding et al. lors de l'étude sur la tolmétine (Ding et al., 1993).

3.3.3. Effet du sodium cyanoborohydrure sur la digestion trypsique de la BSA, analysé par HPLC-UV.

Les profils de digestion trypsique de la BSA en présence ou en absence de NaCNBH₃ sont superposables (Figure 10). En revanche, l'intensité des pics obtenus en présence de NaCNBH₃ sont 2 fois moins intenses que ceux du contrôle. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le NaCNBH₃ inhibe en partie l'action de la trypsine. L'utilisation de ce produit pour la stabilité des liaisons imines a donc été poursuivie dans la suite de ce travail, puisqu'il ne modifie pas les proportions des peptides dans le mélange.

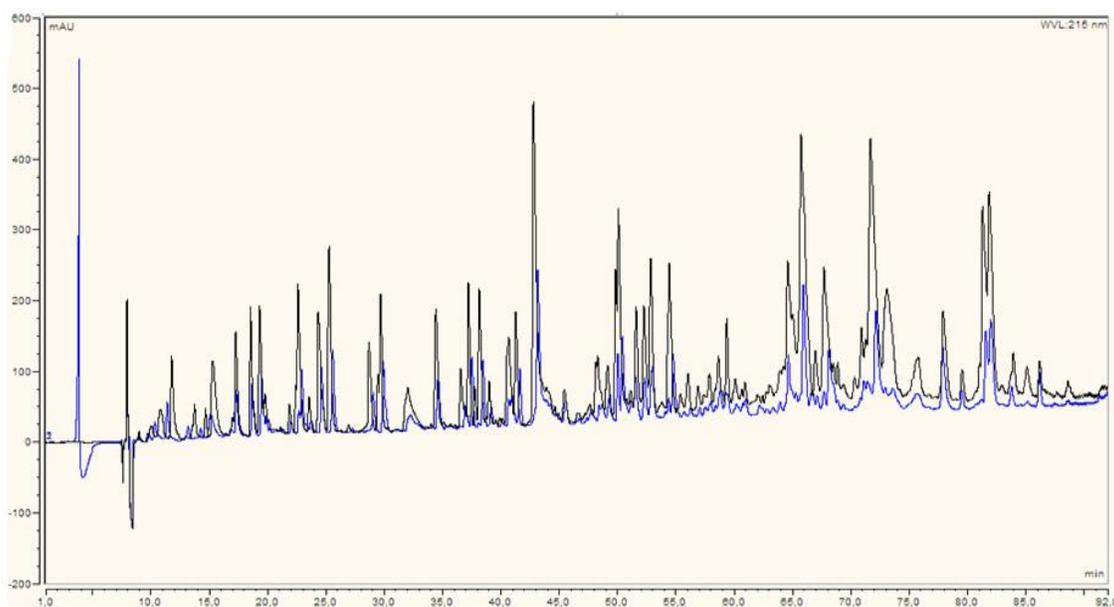


Figure 10. Effet du sodium cyanoborohydrure sur la digestion trypsique de la BSA, analysé par HPLC-UV. Détection à 215 nm de 500 µg de BSA native traitée en présence (bleu) ou en absence (noir) de NaCNBH₃.

3.3.4. Temps de rétention des produits utilisés : MPA, MPAG et AcMPAG, analysé par HPLC-UV.

Le MPA a un temps de rétention de 75 min (Figure 11A), et absorbe légèrement à 310 nm, ce qui nous servira de témoin.

Le MPAG a un temps de rétention de 53.5 min (Figure 11B), et n'absorbe pas du tout à 310 nm.

L'AcMPAG a un temps de rétention de 63.5 min (Figure 11C) et absorbe en partie à 310 nm, ce qui est gênant puisque les peptides potentiellement dérivatisés par l'AcMPAG ne seront visibles qu'à cette longueur d'onde. Néanmoins, pour tout autre temps de rétention que celui de l'AcMPAG, il sera facile de différencier du bruit de fond les peptides dérivatisés par l'AcMPAG.

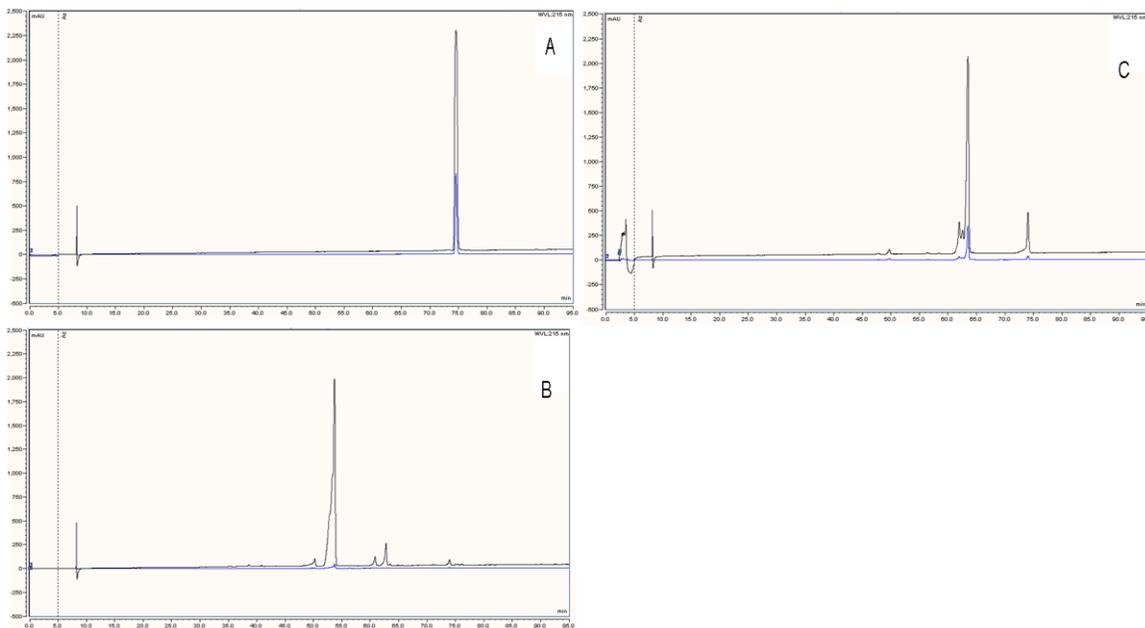


Figure 11. Temps de rétention du MPA, du MPAG et de l'AcMPAG purs, analysés par HPLC-UV. Détection à 215 (noir) et 310 nm (bleu) de 78 nmol de MPA (A), de 50 nmol de MPAG (B) et de 50 nmol d'AcMPAG (C) purs.

3.3.5. Seuil de détection du MPA en HPLC-UV.

Le système de détection que nous utilisons est assez sensible pour détecter jusqu'à 1.22 nmol de MPA (Figure 12) ; ce qui est largement suffisant et acceptable pour la suite des expériences.

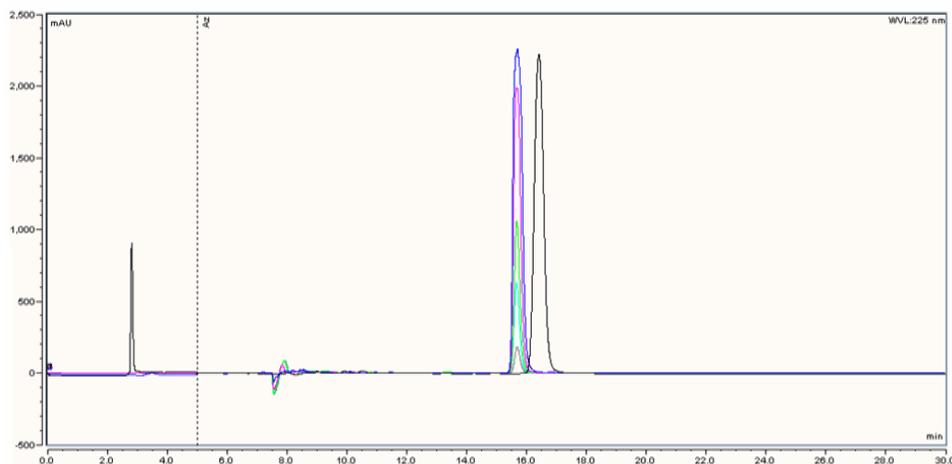


Figure 12. Seuil de sensibilité de détection du MPA, analysé par HPLC-UV. Détection à 215 nm de 78 nmol (noir), de 39 nmol (bleu foncé), de 19.5 nmol (rose), de 9.75 nmol (vert clair), de 4.88 nmol (bleu clair) et de 1.22 nmol (gris) de MPA pur.

3.3.6. Perte protéique lors de la dialyse pendant l'étape de formation des adduits covalents.

Des aliquots ont été prélevés avant et après dialyse sur l'échantillon d'HSA seule, traité pour la formation d'adduits covalents après les 6 h d'incubation à 37°C. La quantité protéique est évaluée sur un gel d'acrylamide 12%, par coloration au bleu de coomassie (Figure 13).

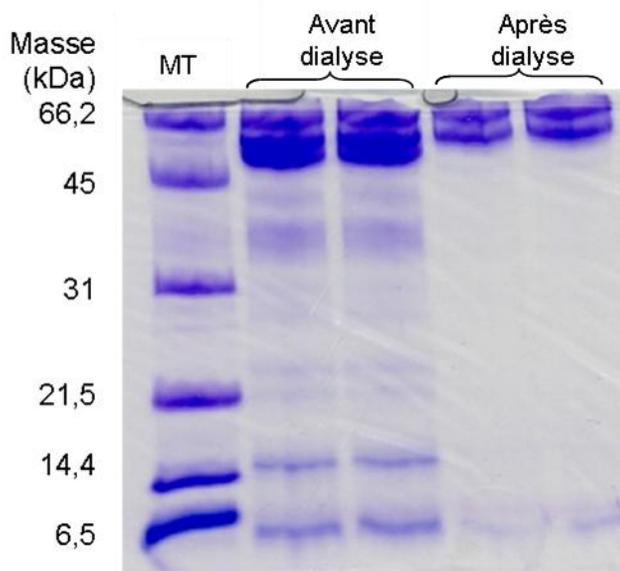


Figure 13. Visualisation de la perte protéique due à la dialyse sur gel SDS-PAGE 12%. Dépôt du marqueur de taille (MT) (colonne 1), de 10 µg d'HSA seule, avant dialyse (colonnes 2 et 3), et de 10 µg d'HSA seule, après dialyse (colonnes 4 et 5).

Tableau 4. Détermination de la perte protéique par dosage de Bradford.

	Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Avant dialyse	9.23
Après dialyse	3.16

Une perte protéique est constatée lors de la dialyse suivant l'incubation de 6h à 37°C (correspondant à la première étape de formation d'adduits covalents). Parallèlement au gel d'acrylamide, la perte protéique pendant l'étape de dialyse (positionnée à la fin de la première étape de la formation d'adduits covalents), quantifiée par dosage de Bradford, était de 2/3 des protéines initialement traitées (Tableau 4). En conséquence, nous avons décidé, dans un premier temps d'augmenter le volume d'injection, ainsi que de tester l'utilisation d'un nouveau système de dialyse : Float-A-Lyser (Bioblock, seuil à 3.5 kDa), pour éviter la trop grande perte protéique.

3.3.7. Capacité de la colonne à supporter 0.6 M de guanidine, analysé par HPLC-UV.

Ces changements n'ont pas été suffisants pour régler la perte protéique finale puisqu'une seconde dialyse était prévue à la fin de la deuxième étape de formation des adduits. Par conséquent, elle a été remplacée par une dilution au 1/10^e avec du tampon d'ammonium bicarbonate 50 mM. Cette modification a demandé de vérifier que la colonne puisse supporter l'injection d'une solution à 0.6 M de guanidine.

La solution de guanidine hydrochloride 6 M/Tris 100 mM/CaCl₂ 1 mM a été incubée 1 h à 60°C, puis 30 min à température ambiante avant d'être diluée au 1/10^e avec le tampon d'ammonium bicarbonate 50 mM.

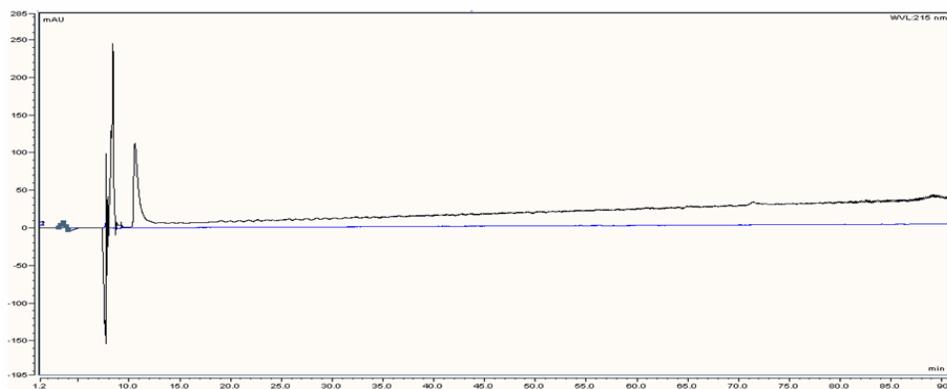


Figure 14. Capacité de la colonne chromatographique à supporter l'injection d'une solution à 0.6 M de guanidine. Détection à 215 nm (noir) et à 310 nm (bleu) de 250 μL d'un mélange contenant 0.6 M de guanidine.

La figure 14 montre que la colonne utilisée pour la séparation des peptides peut effectivement supporter l'injection d'une solution à 0.6 M de guanidine. De plus, aucun pic n'est observé à 310 nm, ce qui est intéressant dans notre cas.

Pour vérifier que le traitement infligé aux protéines, c'est-à-dire le traitement au DTT et à l'IAM n'interfère pas lors de l'analyse, la solution de guanidine hydrochloride 6 M/Tris 100 mM/CaCl₂ 1 mM a été traitée à l'identique du protocole de la formation d'adduits covalents, puis diluée au 1/10^e avec le tampon d'ammonium bicarbonate 50 mM.

Les artefacts des produits utilisés lors de l'expérience (pendant l'étape n°2 de la formation d'adduits) ne sont visibles qu'à 215 nm (Figure 15). La dilution au 1/10^e a donc été conservée ultérieurement car elle permet de quantifier de manière fiable les protéines injectées dans la chaîne d'analyse.

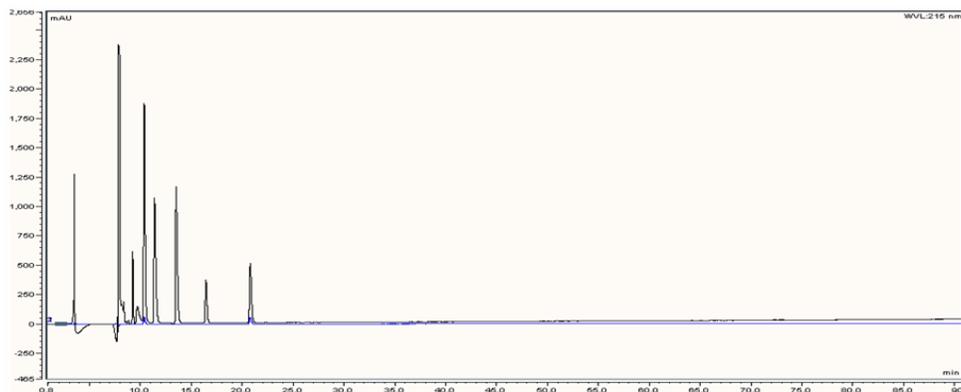


Figure 15. Artefacts des différentes solutions utilisées lors de l'étape n°2 de la préparation d'échantillons. Séparation HPLC et détection à 215 nm (noir) et à 310 nm (bleu) de 250µL d'un mélange contenant tous les produits utilisés lors de l'étape n°2 de la formation d'adduits covalents.

3.3.8. Détection d'adduits covalents sur l'HSA.

La formation d'adduits et la digestion trypsique ont été effectuées pour chaque condition : HSA seule, HSA + MPA, HSA + MPAG, et HSA + AcMPAG. De plus, le système de dialyse Float-A-Lyser a été remplacé par des colonnes MicroBio-Gel-P6 (BioRad, seuil à 6 kDa) car ces dernières permettent de récupérer la totalité de l'échantillon.

Les profils de digestion trypsique sont très similaires à 215 nm pour les 4 conditions (Figure 16) ; c'est-à-dire une première partie du chromatogramme avec des pics ayant des intensités fortes et la deuxième partie dont les intensités ne dépassent pas les 100 mAU. A 310 nm (Figure 17), un pic de MPA est visible (tr = 78 min) dans les conditions HSA + MPA et HSA + AcMPAG. D'autres pics sont visibles : un ensemble

de 5 pics (65 min <tr> 69 min), ainsi qu'un pic 10 min plus tard, mais dont l'intensité est très faible.

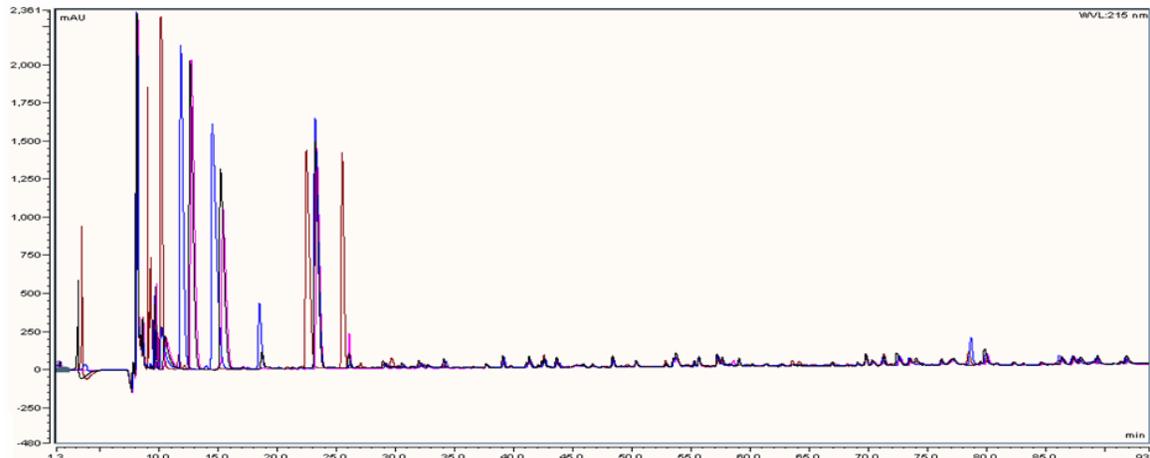


Figure 16. Détection d'adduits covalents sur l'HSA, analysé par HPLC-UV. Détection à 215 nm de 20 nmol d'HSA seule (noir), d'HSA + MPA (bleu), d'HSA + MPAG (rose), et d'HSA + AcMPAG (marron).

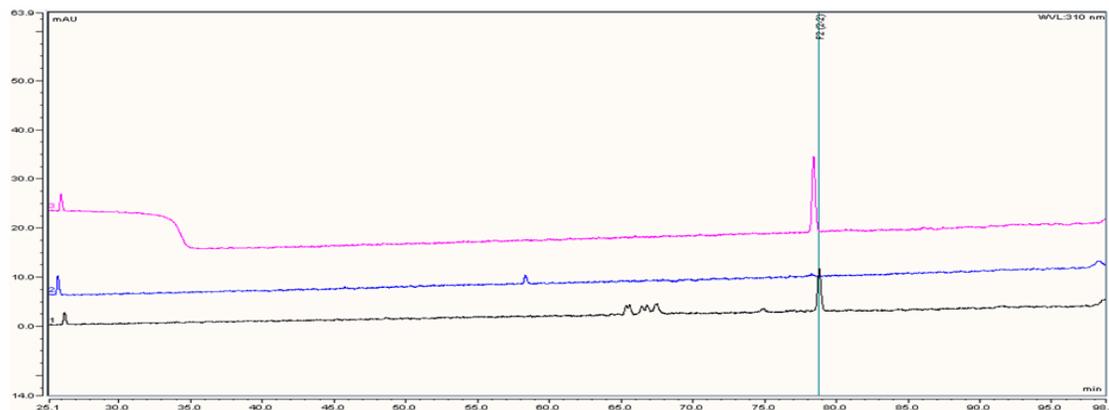


Figure 17. Détection d'adduits covalents sur l'HSA. Détection à 310 nm de 20 nmol d'HSA + MPA (rose), d'HSA + MPAG (bleu), et d'HSA + AcMPAG (noir).

Pour savoir si ces pics sont spécifiques d'une dérivatisation d'HSA par l'AcMPAG, les fractions de ces pics ont été collectées (Figure 18) et analysées par la suite par spectrométrie de masse de type MALDI TOF/TOF 4800.

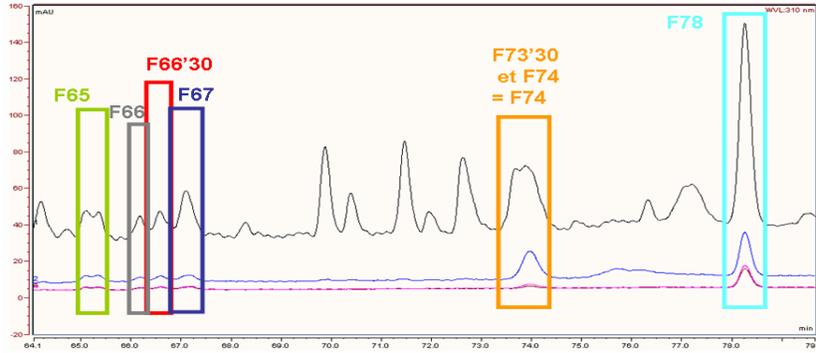


Figure 18. Collection et numérotation des fractions intéressantes de la condition HSA + AcMPAG. Détection à 215 nm (noir), à 250 nm (bleu), à 305 nm (rose), et à 310 nm (marron) de 20 nmol d'HSA + AcMPAG.

3.3.9. Confirmation par spectrométrie de masse à temps de vol, d'adduits covalents potentiels sur l' HSA.

3.3.9.1. Analyse MALDI TOF/TOF 4800 des produits purs : MPA, MPAG et AcMPAG.

Les différents produits ont été dilués au 1/2 avec la matrice α CHCA avant d'être spotted manuellement à une concentration finale de 1 μ g/spot sur une plaque MALDI 384 spots gravés.

Les structures du MMF, du MPA, du MPAG et de l'AcMPAG son représentées en figure 19, ainsi que leur fragmentation.

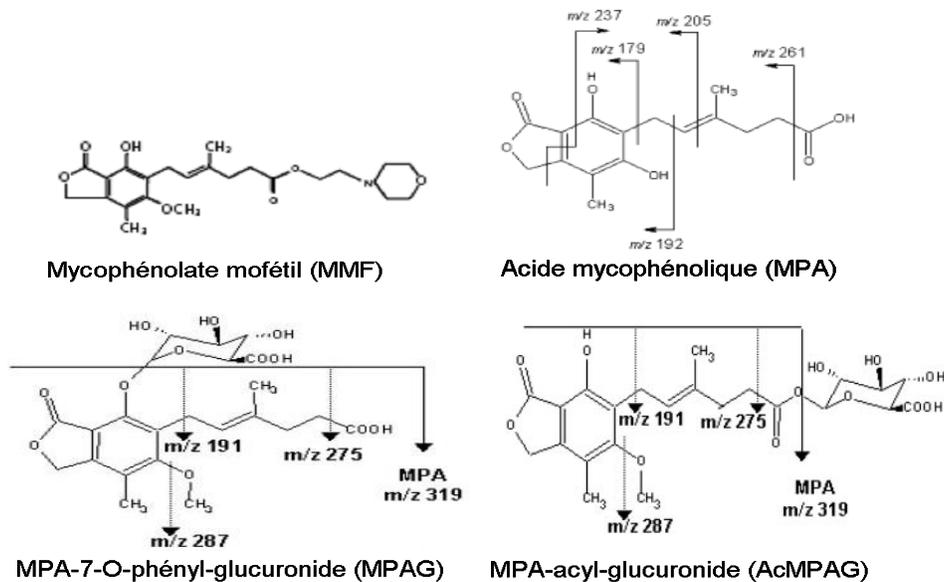


Figure 19. Structure chimique et fragmentation du MMF, du MPA, du MPAG et de l'AcMPAG.

Aucun pic représentatif de la masse de chacune des différentes substances n'est observé en mode positif (Figure 20) ou négatif (données non montrées). Nous attendions un m/z à 319 pour le MPA, et à 495 pour le MPAG et l'AcMAPG. Ces 3 produits ne sont pas ionisables ou pas détectables aux concentrations utilisées, en mode positif et en mode négatif, par la technique MALDI.

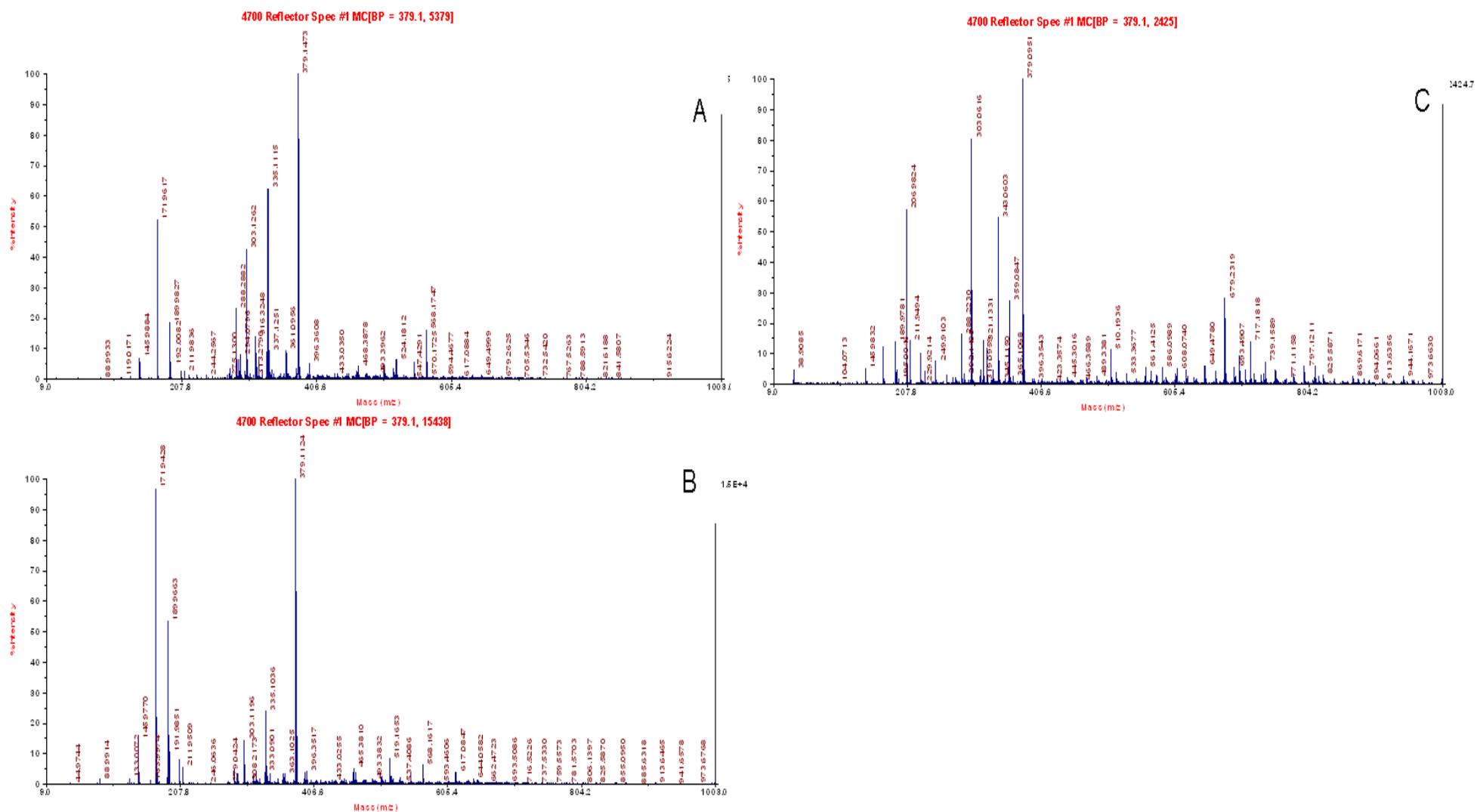


Figure 20. Analyse MS à temps de vol des produits purs. Spectres obtenus pour 1 µg/spot de MPA (A), de MPAG (B) et d'AcMPAG (C), en mode positif.

3.3.9.2. Analyse MALDI TOF et TOF/TOF des fractions collectées lors de l'HPLC de la condition HSA + AcMPAG.

Les 6 fractions collectées et notées à la figure 18 ont été traitées suivant le protocole décrit dans « matériel et méthodes ».

Pour chacune des 6 fractions, l'analyse MS montre de nombreux pics, avec des intensités variables (Figure 21).

Pour chaque spectre MS précédemment obtenu à la figure 17, le pic le plus intense a été repéré afin qu'il serve de précurseur pour l'analyse MS/MS (Tableau 5).

Tableau 5. Tableau récapitulatif des m/z des analytes précurseurs choisis pour l'analyse MS/MS pour chaque fraction collectée.

Nom de la fraction	Précurseur (m/z)
F65	1406.25
F66	2585.12
F66'30	2584.19
F67	2584.15
F74	1553.35
F78	1624.40

Les précurseurs des fractions F66'30 et F67 étant très proches, il n'est pas surprenant d'observer des spectres MS/MS identiques. De plu, la fraction F66, ayant une différence de m/z d'une unité sur le précurseur, le spectre MS/MS est semblable aux deux précédents ; indiquant sûrement une modification liée au traitement infligé (déamidation). C'est pourquoi, il ne sera présenté en figure 22 que les 4 spectres MS/MS les plus représentatifs des six fractions récoltées.

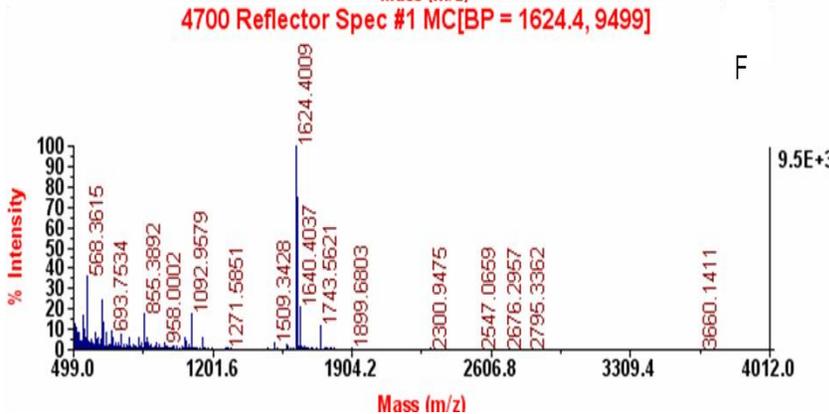
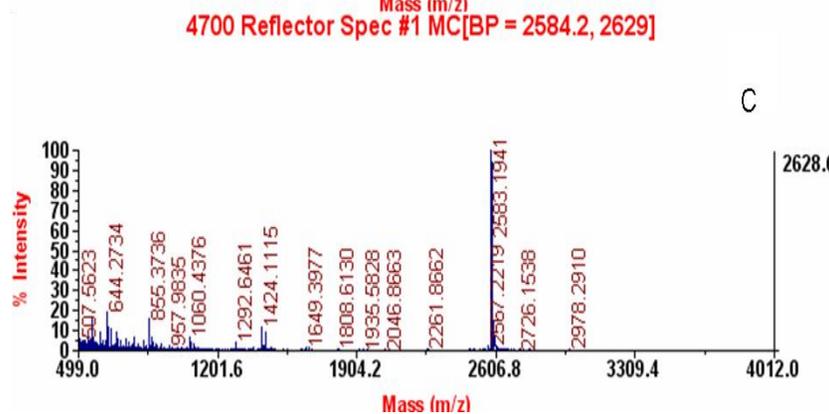
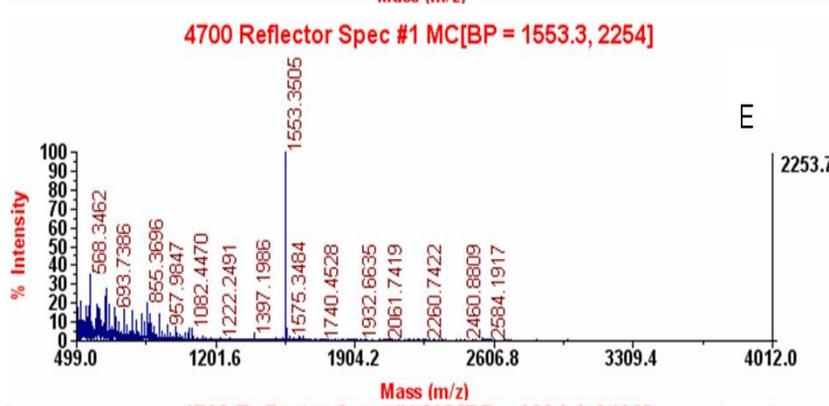
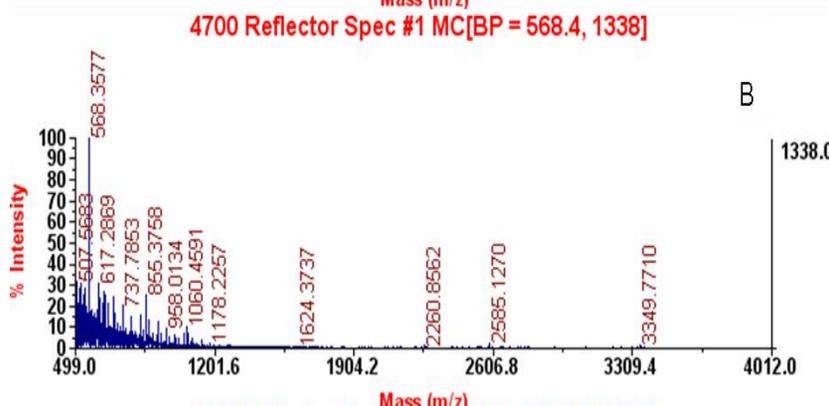
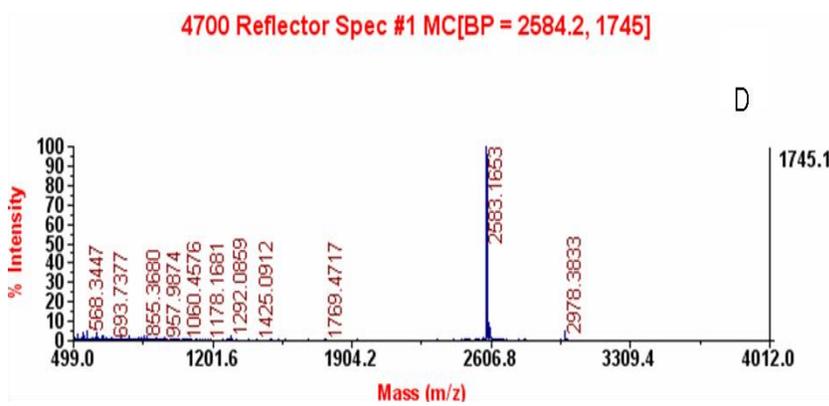
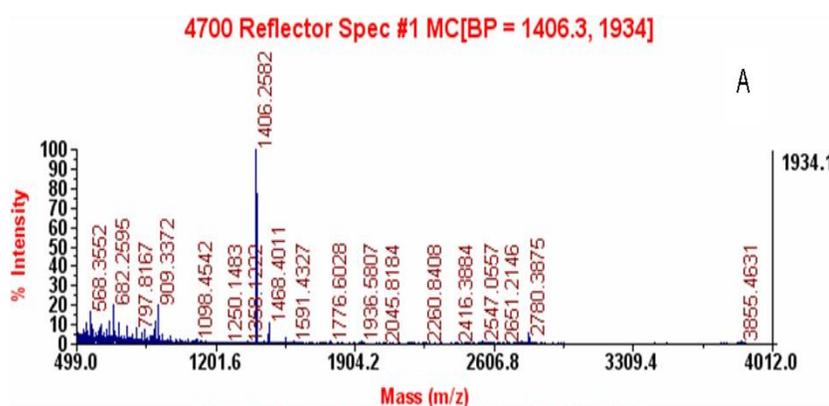


Figure 21. Analyse MS à temps de vol en mode positif des différentes fractions F65 (A), F66 (B), F66'30 (C), F67 (D), F74 (E), et F78 (F).

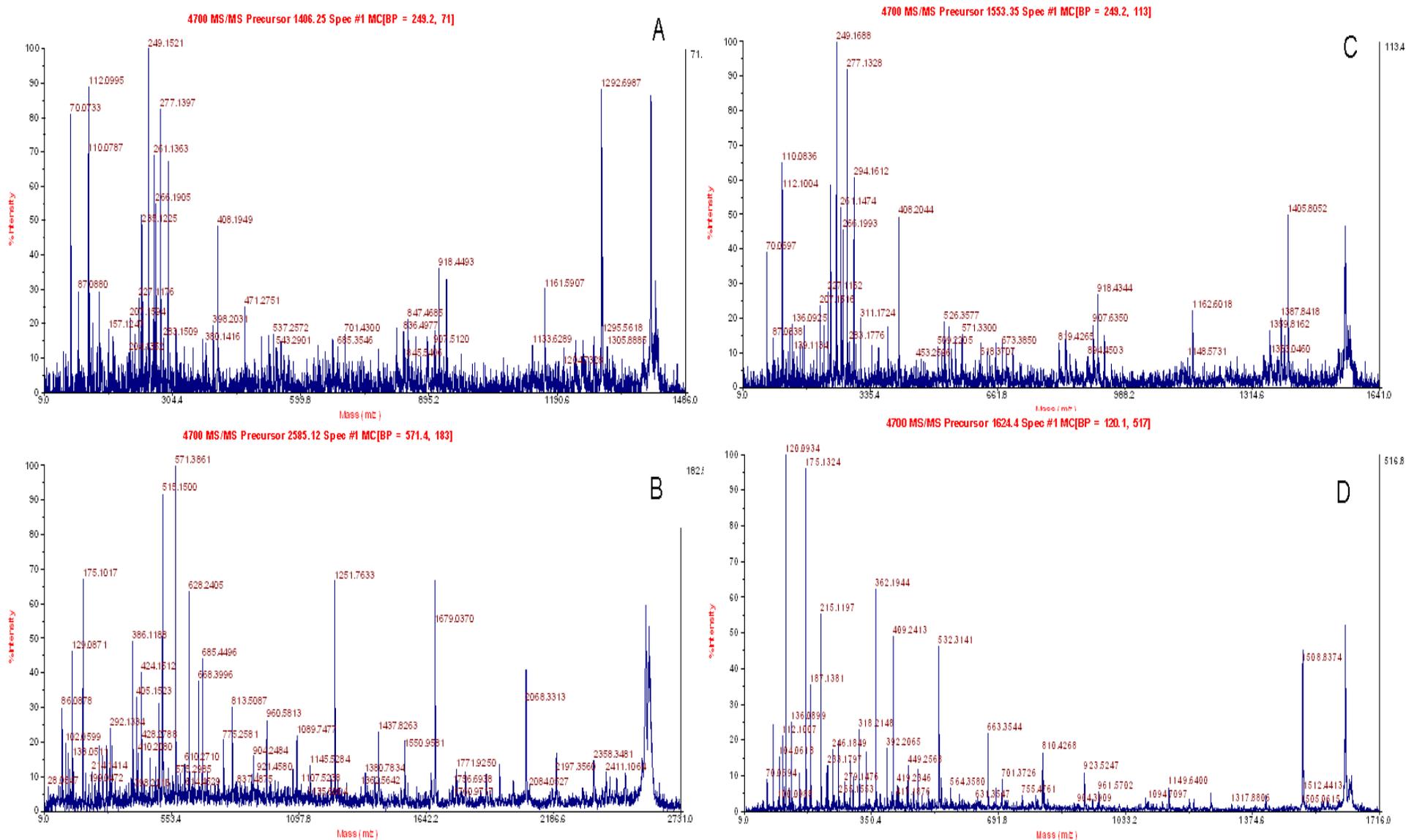


Figure 22. Analyse MS/MS à temps de vol en mode positif des analytes précurseurs des fractions F65 (A), F66'30 (B), F74 (C), et F78(D).

Le problème majeur rencontré aux regards de ces spectres, est qu'aucun des ions signatures des produits du MPA, du MPAG ou de l'AcMPAG ne sont retrouvés. Pour le MPA, un pic d'intensité majoritaire ayant un m/z à 319.2 était attendu, ainsi qu'un pic à 495.2 pour le MPAG et l'AcMPAG, et des pics d'intensité minoritaires à 287.2, 275.3, 243.2, 191.1, et 179.1 m/z (Picard et al., 2005b). Ces ions étant représentatifs de la fragmentation de ces produits.

La même analyse en mode négatif a été effectuée. Les spectres MS/MS des différents précurseurs ont un profil exactement identique à l'analyse réalisée en mode positif. Donc rien de significatif n'est ressorti de ces analyses MS/MS en mode négatif.

L'identification protéique à partir de ces spectres MS/MS a été réalisée par le logiciel GPS ExplorerTM v3.6. Dans un premier temps, les 4 spectres ont été étudiés séparément permettant l'identification d'une même protéine : HSA417790. Ensuite une étude globale a été effectuée, c'est-à-dire que les 4 spectres ont été réunis afin d'effectuer la recherche, augmentant ainsi le score d'identification de la protéine à 14%. Un tel score ne permet pas de conclure quant à l'identification certaine de la protéine. Cependant, la confiance de ces résultats est supérieure au précédent puisqu'un seul spectre a été utilisé pour la reconnaissance protéique. Il semble que les fractions récoltées ne contiennent donc que des fragments d'HSA digérés par la trypsine dont la preuve d'une éventuelle, dérivatisation par l'AcMPAG n'a pas été établie.

3.3.10. Recherche d'adduits covalents par spectrométrie de masse quadrupolaire en tandem.

3.3.10.1. Analyse de l'AcMPAG pur en mode nanospray.

L'AcMPAG a été dilué au 1/2 dans du tampon A (2% d'ACN-0,1% d'acide formique (FA)). L'analyse a été réalisée en mode positif (Figure 23A) et en mode négatif (Figure 23B et 23C).

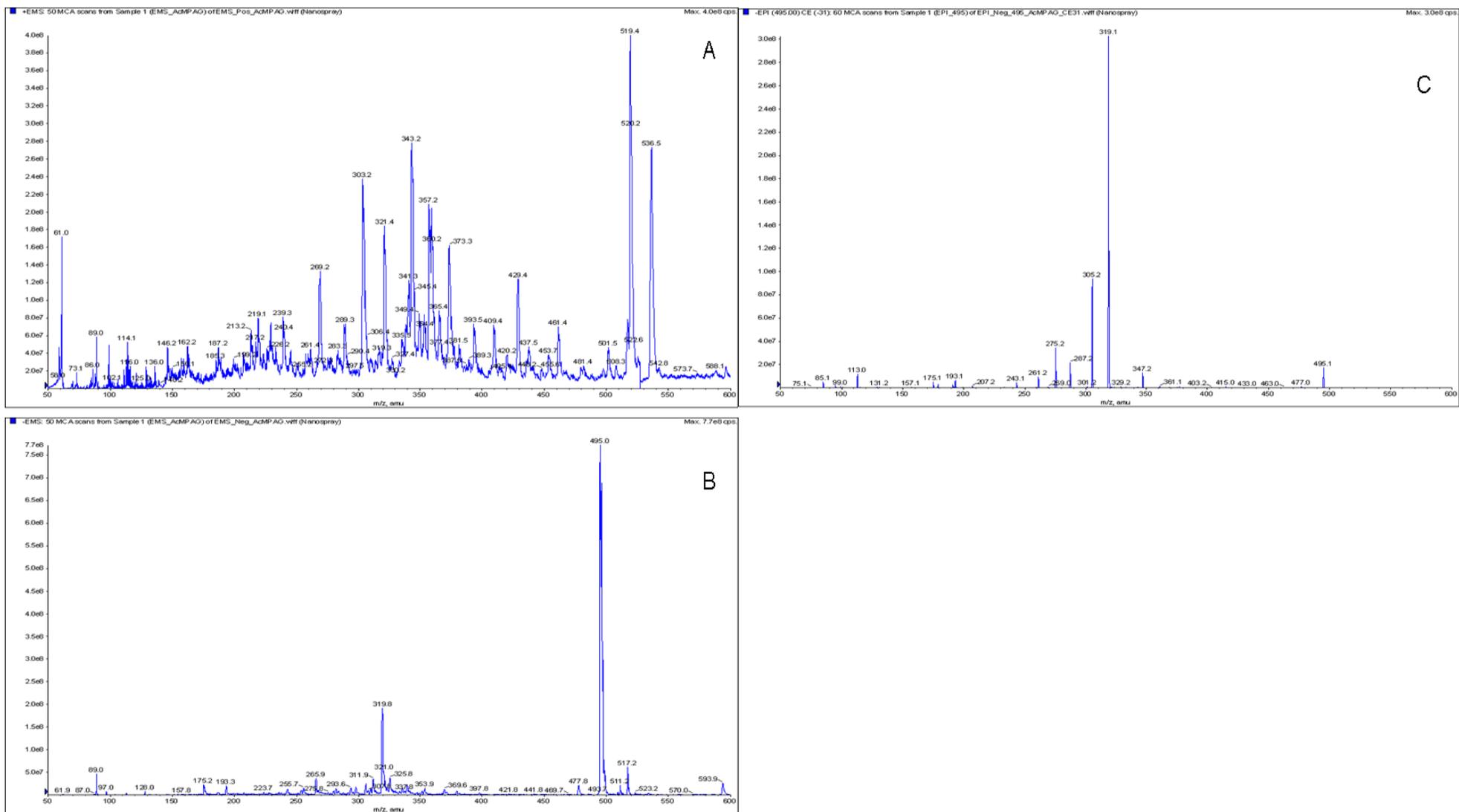


Figure 23. Analyse de l'AcMPAG pur en mode nanospray, par le QTrap 4000. EMS en mode positif (A), EMS en mode négatif (B) et EPI sur le précurseur ayant un m/z à 495 détecté en B en mode négatif (C), de 10 pmol d'AcMPAG.

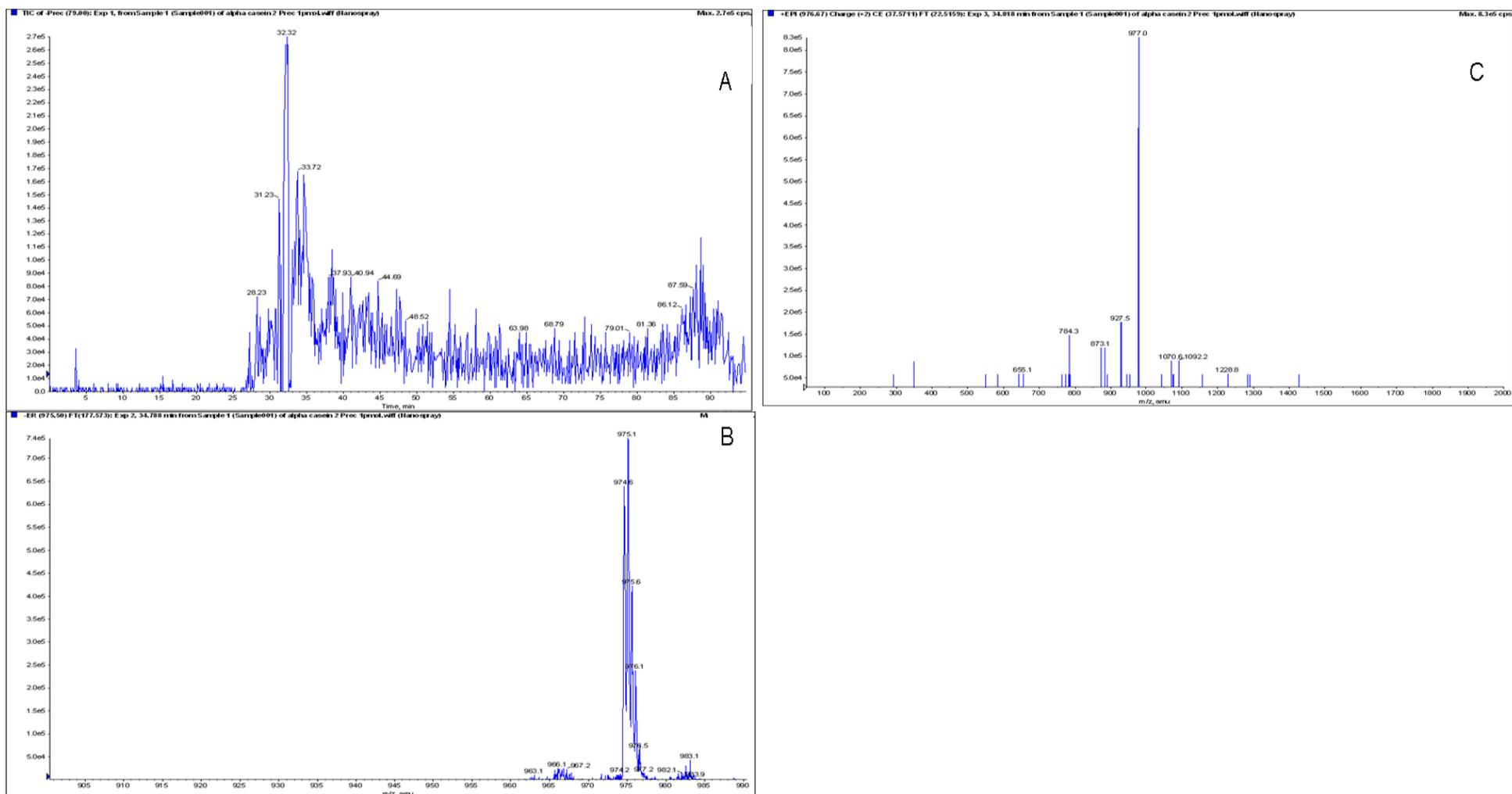
En mode positif, beaucoup de pics sont présents, mais il nous est impossible de déterminer lesquels sont la signature de l'AcMPAG. En mode négatif, nous observons essentiellement les pics spécifiques de l'AcMPAG, confirmant ainsi les résultats précédemment obtenus par N. Picard (Picard et al., 2005b) ; à savoir des ions ayant un m/z à 287.2, 275.3, 243.2, 191.1, et 179.1 m/z (Picard et al., 2005b). Ces ions étant représentatifs de la fragmentation de l'AcMPAG.

3.3.10.2. Validation de la méthode « Precursor Ion Scan » avec le QTrap 4000.

Nous voulons utiliser le mode « Precursor Ion Scan » pour la recherche d'adduits covalents sur l'HSA : déterminer et identifier les précurseurs qui donnent un fragment ayant un m/z à 319 (correspondant au composé MPA) en mode négatif.

Tout d'abord, l' α -Caséine est analysée par LC-MS/MS en modes EMS et EPI, puis identifiée par ProteinPilot™. Ensuite, la méthode « Precursor Ion Scan » est vérifiée sur un digestat trypsique d' α -Caséine (incubation une nuit à 37°C). Sont recherchés les précurseurs donnant un fragment à 79 (correspondant au phosphate) en mode négatif (Figure 24A). Comme attendus, les 3 pics majoritaires ayant un m/z à 732.5, 829.8 et 975, présentés comme exemple de fragmentation en nano-spray par Applied Biosystems ont été détectés en nano-infusion. Toutefois, de ces 3 précurseurs, seul celui ayant un m/z à 975 donne un résultat satisfaisant (Figure 24B et 24C). En effet, son intensité est de 7.4×10^5 , et il est doublement chargé. En ce qui concerne la fragmentation EPI, le précurseur est encore présent sur le spectre, ce qui laisse à penser que l'énergie de collision peut être encore optimisé.

Ces données EPI ont été traitées par ProteinPilot™ afin d'identifier le(s) peptide(s) phosphorylé(s) et de définir leurs séquences. Le fragment auquel nous nous intéressons (ion parent ayant un m/z à 975) a été retrouvé comme étant phosphorylé, ce qui est très encourageant (LQQpTQAQVDEVVIMR).



Même si les résultats obtenus ne sont pas optimaux (par exemple, l'énergie de collision), nous pouvons conclure que la méthode utilisée est correcte, et qu'elle peut être appliquée pour les conditions de formation d'adduits d'AcMPAG sur l'HSA.

3.3.10.3. Analyse de l'AcMPAG pur et de l'AcMPAG trypsinisé par la méthode « Precursor Ion Scan » en mode négatif, avec le QTrap 4000.

La solution d'AcMPAG pure est analysée en mode « Precursor Ion Scan » afin de déterminer les précurseurs qui donnent un fragment à 319 m/z en mode négatif (Figure 25A). Les ions correspondant à un m/z de 495 ± 0.5 Da (masse de l'AcMPAG) ont été extraits (Figure 25B).

Nous nous attendions à un seul pic correspondant à l'AcMPAG, or ce n'est absolument pas le cas. En effet, plusieurs pics sont présents tout au long du gradient, ce qui nous laisse à penser que le composé n'est pas stable, qu'il se dégrade, et/ou qu'il pourrait se trouver sous forme de dimère et/ou d'isomères positionnels (Picard et al., 2004).

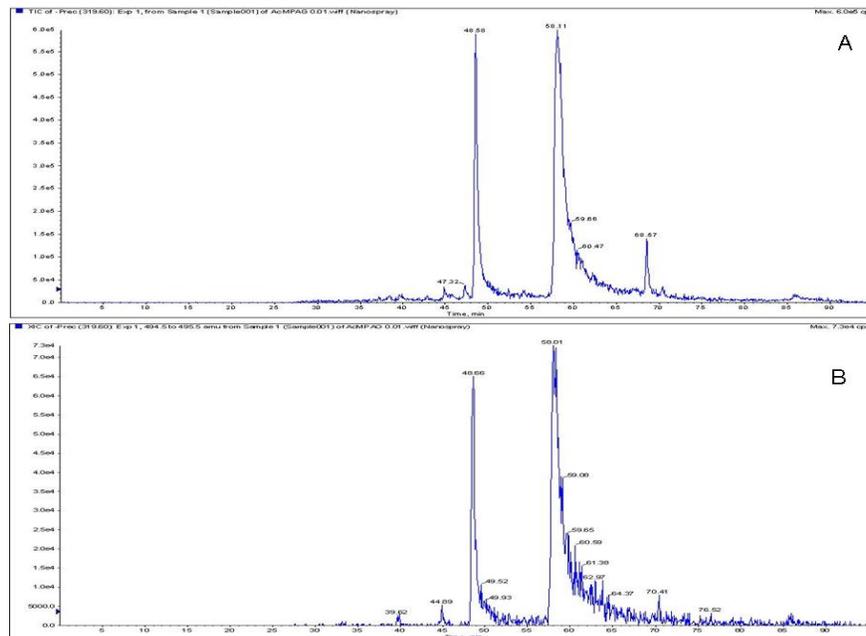
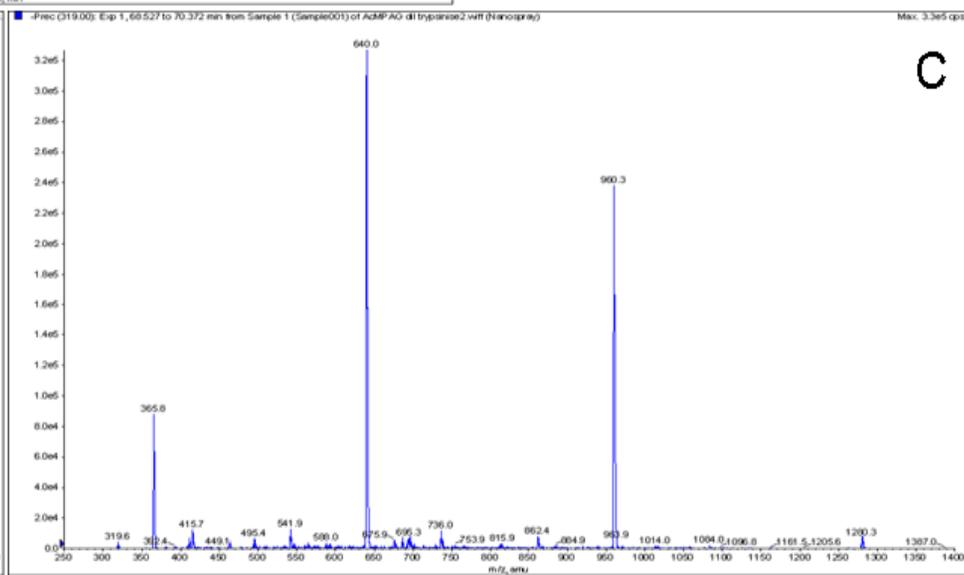
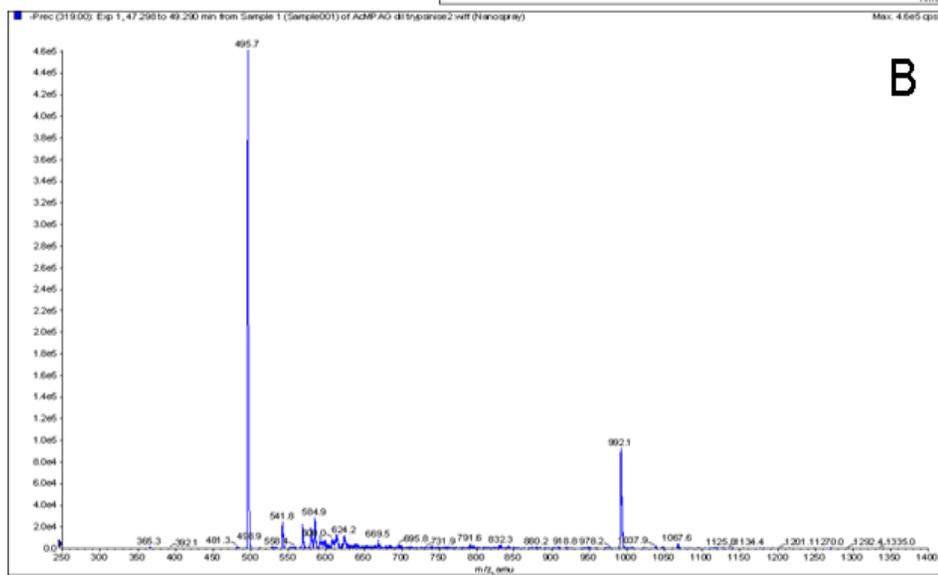
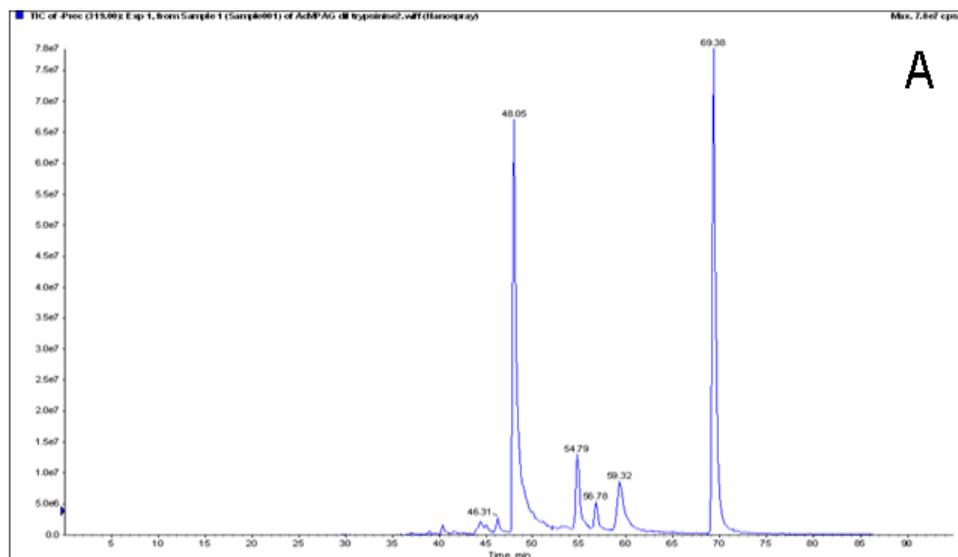
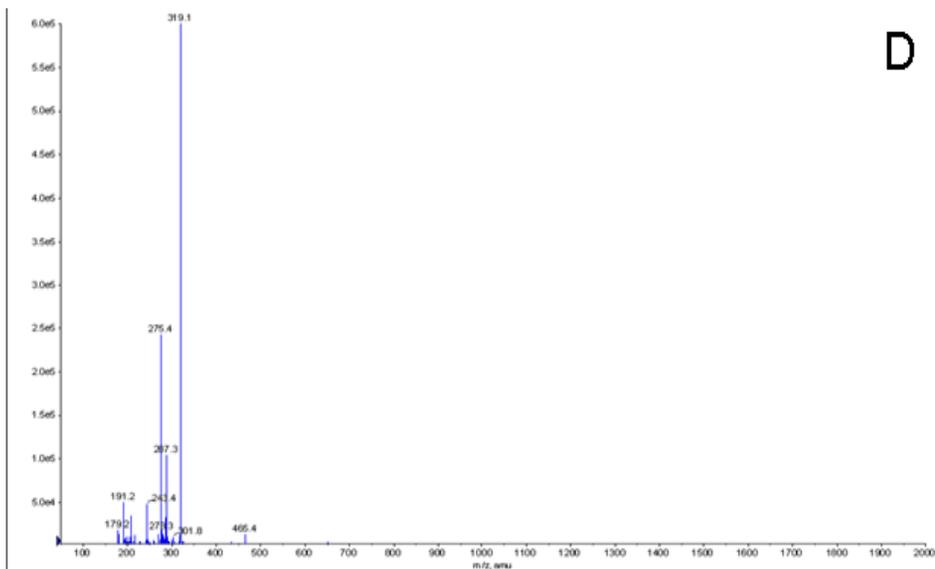


Figure 25. Analyse de l'AcMPAG pur en mode « Precursor Ion Scan » focalisé à 319 m/z en mode négatif, par le QTrap 4000. Courant ionique total (A) et du XIC entre un m/z de 494.5 et de 495.5 (B) de 10 pg d'AcMPAG.

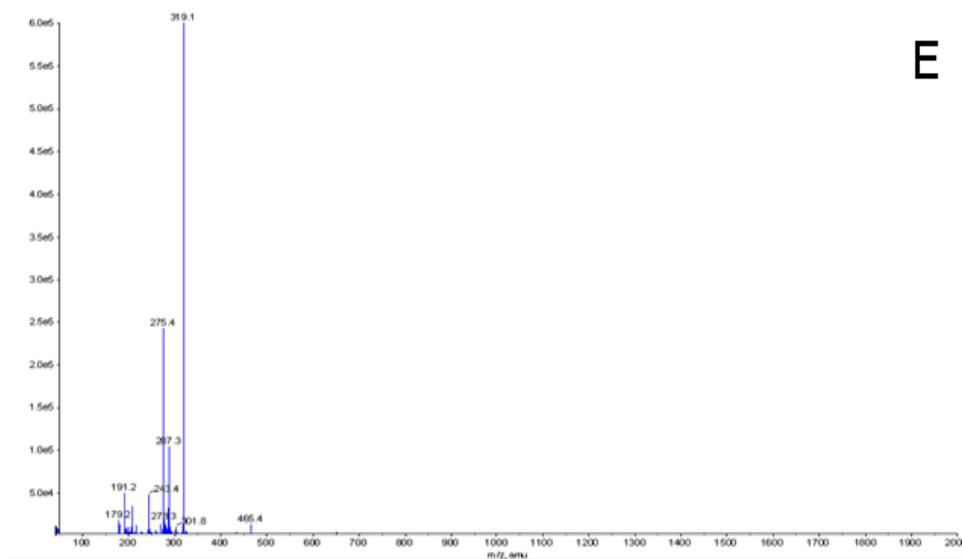
Une nouvelle étude a été réalisée, mais cette fois-ci sur l'AcMPAG trypsinisé pour détecter les fragments de l'AcMPAG avec la méthode « Precursor Ion Scan » et orienter vers les spectres de fragmentation attendus pour les adduits covalents (Figure 26).

En mode « Precursor Ion Scan », nous retrouvons les mêmes fragments observés qu'en infusion (Figure 23), confirmant ainsi la fragmentation de l'AcMPAG (Picard et al., 2005b).

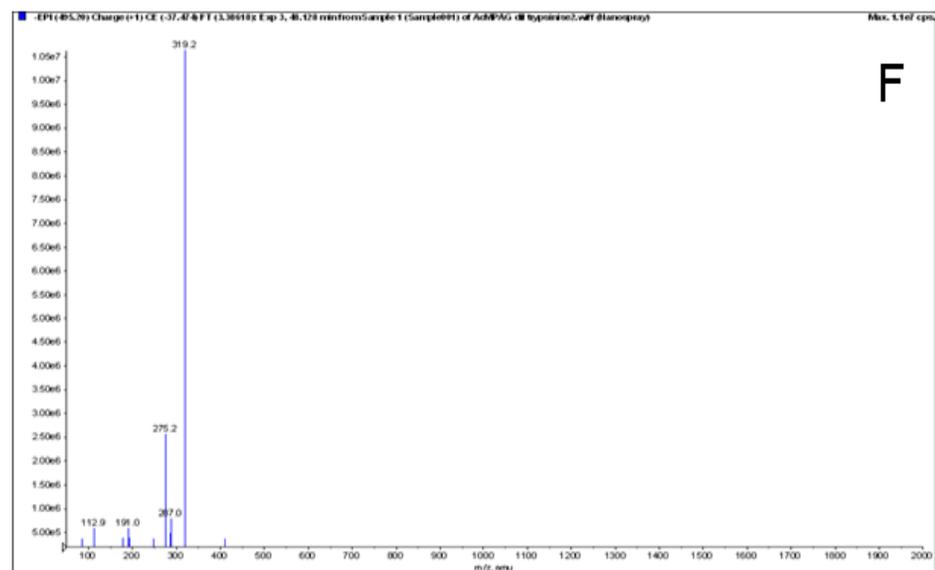




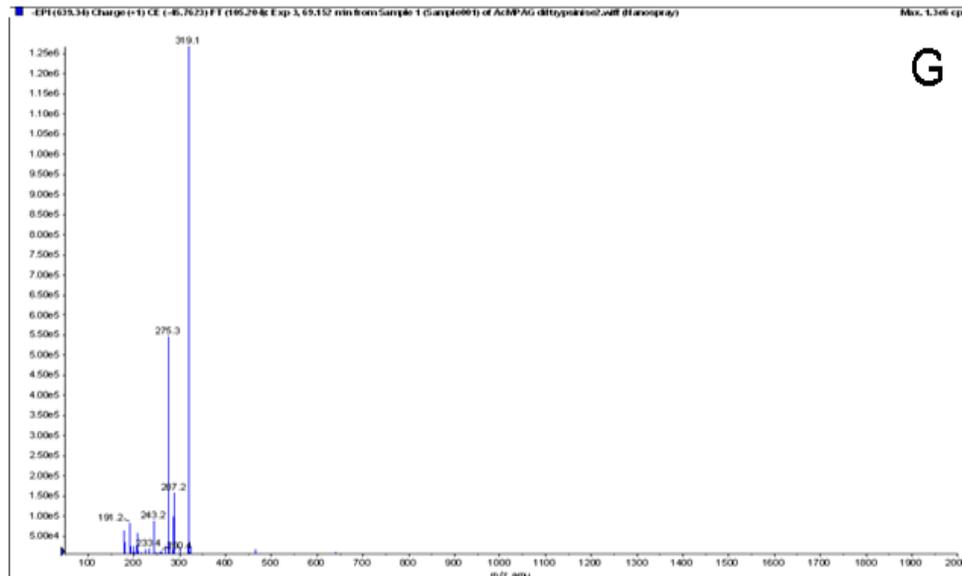
D



E



F



G

Figure 26. Analyse de l'AcMPAG trypsinisé en mode « Precursor Ion Scan » focalisé à 319 m/z en mode négatif, par le QTrap 4000. Courant ionique total (TIC) (A), spectre extrait entre 47.3 et 49.3 min (B) et entre 69.5 et 70.4 min (C), EPI sur les précurseurs ayant un m/z à 992 (D), un m/z à 495 (E), un m/z à 960 (F) et un m/z à 640 (G) de 10 pg d'AcMPAG.

3.3.10.4. Détermination d'adduits covalents de l'AcMPAG sur l'HSA avec le QTrap 4000.

La formation d'adduits et la digestion trypsique ont été réalisées pour les 3 conditions suivantes : HSA, HSA + AcMPAG à 2 ratio différents : 1/3 et 1/20. Les courants ioniques totaux (TIC) obtenus après séparation chromatographique nanoLC et détection avec le QTrap 4000 sont présentés en figure 27.

Les profils obtenus pour les conditions HSA + AcMPAG à des ratios différents sont très proches. Le rapport de concentration entre l'HSA et l'AcMPAG (1/3 ou 1/20) ne semble pas jouer un rôle majeur dans la formation potentielle d'adduits covalents.

Il est possible que le pic qui s'étale entre les temps de rétention 66 et 70 min soit spécifique de la dérivatisation de l'HSA par l'AcMPAG. Mais lorsque l'on compare ces profils avec le spectre de l'AcMPAG obtenu précédemment (Figure 27), cela ne nous permet pas de conclure quant à la formation d'adduits de l'AcMPAG sur l'HSA. Pour cela, il nous faudrait un contrôle positif comme la tolmétine acyl-glucuronide.

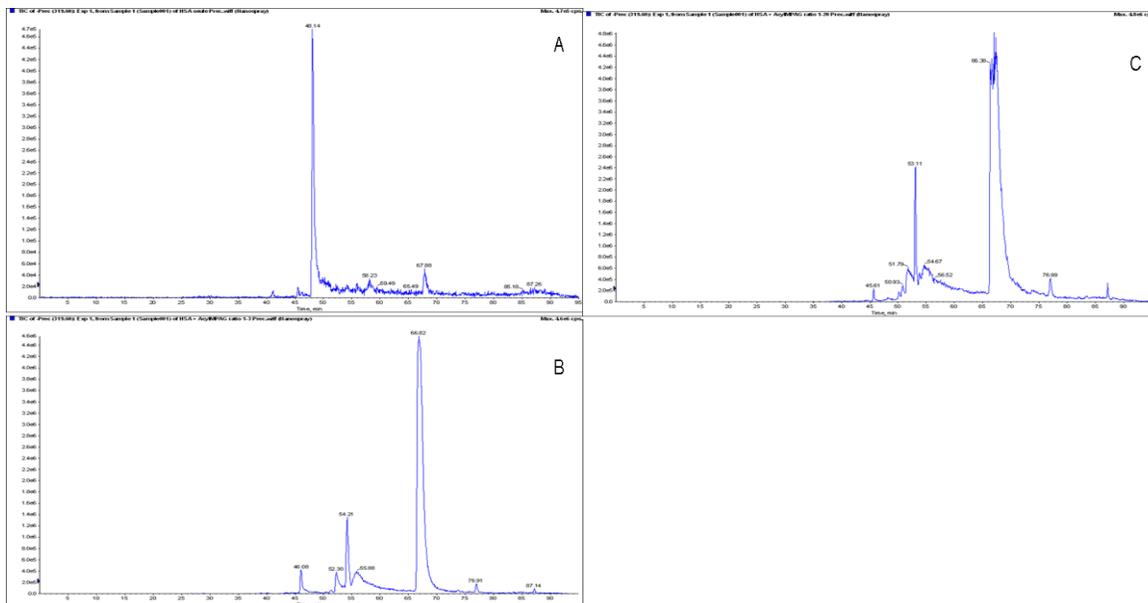


Figure 27. Détermination d'adduits covalents de l'AcMPAG sur l'HSA en mode « Precursor Ion Scan » focalisé à 319 m/z en mode négatif, analysé par le QTrap 4000. Courant ionique total pour les 3 conditions suivantes : HSA seule (A), HSA + AcMPAG ratio 1/3 (B) et HSA + AcMPAG ratio 1/20 (C), avec 15 µg de protéines traitées.

Voyant qu'aucune dérivatisation de l'AcMPAG sur l'HSA n'était détectée, nous avons voulu tester notre méthode sur les UGTs. En effet, une équipe française a montré que le kétoprofène acylglucuronide inhibait irréversiblement la glucuronidation du 1-naphthol et du 2-naphthol dans les microsomes hépatiques humains. Cette inhibition était

toujours associée avec la formation d'adduits protéine microsomale-kétoprofène (Terrier et al., 1999).

3.3.10.5. Recherche d'adduits covalents de l'AcMPAG sur les UGTs humaines.

3.3.10.5.1. Identification du contenu protéique d'un pool de microsomes intestinaux.

Dans le but d'identifier les différentes protéines présentes dans un pool de microsomes intestinaux, deux quantités différentes de ce pool sont déposées sur un gel d'acrylamide 10%. Les protéines sont révélées au bleu de Coomassie R250 (Figure 28). Le gel est découpé en bandes d'épaisseur inférieure à 0.5 mm afin d'effectuer la trypsination en gel selon le protocole de Promega®. Les différentes fractions obtenues sont séparées chromatographiquement avant d'être analysées avec le QTrap 4000 selon les paramètres décrits dans le paragraphe matériel et méthodes.

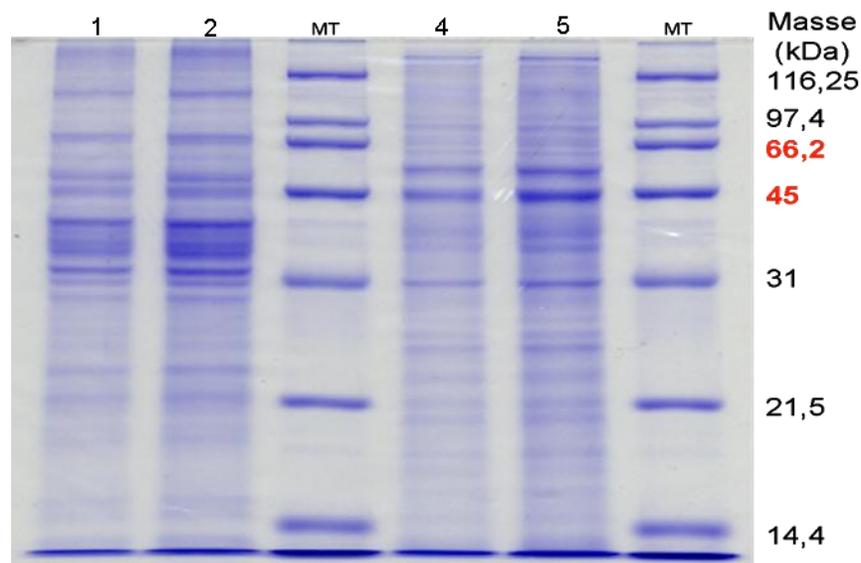


Figure 28. Identification du contenu protéique d'un pool de microsomes intestinaux et hépatiques sur gel DSD-PAGE 10%. Dépôt du marqueur de taille (colonnes 3 et 6), de 7.5 µg de protéines issues d'un pool de microsomes hépatiques (colonne 1) et intestinaux (colonne 4) et de 15µg de protéines issues d'un pool de microsomes hépatiques (colonne 2) et intestinaux (colonne 5).

Les protéines sont identifiées grâce au logiciel ProteinPilot™ (Applied Biosystems). Aucune protéine de la famille des UGTs et des CYP450 n'est détectée. Par conséquent, nous décidons de réaliser une coupe plus fine du gel d'acrylamide en se focalisant sur les bandes contenant les protéines ayant leur masse comprise entre 66.2 et

45 kDa. Une nouvelle analyse chromatographique couplée au QTrap 4000 est effectuée. Les identifications protéiques sont présentées dans le Tableau 6.

Malheureusement, nous ne détectons toujours pas de protéines de la famille des UGTs et des CYP450, malgré l'augmentation du nombre de protéines détectées. Ces deux familles de protéines ne doivent pas être en quantité suffisante dans les microsomes intestinaux pour être détectées en spectrométrie de masse. Cette même approche a également été utilisée avec un pool de microsomes hépatiques.

Tableau 6. Identification du contenu protéique d'un pool de microsomes intestinaux. Séparation en gel 1D suivi d'une analyse par LC-MS/MS en modes EMS et EPI. Index de qualité des peptides : *score>30 et **score >2.

	Protéines/peptides	Protéines identifiées	Score	Nombre de peptides permettant l'identification
Mascot	2/*152	Serum albumin precursor	149	4
		Protein CASC5	39	3
Paragon	3/**9	Zinc finger protein 619	0.84	1
		Beta-adducin	0.77	1
		IgGFc-binding protein precursor	0.72	1

3.3.10.5.2. Identification du contenu protéique d'un pool de microsomes hépatiques.

L'identification du contenu protéique d'un pool de microsomes hépatiques a été effectuée de la même manière que pour le pool de microsomes intestinaux. La totalité du dépôt protéique a été analysée par ProteinPilot™, identifiant ainsi 72 protéines par Mascot à partir de 1219 peptides (score>30), contre 44 protéines par Paragon à partir de 310 peptides (score>2). Parmi toutes les protéines identifiées, seules les protéines de la famille des UGTs et des CYP450 sont présentées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Identification du contenu protéique d'un pool de 6 µg de microsomes hépatiques. Séparation en gel 1D suivi d'une analyse LC-MS/MS en modes EMS et EPI. (Enzyme productrice d'AcMPAG, métabolite du MPA, rouge ; peptides uniquement identifiés par mascot, violet ; peptides uniquement identifiés par paragon, orange)

	Peptides identifiés par Mascot	Peptides Identifiés par Paragon (ProteinPilot)
UGT 2B7 (précurseur)	K.TILDELIQR.G R.ANVIASALAQIPQK.V R.VINDPSYKENVMK.L R.FDGNKPDTLGLNTR.L K.TELNFIMQIQKR.W R.VDFNTMSSTDLLNALK.R R.VDFNTMSSTDLLNALKR.V	VDFNTMSSTDLLNALK VINDPSYKENVMK FDGNKPDTLGLNTR VDFNTMSSTDLLNALKR TELENFIMQIQKR
CYP450 3A3	K.LSLGGLLQPEKPVVLK.V K.LKEMVPIIAQYGDVLR.N	LKEMVPIIAQYGDVLR LSLGGLLQPEKPVVLK
CYP450 3A4	K.VWGFYDGGQPVLAITDPDMIK.L R.RVQEIIDDVIGQVR.R R.EVLNAVPLLHLPALAGK.V R.LLDLAQEGLKEESGFLR.E	VWGFYDGGQPVLAITDPDMIK LLDLAQEGLKEESGFLR RVQEIIDDVIGQVR
CYP450 4A11 (précurseur)	R.NAFHQNDTIYSLTSAGR.W	NAFHQNDTIYSLTSAGR
UGT 2B10 (précurseur)	R.FDGNKPDALGLNTR.L R.VDFNTMSSTDLLNALK.T R.HSGGFIFPPSYVPMVMSK.L	-
UGT 2B4 (précurseur)	R.ANVIASALAKIPQK.V R.FDGNKPDTLGLNTR.L K.GAAVSLDFHTMSSTDLLNALK.T	GAAVSLDFHTMSSTDLLNALK VINDPSYKENVMK FDGNKPDTLGLNTR VDFNTMSSTDLLNALKR TELENFIMQIQKR
CYP450 2E1	K.RVCAGEGLAR.M R.FGPFVFTLYVGSQR.M K.GTVVVPTLDSVLYDNQEFDPPEK.F	GTVVVPTLDSVLYDNQEFDPPEK QEMPYMDAVVHEIQR GTVVVPTLDSVLYDNQEFDPPEK
CYP450 51A1	K.SPIEFLENAYEK.Y R.LDFNPDRLQDNPASGEK.F	SPIEFLENAYEK
CYP450 2C9	R.FDYKDQQFLNLMEK.L K.LPPGPTPLPVIGNILQIGIK.D R.GKLPPGPTPLPVIGNILQIGIK.D	GKLPPGPTPLPVIGNILQIGI FDYKDQQFLNLMEK
CYP450 4F12	K.SYITIFNK.S R.LDMFEHISLMTLDSLQK.C	-
CYP450 4F11	R.FNQENIK.E R.LDMFEHISLMTLDSLQK.C	LDMFEHISLMTLDSLQK
CYP450 2C8	R.TKGLGISSNGK.R K.VQEEIDHVIGR.H K.LPPGPTPLPIGNMLQIDVK.D	VQEEIDHVIGR
CYP450 1A2	-	SPPEPWGWPLLGHVLTLLGK

3.3.10.5.3. Recherche d'adduits covalents de l'AcMPAG sur les UGTs d'un pool de microsomes hépatiques.

Etant donné que l'identification des UGTs dans un pool de microsomes hépatiques est possible, la recherche d'adduits covalents de l'AcMPAG sur les UGTs est entreprise. Malheureusement, cette recherche n'est pas concluante, ce qui peut être due à une quantité et/ou une activité trop faible de l'UGT2B7 dans le pool microsomal. Par conséquent, nous allons tester sur les Supersomes™ afin de s'affranchir du problème de quantité.

3.3.10.5.4. Identification du contenu protéique supersomal surexprimant l'UGT2B7 humaine spécifique.

L'identification du contenu protéique de plusieurs supersomes (Contrôle, l'UGT1A3, l'UGT1A4 et l'UGT2B7) a été effectuée de la même manière que pour le pool de microsomes intestinaux.

Les profils protéiques (Figure 29) des préparations supersomales sont identiques en ce qui concerne les bas poids moléculaires (<31 kDa). En revanche, les profils des protéines >31 kDa sont spécifiques à chaque préparation.

La totalité du dépôt protéique pour chaque profil a été analysée par ProteinPilot™, et les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

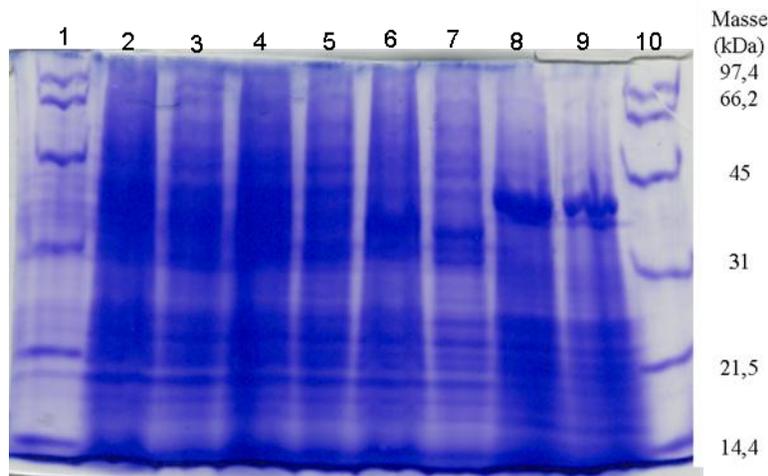


Figure 29. Identification du contenu protéique de supersomes, sur gel SDS-PAGE 10%. Dépôt du marqueur de taille (colonne 1 et 10), de 50 (colonne 2) et de 25 µg (colonne 3) de supersomes surexprimant l'UGT1A4, de 50 (colonne 4) et de 25 µg (colonne 5) de supersomes surexprimant l'UGT1A3, de 50 (colonne 6) et de 25 µg (colonne 7) de supersomes surexprimant l'UGT2B7, de 50 (colonne 8) et de 25 µg (colonne 9) de supersomes contrôle.

Tableau 8. Identification du contenu protéique de supersomes : contrôle, UGT2B7, UGT1A3 et UGT1A4. Séparation en gel 1D suivi d'une analyse LC-MS/MS en modes EMS et EPI. Index de qualité des peptides : *score>30 et **score >2.

Algorithme de recherche en banques	Contrôle	UGT2B7	UGT1A3	UGT1A4
Mascot (protéines/*peptides)	6/2225	14/3639	16/3985	13/3718
Paragon (protéines/**peptides)	5/135	12/485	9/861	8/609

Beaucoup de protéines ont été identifiées : 10 en moyenne par condition. Nous identifions effectivement les UGT indiquées comme étant surexprimées dans les préparations, et ce pour chaque condition. Pour les UGT1A3 et 1A4, certains peptides identifiés sont identiques dans les 2 conditions, peptides non retrouvés dans le contrôle ou l'UGT2B7. Ce résultat est attendu puisque ces 2 UGTs appartiennent à la même famille et ne diffèrent que dans leur isoforme. Il indique donc que les peptides identifiés ne sont pas tous protéotypiques de l'isoforme UGT surexprimée.

Pour la suite des expérimentations, la préparation supersomale contrôle ne surexprimant aucune UGT sert de témoin « double négatif » (ni enzymes, ni substrat) et les préparations UGT1A3 et 1A4 de témoins négatifs surexprimant une UGT spécifique.

3.3.10.5.5. Recherche d'adduits covalents de l'AcMPAG sur l'UGT2B7 humaine surexprimée dans les supersomes.

Après formation d'adduits entre l'AcMPAG et l'UGT2B7 et digestion tryptique, les protéines comprises entre 45 et 67 kDa ont été digérées en gel et analysées par LC-MS/MS en mode EMS et EPI (Tableau 9).

Tableau 9. Identification du contenu protéique supersomal de l'UGT2B7 en fonction du temps d'incubation du MPA (métabolisé en MPAG et AcMPAG). Séparation en gel 1D et analyse LC-MS/MS en modes « Full scan » (EMS + EPI) et « Precursor Ion Scan ». Index de qualité des peptides lors de l'identification par Mascot : *score>30.

	- MPA	+ MPA (30 min)	+ MPA (60 min)
Mascot	Mode EMS + EPI	1/569	3/519
(protéines/*peptides)	Mode Precursor Ion Scan	2/554	1/551

Aucun peptide de l'UGT2B7 n'a été identifié. Par conséquent les adduits éventuellement formés entre l'AcMPAG et l'UGT2B7 ne sont pas décelables. De plus, aucun autre peptide ne semble porter la modification résultant d'un adduit d'AcMPAG (attendue sur une lysine).

N'ayant pu obtenir la tolmétine acyl-glucuronide, nous avons essayé de trouver un autre composé susceptible d'être utilisé comme contrôle positif. Le naproxène acyl-glucuronide semble être un bon candidat puisqu'une équipe japonaise a caractérisé en 1995 (Iwaki et al., 1995) les liaisons covalentes entre ce produit et l'HSA.

3.3.10.6. Recherche d'adduits covalents du naproxène acyl-glucuronide sur l'HSA par LC-MS/MS.

3.3.10.6.1. Analyse du naproxène pur.

Les structures du naproxène et du naproxène acyl-glucuronide sont représentées en figure 31, ainsi que leur fragmentation.

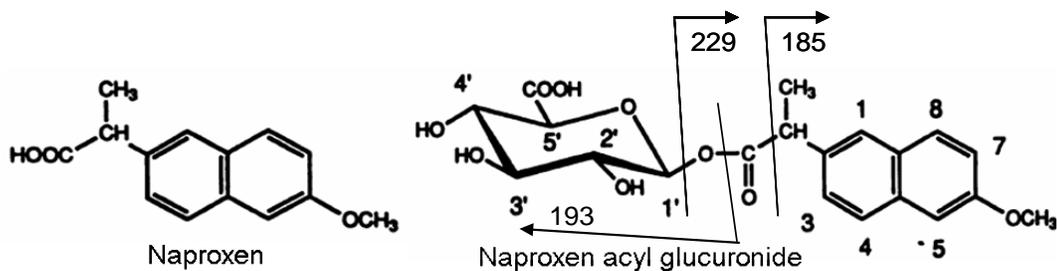


Figure 30. Structure chimique et fragmentation du naproxène et du naproxène acyl-glucuronide.

La solution de naproxène pur est infusée afin de déterminer sa fragmentation (Figure 31) en mode négatif.

Suite à l'infusion des produits purs, les ions ayant un m/z à 229 et à 193 ont été sélectionnés pour construire les méthodes « Precursor Ion Scan » en mode négatif afin d'étudier la formation d'adduits covalents sur l'HSA.

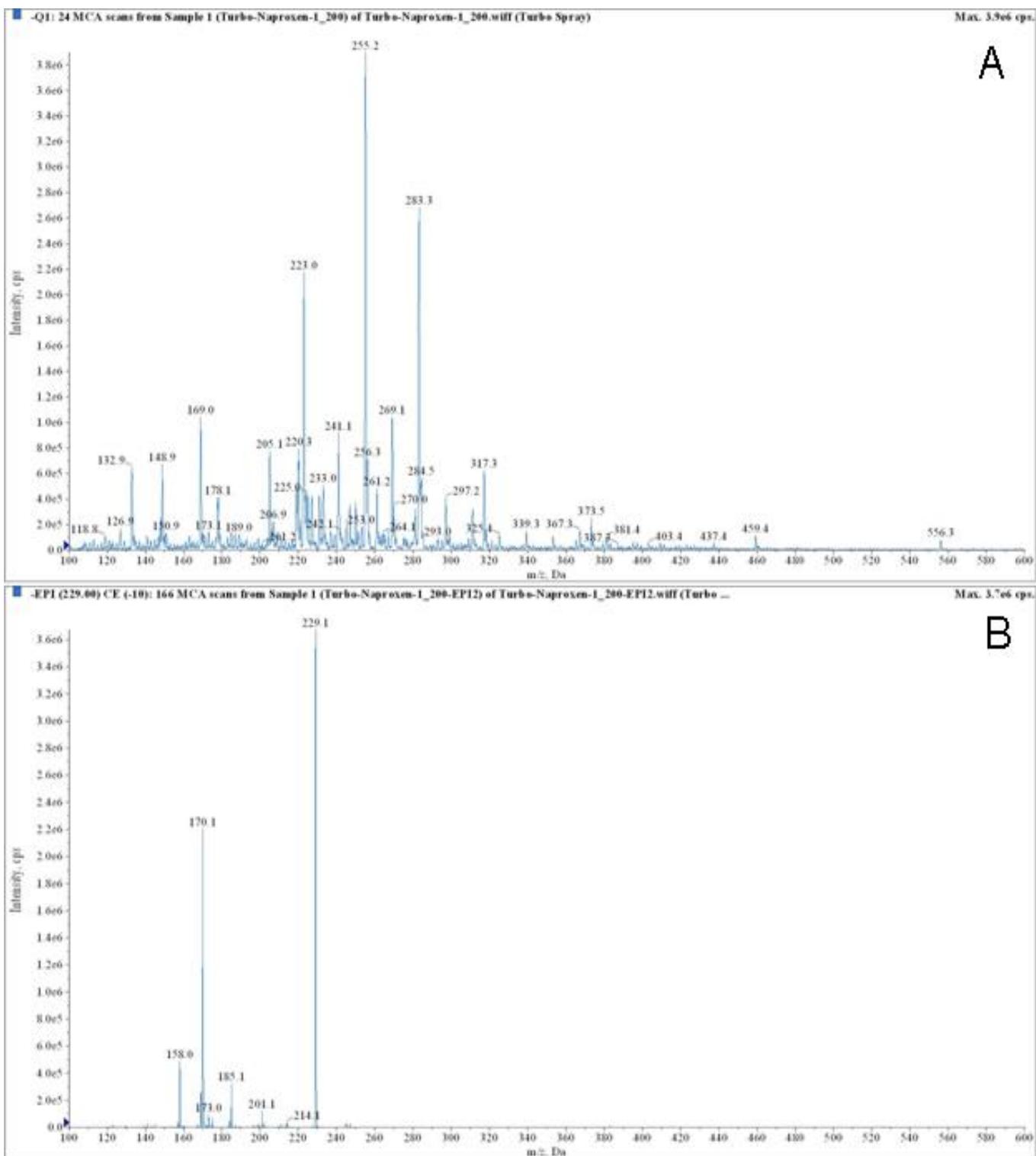


Figure 31. Analyse du naproxène pur par LC-MS/MS en modes EMS négatif (A) et EPI négatif sur le précurseur ayant un m/z à 229 détecté en A (B).

3.3.10.6.2. Analyse du naproxène-acyl-glucuronide pur.

La solution de naproxène acyl-glucuronide est infusée et analysée en mode EMS négatif (Figure 32A et 32B), ainsi qu'en mode « Precursor Ion Scan » négatif focalisé à un m/z de 193 (Figure 32C et 32D).

La fragmentation du naproxène acyl-glucuronide (un m/z de 405) donne principalement un ion à un m/z de 193, ainsi que les ions caractéristiques du naproxène décrits précédemment.

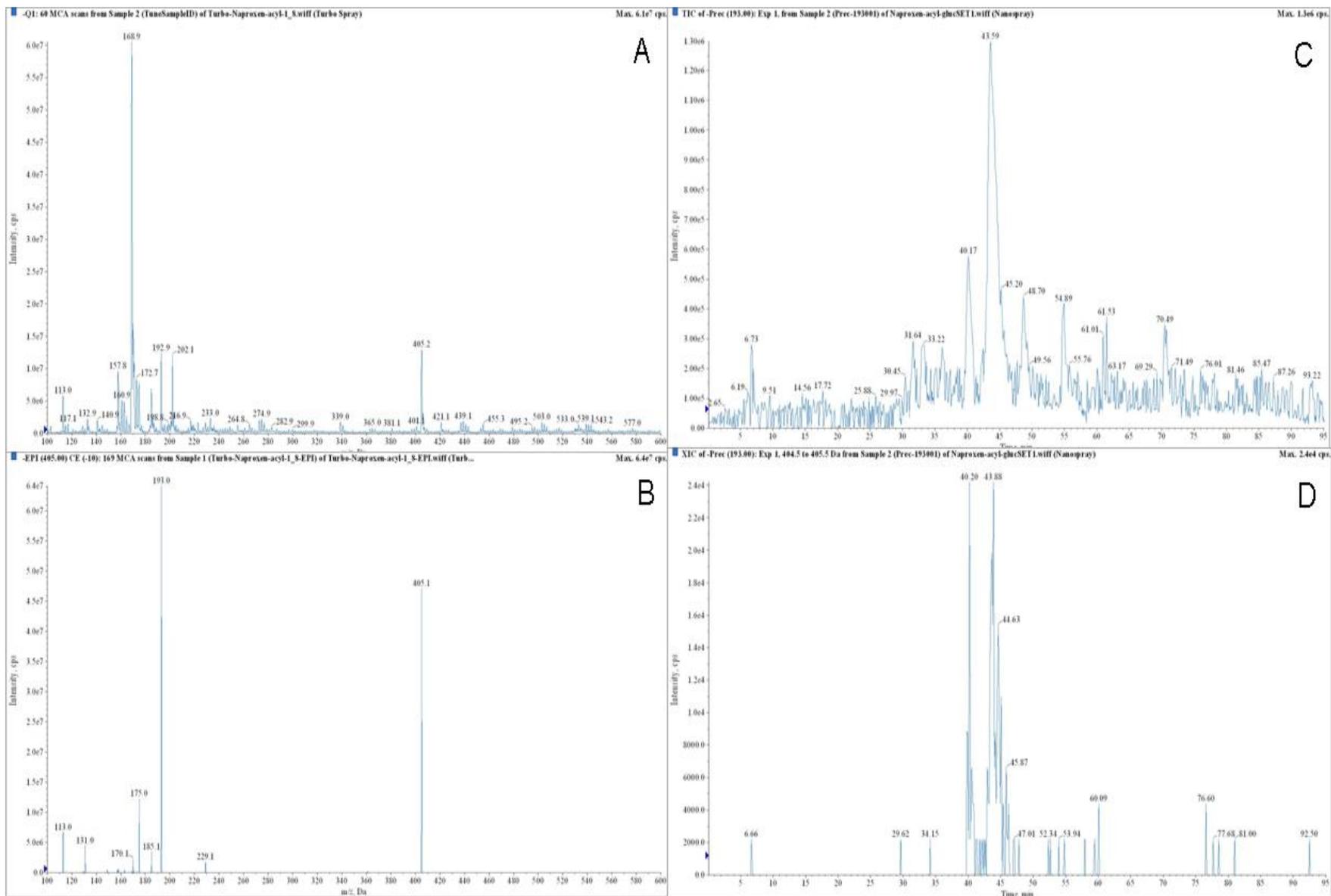


Figure 32. Analyse du naproxène acyl-glucuronide pur par LC-MS/MS en modes EMS négatif (A) et EPI négatif sur le précurseur ayant un m/z à 405 détecté en A (B), courant ionique total (TIC) en fonction du temps de rétention du naproxène acyl-glucuronide analysé en mode « Precursor Ion Scan » focalisé à un m/z de 193 en mode négatif (C), XIC entre un m/z de 404.5 et de 405.5 à partir du TIC précédent (D).

3.3.10.6.3. Détermination d'adduits covalents du naproxène acyl-glucuronide sur l'HSA.

La formation d'adduits entre le naproxène acyl glucuronide et l'HSA a été réalisée au ratio 1/3, suivi de la digestion trypsique. L'analyse EMS et les courants ioniques totaux obtenus après analyses LC-MS/MS sont présentés en Figure 33.

Nous n'observons pas la formation d'adduits covalents entre le naproxène acyl-glucuronide et l'HSA.

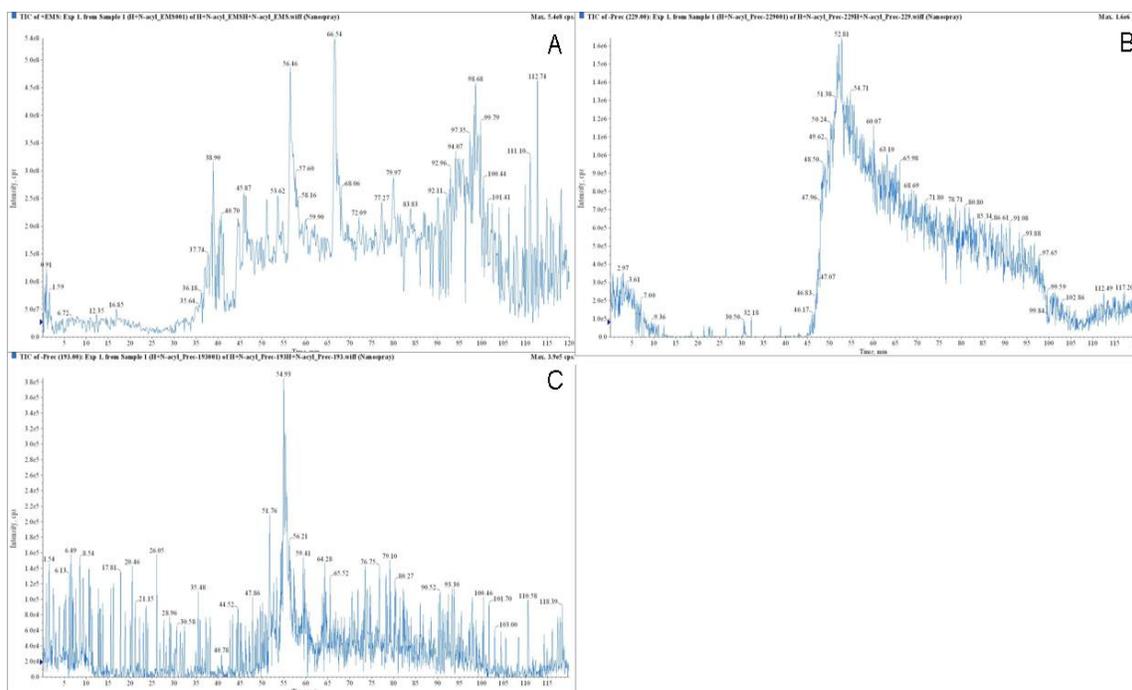


Figure 33. Détermination d'adduits covalents du naproxène acyl glucuronide sur l'HSA, analyse par le QTrap 4000. Analyse EMS (A), et courant ionique total en mode « Precursor Ion Scan » focalisé à un m/z de 193 en mode négatif (B) et à un m/z de 229 en mode négatif (C).

3.4. Discussion.

La recherche d'adduits covalents sur les protéines de la BSA, l'HSA et l'IMPDH par HPLC-UV n'a pas été concluante ; c'est pourquoi, nous avons essayé d'améliorer notre détection en utilisant le QTrap4000. Etant donné que les résultats n'étaient pas meilleurs, nous avons tenté de réaliser la réaction de formation des adduits au plus près du lieu de production de l'AcMPAG (par métabolisation du MPA) : les UGTs, ainsi qu'un nouveau produit : le naproxène acyl-glucuronide.

Le problème majeur de cette étude a probablement été la quantité de produits de réaction. En effet, la deuxième étape de formation des adduits se déroule sur une quantité

restreinte de la réaction de la première étape (environ 1%). Le but a été d'optimiser toutes les étapes afin d'éviter une trop grande perte protéique et d'analyser le maximum de produits de réaction. Ce but a été atteint, et pourtant les résultats de cette étude sont négatifs. Selon Ding et al. (Ding et al., 1993), le pourcentage de liaison molaire de la tolmetine glucuronide (TG) à l'HSA serait inférieur à 6% (pour un ratio TG:HSA de 3). Afin de multiplier nos chances de visualiser les peptides dérivatisés par l'AcMPAG, une augmentation importante des quantités d'AcMPAG incubées a été envisagée ; mais c'est en totale opposition avec les quantités restreintes d'AcMPAG dont nous disposions.

Au vu des résultats exposés ci-dessus, nous pouvons dire que les pics que nous avons supposé être spécifiques d'une liaison covalente entre des peptides et l'AcMPAG (malgré une intensité très faible) ne le sont pas puisque les mêmes profils ont été obtenus avec 2 protéines différentes : l'HSA et l'IMPDH.

Malgré une identification positive des UGTs dans les microsomes hépatiques (contrairement aux microsomes intestinaux), la présence d'adduits éventuellement formés entre l'AcMPAG et l'UGT2B7 n'a pas été décelée.

Le naproxène acyl-glucuronide (Iwaki et al., 1995) semblait être un bon candidat pour servir de contrôle positif de notre réaction, mais nous n'avons pas réussi à caractériser des liaisons covalentes entre ce produit et l'HSA.

Plusieurs autres hypothèses peuvent être envisagées, parmi lesquelles l'absence de maîtrise de la réaction de la formation des adduits covalents, ou l'absence de liaison covalente de l'AcMPAG sur les protéines (la solution d'AcMPAG se dégradait puisqu'elle contenait du MPA). Afin de répondre à ces questions, l'utilisation de tolmetine acyl-glucuronide utilisée comme contrôle positif est indispensable, nous aurait permis de recréer les conditions expérimentales de Ding et al. en 1993 pour confirmer ou infirmer leurs résultats. En cas de confirmation de formation d'adduits covalents de la tolmetine acyl-glucuronide sur l'HSA, par la méthode développée au laboratoire (spectrométrie de masse), les résultats avec l'AcMPAG auraient pu quant à eux valider ou non les expériences de co-immunoprécipitation réalisées par l'équipe de Asif (Asif et al., 2007) chez le rat. En effet, la reconnaissance par un anticorps n'est pas une preuve formelle que la liaison identifiée est covalente, ni même de la nature des propriétés pharmacologiques actives, que n'a pas le MPAG.

Chapitre 2. Méthode de phénotypage *in vitro* d'enzymes métaboliques de phase II : les uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférases.

1. Le métabolisme des xénobiotiques.

Le métabolisme correspond à toutes les biotransformations chimiques que la molécule exogène subit par action des enzymes métaboliques présentes dans les différents tissus.

Le foie est l'organe le plus riche en enzymes métaboliques, mais celles-ci sont aussi présentes dans d'autres tissus comme la peau, l'épithélium intestinal, le rein, le poumon et les muqueuses des voies respiratoires.

La finalité des réactions du métabolisme est de rendre le composé exogène plus hydrosoluble, afin de favoriser son élimination par l'organisme (Elias and Mills, 2007). Les métabolites ainsi formés peuvent être des composés toxiques pour le foie ou pour d'autres organes (Boyd, 1981; Ueyama et al., 2007). Les réactions métaboliques sont classées en différentes phases :

- La phase 0 : désigne le passage des molécules exogènes de la circulation sanguine dans les hépatocytes.
- Les réactions de phase I : concernent la transformation directe de la structure chimique du xénobiotique. Les cytochromes P450 (CYP450) sont principalement responsables de ces réactions : oxydations, réductions et réactions d'hydrolyse.
- Les réactions de phase II : consistent en la conjugaison du composé parent ou de ses métabolites. Les uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférases (UGT) font partie de ces enzymes qui catalysent les réactions de conjugaison.
- Les réactions de phase III : correspondent à l'excrétion des métabolites produits dans la bile primaire, le plus souvent par des mécanismes de transport actif.

2. Les modèles biologiques utilisés pour l'étude du métabolisme *in vitro*.

2.1. Les enzymes recombinantes.

Les protéines recombinantes offrent un outil de choix pour étudier le métabolisme. Choisir la bonne méthode d'expression de protéines recombinantes est un point crucial, car il faut tenir compte : de la masse de la protéine, du nombre de ponts disulfures, du type de modifications post-traductionnelles et de la destination finale de la protéine exprimée (Brondyk, 2009).

Le principe d'une méthode d'expression de protéines est d'induire la production d'une protéine d'intérêt dans un système ne l'exprimant pas naturellement. L'introduction de la séquence d'ADN complémentaire du gène codant pour la protéine d'intérêt accompagnée de signaux de transcription dans l'hôte peut s'effectuer de différentes manières (choc thermique, chimique). Son intégration dans le génome de l'hôte induit une lignée dite « stable » (à opposer à une lignée « transitoire »). Les cellules peuvent être utilisées dans l'état afin d'étudier cette protéine ou celle-ci peut être purifiée après production en grande quantité.

Plusieurs types de système d'expression d'enzymes recombinantes ont été décrits, dans des cellules procaryotes et eucaryotes :

- les bactéries (exemple : *Escherichia coli*) ont été les premiers hôtes utilisés pour l'expression de protéines recombinantes. Le système bactérien étant bien connu, leur utilisation est très rapide et usuelle. Cependant, les protéines produites ne possèdent pas les modifications post-traductionnelles, notamment celles présentes chez les eucaryotes (Kollock et al., 2009) ;
- les levures (exemple : *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*) sont les cellules eucaryotes les plus simples à manipuler génétiquement. Les modifications post-traductionnelles eucaryotes sont alors possibles. Elles sont facilement utilisables car leur temps de doublement est court et que la purification des protéines est assez facile (Ikushiro et al., 2004) ;
- les cellules d'insectes, infectées par un baculovirus (Supersomes®) contenant le gène de la protéine d'intérêt sous forme d'ADN complémentaire. Le baculovirus est un virus lytique de 130 kb à ADN double brin circulaire, et le plus communément utilisé se nomme *Autographa californica*. Les deux promoteurs les plus utilisés sont polH et p10 car ils induisent un fort taux d'expression protéique en phase très tardive de l'infection baculovirale (Jarvis, 2009). Ce système est particulièrement adapté pour la production de multi-complexes protéiques (Jarvis, 2009). Il est utilisé régulièrement pour produire des protéines cytoplasmiques ou sécrétées (nécessitant pour ces dernières un peptide signal d'origine insecte ou mammifère). Les cellules d'insectes peuvent générer des ponts disulfures, ainsi que la majorité des modifications post-traductionnelles des cellules de mammifères (Brondyk, 2009) ;
- les cellules de mammifères semblent être le modèle le plus adapté pour l'expression de protéines recombinantes humaines avec des modifications post-traductionnelles complexes. Mais la densité de la biomasse formée est faible. Les lignées peuvent provenir de différents tissus et les transfections peuvent être transitoires ou stables. Les plus communément utilisées sont les lignées humaines : de cellules embryonnaires de rein (HEK) 293 (Court MH et al., 2008), de cellules d'hépatome HepG2 (Wilkening et al., 2003), ou de cellules de lymphoblastes (Crespi et al., 1997).

2.2. Les microsomes.

Les microsomes, vésicules du réticulum endoplasmique (RE), sont préparés par centrifugation différentielle (Picard et al., 2004).

Il est préférable d'étudier les effets d'un nouveau médicament et/ou les éventuelles interactions entre médicaments sur plusieurs échantillons provenant de donneurs différents, et analysés individuellement ou en pool. En supplémentant les microsomes avec les co-substrats adaptés ainsi que d'autres réactifs, il est possible d'étudier individuellement leurs différentes activités enzymatiques, entre autres les CYPs et les UGTs (Kumar et al., 1999). De plus, combiner les co-substrats est réalisable afin d'estimer la clairance de plusieurs composés métabolisés à la fois par les CYPs et les UGTs, malgré la destruction de l'organisation naturelle des éléments intracellulaires (Kilford et al., 2009).

L'utilisation de ce système présente quelques avantages : la facilité de préparation et d'utilisation, la disponibilité commerciale, la bonne conservation des activités enzymatiques à long terme en cryoconservation, la concentration enzymatique et le turnover¹ élevés et pour finir l'optimisation simple des conditions d'incubations. L'inconvénient majeur est la limitation du temps d'incubation car les activités catalytiques diminuent après deux heures d'incubation.

3. Les études métaboliques *in vitro* pour le phénotypage enzymatique.

La réaction de phénotypage est définie par un groupe d'expériences qui ont pour but de définir quelle(s) enzyme(s) est (sont) impliquée(s) dans une voie métabolique donnée. Elle peut aider à caractériser la pharmacocinétique des enzymes, le processus d'élimination des médicaments, les interactions entre médicaments et les interactions entre les médicaments et leurs transporteurs, pouvant induire des effets secondaires (Bjornsson et al., 2003).

Les techniques basiques pour la réaction de phénotypage *in vitro* sont bien définies pour les cytochromes (CYP) (Lahoz et al., 2008), et peuvent être appliquées à l'étude des UGTs. Elles sont séparées en trois approches :

- déterminer des paramètres pharmacocinétiques de l'enzyme humaine recombinante d'intérêt : études de compétence ;
- étudier la réaction métabolique de l'enzyme d'intérêt en présence ou en absence d'un inhibiteur spécifique (chimique ou anticorps) : études d'inhibition ;

¹ Turnover : nombre de moles de substrat transformées par mole d'enzyme et par unité de temps.

- corrélés ces résultats avec un marqueur spécifique de l'activité de cette même enzyme dans les microsomes : analyses de corrélation.

3.1. Les études de compétence.

Les modèles recombinants offrent un système enzymatique individuel pour prédire les paramètres cinétiques d'une réaction : K_M , V_{max} et la clairance d'un médicament pour une isoforme enzymatique donnée (Proctor et al., 2004), l'étude de la capacité d'un médicament à inhiber le métabolisme d'un substrat spécifique d'une isoforme enzymatique ainsi que l'étude des risques d'interactions médicamenteuses (Bjornsson et al., 2003). Ces expériences s'inscrivent entre autres dans un processus de découverte et de développement des médicaments, mais aussi dans la compréhension du métabolisme en général.

Toutefois, en raison de l'absence de voies métaboliques compétitives dans ces systèmes, il est impossible d'obtenir des données sur la contribution relative d'une isoforme enzymatique sur le métabolisme global du médicament *in vivo*. Afin de palier à ce problème, deux méthodes d'extrapolation *in vitro-in vivo* ont été développées : celle du facteur d'activité relative (RAF) (Toide et al., 2004; Venkatakrisnan et al., 2000) et celle du facteur d'extrapolation inter-système (ISEF) (Proctor et al., 2004).

L'approche RAF est fréquemment utilisée pour estimer la contribution relative d'une isoforme enzymatique dans une voie métabolique donnée, en corrigeant les différences d'activité entre enzymes recombinantes et microsomes hépatiques humains (MFH). Le coefficient RAF (exprimé en pmol UGT/mg protéine) d'une isoforme enzymatique (n) est estimé grâce à l'équation suivante :

$$RAF_n = \frac{\text{Activité microsomale pour le substrat spécifique de } n \text{ (pmol / min/ mg prot)}}{\text{Activité de } n \text{ recombinante pour le substrat spécifique (pmol / min/ mg prot)}}$$

Cette méthode fut initialement proposée pour les cytochromes (CYP) P450 (Venkatakrisnan et al., 2000).

L'approche ISEF a été développée pour comparer les activités de CYP recombinants à celles de microsomes hépatiques, en tenant compte de la concentration hépatique de chacune des isoformes (Proctor et al., 2004). L'ISEF (sans dimension) d'une isoforme enzymatique (n) est estimée par la formule suivante :

$$ISEF_n = \frac{\text{Activité microsomale pour le substrat spécifique de } n}{\text{Activité de } n \text{ recombinante pour le substrat spécifique} \times \text{Abondance microsomale de } n \text{ (pmol / mg prot)}}$$

3.2. Les études d'inhibition.

Le but de ces études est d'identifier quel inhibiteur réduit significativement le métabolisme global du produit étudié et ainsi mettre à jour la voie métabolique prédominante de la transformation de ce composé. Pour cela, de nombreuses incubations en présence d'inhibiteurs chimiques et/ou des anticorps sélectifs de voies enzymatiques spécifiques sont nécessaires (Miners et al., 2010). Ces résultats doivent être comparés au métabolisme du produit étudié en l'absence de ces inhibiteurs.

En général, la concentration de substrat (S) utilisée est inférieure ou égale au K_M de l'enzyme étudiée ($[S] \leq K_M$), et celle de l'inhibiteur chimique (I) doit être relativement élevée ($[I]/K_i \geq 10$) afin d'être sûr que l'inhibition soit efficace (Rodrigues, 1999).

L'inhibition chimique constitue un outil de phénotypage simple et peu cher à condition que les inhibiteurs soient disponibles et spécifiques d'une isoforme enzymatique (Rock et al., 2008).

Plusieurs inhibiteurs chimiques ont été identifiés pour les différentes isoformes des CYP (Donato and Castell, 2003). Des anticorps sont également disponibles commercialement pour la plupart des CYP (Shou and Lu, 2009), mais leur utilisation est très peu répandue en raison de leur coût important et de leur intérêt limité par rapport à l'utilisation d'inhibiteurs chimiques (Lu et al., 2003).

En ce qui concerne les UGTs, aucun anticorps spécifique n'a été rapporté. En revanche, quelques inhibiteurs chimiques ont été décrits (Miners et al., 2010).

3.3. Les analyses de corrélation.

Les activités spécifiques de chaque isoforme enzymatique recombinante doivent être déterminées, ainsi que les activités de chacune des isoformes natives dans les microsomes humains, en présence du médicament à étudier. La banque de microsomes doit être constituée d'au moins une dizaine de préparations individuelles (Bjornsson et al., 2003).

Le test de corrélation consiste en la mise en relation des différentes activités enzymatiques précédemment déterminées (enzyme recombinante versus enzyme microsomale). Une corrélation significative démontre l'implication de l'isoforme enzymatique dans le métabolisme du médicament (Miners et al., 2006). Ces résultats confirment le plus souvent ceux obtenus à partir d'autres tests (de compétence et/ou d'inhibition). De plus, une confirmation des résultats peut être établie en corrélant les activités mesurées à la quantification relative par Western-blot du contenu enzymatique des préparations.

4. Les uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférases.

Les uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférases (UGT) chez l'Homme sont distribuées en quatre familles distinctes : UGT1, UGT2, UGT3 et UGT8, qui peuvent être réparties, sur la base de divergences au cours de l'évolution et de similarités de séquence protéique, en cinq sous-familles : UGT1A, UGT2A, UGT2B, UGT3A et UGT8A (Mackenzie et al., 2005). A noter qu'actuellement encore, le comité international de nomenclature recueille et met à jour systématiquement la nomenclature des membres de la superfamille des UGTs et de leurs variants, accessible sur le site : http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/sgc/ugt_alleles/.

L'expression des UGTs est régulée par diverses substances chimiques et hormonales se fixant sur la famille des récepteurs nucléaires (Shelby and Klaassen, 2006). Par conséquent, les membres de cette superfamille d'enzymes ne sont pas exprimés constitutivement dans tous les tissus.

4.1. La structure des UGTs.

Les UGTs constituent une superfamille de glycoprotéines transmembranaires non intégrales, liées au RE de la cellule. Le précurseur est composé d'environ 530 acides aminés (aa), mais la protéine mature ne contient plus que 505 aa. Son domaine luminal est constitué approximativement de 95% du polypeptide et son domaine cytoplasmique de vingt résidus seulement (Radomska-Pandya et al., 2005).

Les UGTs existent sous forme monomérique, mais sont aussi capables d'une homo- ou d'une hétéro-dimérisation (Ghosh et al., 2001). Il a été décrit récemment que les UGTs étaient capables d'interagir avec les cytochromes P450 présents eux aussi dans le RE (Ishii et al., 2010).

L'organisation des UGTs comprend de la région amino-terminale de 286 aa (N-terminale) cytoplasmique à la région carboxy-terminale (C-terminale) luminal (Figure 34) :

- un peptide signal de quelques aa permettant l'intégration de la chaîne polypeptidique dans le RE, est clivé après l'insertion de la protéine dans la membrane, car sa présence n'est pas nécessaire à la protéine active (Ouzzine et al., 1999) ;
- le domaine de fixation du substrat, qui confère à l'UGT son activité catalytique ;
- le domaine de fixation du co-substrat UDP-acide glucuronique de 224 aa ;
- le domaine transmembranaire de 20 à 30 aa responsable de la localisation transmembranaire des UGTs ;
- le signal de rétention de la protéine au RE, qui est cytoplasmique et court en taille.

A l'heure actuelle, seule la structure cristallographique de l'UGT2B7 humaine est disponible à la communauté scientifique (Radomska-Pandya et al., 2010).

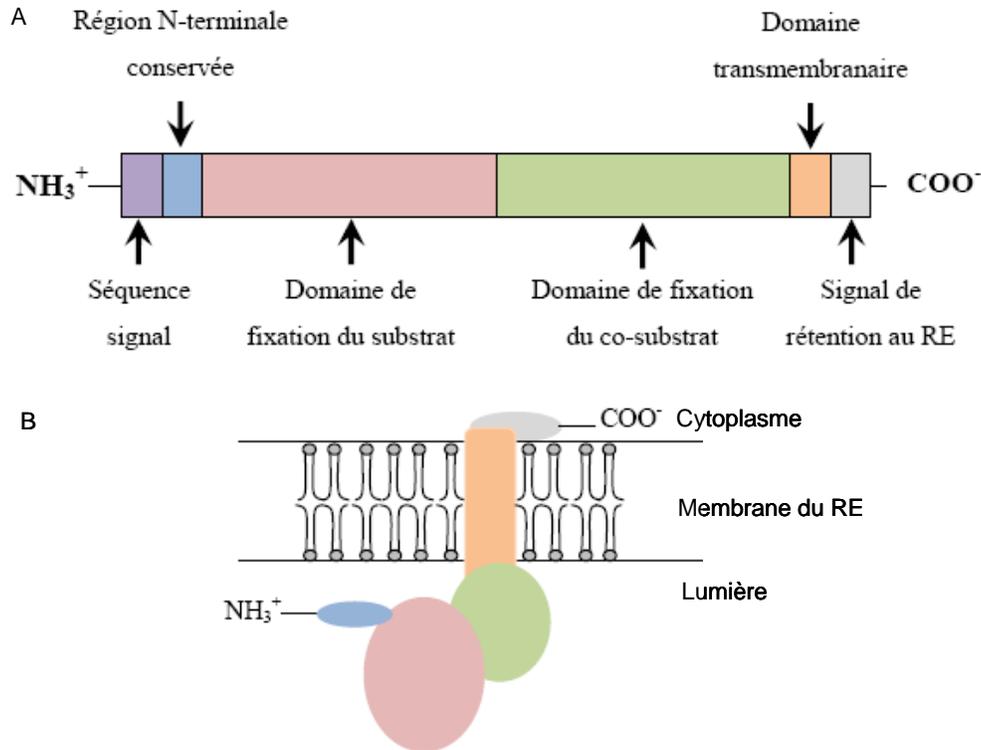


Figure 34. Organisation commune de différents domaines des uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférases (UGTs). (A) Structure primaire des différents domaines fonctionnels des UGTs. (B) Représentation schématique d'une UGT ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE).

4.1.1. La famille 1 des UGTs.

Les membres de la famille 1 utilisent l'acide uridine diphosphate glucuronide comme co-substrat de leur réaction (Mackenzie et al., 2005).

Tous sont codés par un seul gène, qui chez l'Homme se situe en 2q37 locus complexe UGT1A. Il s'étend sur approximativement 200 kb et est composé de cinq exons. Le premier exon est en réalité divisé en treize exons individuels conférant la diversité des isoformes de cette famille (Figure 35). Chaque UGT1A fonctionnelle est le produit de la transcription et de l'épissage alternatif de l'un des treize exons 1 suivi des exons deux à cinq. Des 13 isoformes d'ARNm possibles, neuf conduisent à des polypeptides actifs et fonctionnels (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 et 1A10) et quatre formant des pseudogènes (UGT1A2p, 1A11p, 1A12p et 1A13p) (Gong et al., 2001).

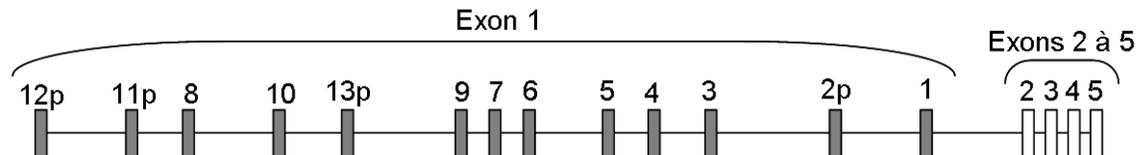


Figure 35. Représentation schématique du locus UGT1 en 2q37 chez l'Homme. Les 13 isoformes de l'exon 1 sont représentés en gris et les exons 2 à 5 en commun sont blancs. Un « p » indique les isoformes donnant naissance à un pseudogène.

Les UGT1A sont exprimées principalement dans le foie (Tukey and Strassburg, 2000), à l'exception des UGT1A5, 1A7, 1A8 et 1A10, qui sont quant à elles exclusivement extra-hépatique (Izukawa et al., 2009; Strassburg et al., 1999).

4.1.2. La famille 2 des UGTs.

Les membres de la famille 2 utilisent également l'acide uridine diphosphate glucuronide comme co-substrat de leur réaction (Mackenzie et al., 2005).

Les membres de la famille 2 sont localisés en 4q13 sur une région longue de 1500 kb (Figure 36). La transcription de ces gènes a lieu sur les deux brins de l'ADN (Owens et al., 2005).

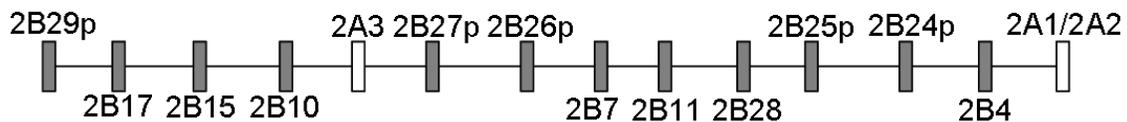


Figure 36. Représentation schématique du locus UGT2 en 4q13 chez l'Homme. Les gènes 2A sont représentés en blanc, tandis que les gènes 2B sont en gris. Un « p » indique les isoformes donnant naissance à un pseudogène.

4.1.2.1. La sous-famille 2A des UGTs.

Trois protéines fonctionnelles sont issues de cette famille : UGT2A1, 2A2 et 2A3. Les enzymes 2A1 et 2A2 sont produites par épissage alternatif de l'exon 1, suivi des exons 2 à 6 communs entre les deux isoformes, comme pour les UGT1A. L'UGT2A3 est quant à elle le produit d'un seul gène composé de 6 exons (Mackenzie et al., 2005).

Les enzymes UGT2A sont principalement trouvées dans les tissus olfactifs (Uchaipichat et al., 2006).

4.1.2.2. La sous-famille 2B des UGTs.

La sous-famille 2B des UGTs compte douze membres (UGT2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17 et 2B28), dont cinq pseudogènes (UGT2B24p, 2B25p, 2B26p, 2B27p

et 2B29p) (Owens et al., 2005). Chacune des enzymes 2B est codée par un gène différent, composé de 6 exons.

Les transcrits de l'UGT2B28 (dérivés de variants protéiques stablement exprimés dans une lignée cellulaire HEK293) ne présentent pas d'activité transférase évidente (Guillemette et al., 2010). Cette isoforme est très peu étudiée, tant sur le plan génétique, cellulaire, que tissulaire.

L'UGT2B7 est l'enzyme de la famille 2B la plus étudiée. Elle a une grande importance pour la détoxification hépatique, mais est également exprimée dans le tractus intestinal, le sein, l'utérus, le rein, le cerveau (Tukey and Strassburg, 2000).

Les autres enzymes 2B sont exprimées principalement dans le foie, mais le sont aussi dans différents tissus extra-hépatiques, variant d'une UGT à l'autre (Turgeon et al., 2001).

4.1.3. La famille 3 des UGTs.

L'UGT3 est la dernière famille de gènes identifiée dans la superfamille des UGTs. Par conséquent, très peu de données sont disponibles, et en particulier le sucre servant de co-substrat à la réaction n'est apparemment pas connu (Mackenzie et al., 2005).

Les gènes UGT3A1 et 3A2 sont situés sur le même chromosome, en position 5p13. Les transcrits matures de ces deux isoformes sont dérivés de sept exons (Meech and Mackenzie, 2010). Les isoformes 3A1 et 3A2 possèdent 78% de similarité dans leur séquence protéique. Même si les différents domaines caractéristiques des UGTs sont conservés, cette famille ne montre qu'une homologie de séquence de 40% avec la famille 1 (Mackenzie et al., 2008).

L'ARNm de l'UGT3A1 a pu être détecté chez l'Homme dans l'estomac, le duodénum, le colon et les testicules, mais pas dans le cœur, les poumons et le cerveau (Mackenzie et al., 2008). La protéine a été identifiée dans des microsomes de foie et de rein par immunoblot. L'investigation concernant l'ARNm de l'UGT3A2 est toujours en cours (Meech and Mackenzie, 2010).

4.1.4. La famille 8 des UGTs.

La famille UGT8 utilise un sucre UDP-galactose comme co-substrat (Mackenzie et al., 2005), car cette famille consiste en un seul gène codant pour une UDP galactose céramide galactosyltransférase (Bosio et al., 1996). Elle est donc impliquée dans la biosynthèse lipidique (Meech and Mackenzie, 2010).

Le gène est composé de cinq exons distribués sur plus de 40 kb, positionné en 4q26 sur les chromosomes humains (Mackenzie et al., 2005).

4.2. La réaction de glucuroconjugaison.

La glucuroconjugaison est la voie principale de détoxification chez tous les vertébrés. La formation de composés glucuronidés est catalysée par les membres de la famille des UGTs, qui utilisent de nombreux endobiotiques (ex : bilirubine) et xénobiotiques (ex : médicaments) comme substrats (Burchell et al., 1995). Ces enzymes représentent ainsi un système de défense extrêmement réactif contre la mutagénicité des carcinogènes chimiques environnementaux et la toxicité des intermédiaires métaboliques d'endobiotiques et de xénobiotiques (Kiang et al., 2005).

Au cours de la réaction de glucuroconjugaison, le groupement glucuronide de l'acide uridine diphosphate glucuronide (UDPGA) (ou co-substrat) est transféré à l'aglycone (ou substrat) sur l'un de ses sites fonctionnels, impliquant le plus souvent un atome d'oxygène, d'azote ou de soufre (Iyanagi, 2007).

En général, les produits glucuroconjugés sont moins réactifs biologiquement et chimiquement que leurs parents aglycones correspondants, devenant ainsi plus polaires donc hydrophiles, permettant leur excrétion (Ritter, 2000). L'ajout d'un glucuronide à une molécule augmente son encombrement stérique. L'affinité de la plupart des composés glucuroconjugés pour leur récepteur spécifique est diminuée (ex : œstradiol glucuronide) (Moffat et al., 2001). Mais il existe un certain nombre d'exceptions : la morphine-6-O-glucuronide est une substance plus analgésique que la morphine (Frances et al., 1992).

5. L'évaluation d'activités enzymatiques humaines de glucuronidation *in vitro* par une approche de cocktail par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Ce travail fait l'objet d'une soumission à publication dans le journal *Drug metabolism and Disposition* (Article 1).

Human glucuronidation enzyme activities evaluated using an *in vitro* approach and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Soumis dans le journal *Drug Metabolism and Disposition*.

**Human glucuronidation enzyme activities evaluated using an
in vitro cocktail approach and liquid chromatography-tandem
mass spectrometry**

Anne-Laure Gagez, Koukeb Rouguieg, François-Ludovic Sauvage, Pierre Marquet and
Nicolas Picard.

INSERM, UMR S-850, Limoges, F-87025, France (A-L.G., K.R., F-L.S., P.M., N.P.)

Univ Limoges, Limoges, F-87025, France (A-L.G., K.R., P.M., N.P.)

CHU Limoges, Hôpital Dupuytren, Service de Pharmacologie-Toxicologie et de
Pharmacovigilance, Limoges, F-87042, France. (F-L.S., P.M., N.P.)

A-L.G. and K.R. contributed equally to this work.

Chapitre 3. Dosage de l'activité de la calcineurine par spectrométrie de masse.

1. La calcineurine.

1.1. La structure de la calcineurine.

La calcineurine (CaN) est un membre de la famille protéique des sérine/thréonine phosphatases (PP), composée de quatre membres : PP1, PP2A, PP2B (ou CaN) et PP2C. La CaN est la seule phosphatase connue activée par le calcium et la calmoduline (CaM) (Shibasaki et al., 2002).

Cette protéine hétérodimérique est composée d'une sous-unité catalytique (CaNA) et d'une sous-unité régulatrice (CaNB) (Guerini, 1997). La CaNA (58-64 kDa) est divisée en cinq domaines différents (Figure 36) :

- la région N-terminale joue peut-être un rôle dans la modulation de l'activité catalytique de l'enzyme et interagit avec la CaNB ;
- le centre catalytique d'environ 350 aa se lie à deux ions métalliques (zinc et fer) ; il possède une forte similarité de séquence protéique avec les autres protéines phosphatases ;
- le domaine d'interaction de la CaNB ;
- le domaine d'interaction de la calmoduline ;
- le domaine d'interaction avec des molécules inhibitrices.

Trois isoformes de CaNA ont été identifiées chez les mammifères : α , β et γ dont les séquences en aa ont très conservées au cours de l'évolution (Shibasaki et al., 2002). La CaNB, polypeptide de 168 aa, appartient à la famille protéique à domaine(s) EF-hand. Elle comporte quatre sites accepteurs de calcium, chacun ne fixant qu'un seul ion Ca^{2+} (Figure 37). La calmoduline (CaM) fait partie de la famille des CaNB.

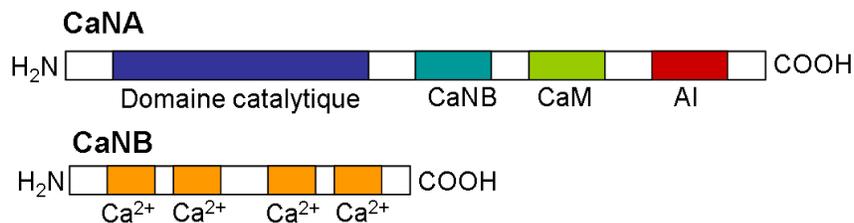


Figure 37. Les domaines structuraux de la calcineurine. La sous-unité catalytique (CaNA) est composée de : CaNB, le domaine de liaison de la sous-unité régulatrice ; CaM, le domaine de liaison de la calmoduline ; AI, le domaine de liaison de molécules inhibitrices. La sous-unité régulatrice (CaNB) contient quatre sites de liaison du calcium (Ca^{2+}).

1.2. Le rôle physiologique de la calcineurine.

La famille des sérine/thréonine phosphatases joue de nombreux rôles dans la signalisation intracellulaire (Barford, 1996).

L'augmentation intracellulaire du calcium permet l'association des deux sous-unités de la CaN, qui en présence du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, devient active grâce à un changement de conformation. La déphosphorylation de protéines peut commencer, initiant ainsi la signalisation intracellulaire (Mondragon et al., 1997).

Plusieurs substrats, impliqués dans des voies de signalisation différentes sont déphosphorylés par la calcineurine. Ils sont potentiellement des substrats physiologiques dont les caractéristiques cinétiques peuvent être déterminées, comme la dynamine (une GTPase impliquée dans l'endocytose), le facteur de transcription Elk-1, la protéine de choc thermique hsp25 et le facteur tau (Shibasaki et al., 2002).

La calcineurine a un rôle crucial dans la cascade de signalisation du calcium pour activer les lymphocytes T. L'augmentation de la concentration calcique dans les LT provoquée par la présentation de l'antigène au LT active la CaN, qui peut alors déphosphoryler le NFATp. Ce dernier étant déphosphorylé, va migrer dans le noyau et, avec l'aide d'autres facteurs de transcription, provoquer la transcription de gènes de cytokines comme l'interleukine-2 et l'interféron- γ (Barford, 1996).

Plusieurs inhibiteurs de la CaN ont été isolés. Ils sont d'origine naturelle (parmi les plus connus : les immunosuppresseurs : cyclosporine et tacrolimus, nécessitant la formation préalable d'un complexe avec les molécules respectives cyclophiline et FKBP (Yano, 2008) et l'acide okadaïque) ou synthétiques (différents dérivés de l'endothall (Rusnak and Mertz, 2000), peptide de synthèse basé sur la séquence du domaine auto-inhibiteur de la CaNA (Hashimoto et al., 1990)).

1.3. La distribution tissulaire de la calcineurine.

La calcineurine est largement distribuée dans divers tissus de mammifères, mais sa concentration dans le cerveau est dix à vingt fois supérieure à celle mesurée dans les autres tissus (Ingebritsen et al., 1983; Rusnak and Mertz, 2000). Dans le cerveau, 50 à 70% de la CaN sont liés à la membrane ou à des éléments du cytosquelette (Shibasaki et al., 2002).

Les isoformes CaNA α et β sont réparties ubiquitairement tandis que la CaNA γ est spécifiquement exprimée dans les testicules, suggérant ainsi qu'elle joue un rôle dans la transduction du signal durant la spermatogénèse (Muramatsu and Kincaid, 1992). Malgré tout, il a été trouvé que la CaNA α était plus abondante que la CaNA β dans le cerveau et le cœur de rat. Cette abondance relative est inversée dans la rate, le thymus et les lymphocytes (Rusnak and Mertz, 2000).

Deux isoformes de la CaNB ont été rapportées chez les mammifères, CaNB1 et CaNB2, qui ont été trouvées associées à la CaNA. CaNB1 est exprimée de façon ubiquitaire et forme un hétérodimère avec CaNA α ou β , alors que CaNB2 est retrouvée seulement dans les testicules et se lie à la CaNA γ (Shibasaki et al., 2002).

2. Les techniques de dosage de l'activité de la calcineurine.

2.1. Les méthodes radioactives de dosage de l'activité de la calcineurine.

Malgré les contraintes importantes, la radioactivité est une technique de détection efficace pour déterminer et quantifier une activité enzymatique.

La calcineurine (pure ou dans un lysat cellulaire la contenant) est mise en contact avec un peptide de synthèse phosphorylé de 19 aa, nommé RII phosphorylé (RII-P) ayant pour séquence DLDVPIPGRFDRRVpSVAAE, dérivé de la sous-unité 2 régulatrice de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), et radiomarké au phosphore 32 (γ - ^{32}P). La réaction phosphatase est supplémentée en cofacteurs (ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^{-} ...), DL-Dithiothréitol). D'autres peptides peuvent également être utilisés comme substrats (Donella-Deana et al., 1994). Après incubation du mélange et déphosphorylation du peptide, la réaction est stoppée par ajout d'acide trichloroacétique. Le ^{32}P libre est séparé du peptide RII- ^{32}P par précipitation des protéines, afin d'être analysé dans des fioles à scintillations.

Afin de déterminer l'activité spécifique de la calcineurine (PP2B), les réactions (utilisant le RII- ^{32}P) sont effectuées en présence d'acide okadaïque, un inhibiteur spécifique des formes PP1 et PP2A. De plus, afin de s'affranchir de l'activité de la PP2C, non dépendante du calcium, la réaction en présence d'acide éthylènediaminetétraacétique (EGTA) est soustraite à la réaction réalisée en présence de calcium (et de calmoduline) (Fruman et al., 1996).

Etant donné que le radiomarquage est un outil fiable et sensible, l'étude de spécificité, d'inhibition de substrat et d'interaction protéique est réalisable. En effet, la calcineurine est la cible de complexes médicament-immunophiline et en particulier celle du complexe cyclophiline B-cyclosporine (Swanson et al., 1992). D'autres équipes s'intéressent aux différentes sous-unités formant la calcineurine : la CnB a un potentiel oncogénique (Wang et al., 2008) ; ou aux isoformes de la calcineurine qui montrent des distinctions de spécificité de substrats (Kilka et al., 2009). Des études d'inhibition ont permis de déterminer un inhibiteur réversible de la calcineurine, le gossypol polyphénolique aldéhyde, ne nécessitant pas de liaison au préalable avec une molécule chaperonne (Baumgrass et al., 2001).

2.2. Les méthodes non-radioactives de dosage de l'activité de la calcineurine.

Récemment, des méthodes non-radioactives de dosage de l'activité de la calcineurine ont été développées, évitant ainsi les inconvénients de l'utilisation émanant de la manipulation de la radioactivité. Différentes approches ont été envisagées. La première a pour objectif de déterminer la quantité de substrat restant et de produit formé après la réaction (Gong et al., 1996). La seconde consiste à s'intéresser au phosphate inorganique libéré suite à la réaction de phosphatase de l'enzyme (Sellar et al., 2006; van Rossum et al., 2008). La troisième méthode est la détection par HPLC-UV du peptide RII déphosphorylé (Blanchet et al., 2003; Sanquer et al., 2004). La quatrième approche est la recherche par fluorescence de ce même peptide RII déphosphorylé (Roberts et al., 2008).

Afin de déterminer l'activité spécifique de la calcineurine (PP2B), la même méthode que pour le RII-³²P est utilisée (et différentes incubations, en présence de Ca²⁺, d'EGTA ou d'acide okadaïque, et soustraction d'activités).

2.2.1. Détection par immunoblots.

Afin de confirmer indirectement que la protéine τ était substrat de la calcineurine et de déterminer l'activité de cette dernière, Gong et al. ont estimé par immunoblots et densitométrie ($\lambda = 535$ nm) la quantité de substrat et la quantité de produit formé après la réaction. Ils ont montré aussi que certains neuroleptiques (trifluopérazine, chlorpromazine, halopéridol et clozapine), avaient des constantes d'inhibition différentes sur la calcineurine (Gong et al., 1996).

Ces mesures semi-quantitatives de substrat et de produit formé ne permettent pas d'affirmer réellement la spécificité de l'activité de la calcineurine.

2.2.2. Détection du phosphate inorganique non radiomarké.

La calcineurine (pure ou dans un lysat cellulaire) est mise en contact avec un peptide phosphorylé de 19 aa, nommé RII phosphorylé (RII-P) ayant pour séquence DLDVPIPGRFDRRVpSVAAE, supplémenté en cofacteurs de la réaction phosphatase (ions Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻...), DL-Dithiothréitol). Après incubation du mélange et déphosphorylation du peptide, la réaction est stoppée par ajout du réactif vert de Malachite. Ce dernier à température ambiante réagit avec les phosphates libérés dans le milieu, développant une couleur détectable à 260 nm, qui est quantifiée grâce à une courbe standard de phosphate.

Cette technique a été principalement développée sur des extraits lymphocytaires provenant de patients transplantés. Sellar et al. ont montré que : l'activité de la calcineurine dans les lysats lymphocytaires pouvait être conservée jusqu'à 21 jours à

-80°C en présence d'acide ascorbique (Sellar et al., 2006), les immunosuppresseurs cyclosporine et tacrolimus avaient bien des effets inhibiteurs directs sur l'activité de la calcineurine, *in vitro* et *in vivo* (van Rossum et al., 2008).

En revanche, la mesure du phosphate comme témoin d'une activité peut être discutée car la cellule effectue en permanence des réactions de phosphorylation et déphosphorylation. C'est pourquoi, il est plus intéressant de quantifier un composé spécifique de l'activité enzymatique souhaitée.

2.2.3. Détection du peptide RII non phosphorylé par HPLC-UV.

La réaction de déphosphorylation est identique à celle décrite précédemment, mais c'est le peptide RII déphosphorylé (RII) qui est détecté dans les UV à 205 nm suite à une étape de séparation par chromatographie liquide.

La stabilité de l'activité de la calcineurine dans des échantillons sanguins et dans des extraits lymphocytaires a été étudiée avec cette méthode : elle est de 24h à température ambiante et de 48h à -20°C, respectivement. La stabilité étant définie par une perte maximale de 20% de l'activité initiale mesurée (Blanchet et al., 2003). Une étude a présenté une activité de la calcineurine dans les LT significativement moindre chez des personnes atteintes de cirrhose due à l'alcool, ainsi que chez les patients présentant un hépatocarcinome (Blanchet et al., 2009). Une corrélation entre l'activité de la calcineurine et la prédiction d'une réaction du greffon contre l'hôte de grade II ou plus a été trouvée chez des personnes ayant subi une transplantation de cellules souches (Sanquer et al., 2004).

2.2.4. Détection du peptide RII déphosphorylé en fluorescence.

Le développement d'une méthode fluorimétrique nécessite de marquer le peptide RII-P par une étiquette fluorescente en N-terminal. Un lysat cellulaire obtenu à partir de culture primaire de fibroblastes de reins de souris est incubé comme décrit précédemment en présence du RII-P fluorescent. La réaction est alors transférée dans des puits contenant de la résine TiO₄ permettant de fixer les peptides phosphorylés. Le surnageant est récupéré et analysé par fluorimétrie ($\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 528 \text{ nm}$) (Roberts et al., 2008).

Cette technique a été utilisée pour mesurer l'activité calcineurine sur enzyme recombinante, ainsi qu'en présence de divers agents chimiques. Enfin une étude *in vivo* chez la souris traitée à la cyclosporine a montré que la calcineurine était sept fois plus active dans le foie que dans les muscles.

3. Travail personnel : mise au point d'une méthode de dosage de l'activité calcineurine par LC-MS/MS.

3.1. Introduction.

Comme décrit plus haut, les premières méthodes de dosage de l'activité de la calcineurine ont été développées en utilisant principalement la radioactivité (Blumenthal et al., 1986; Fruman et al., 1996; Swanson et al., 1992), mais celle-ci apporte un certain nombre de contraintes (sécurité et agrément des locaux, appareillage spécifique et personnel abilité). De nouvelles techniques de dosage dites « froides » ont vu le jour ces dernières années, mais aucune méthode publiée à ce jour à notre connaissance n'a utilisé la spectrométrie de masse en tandem. Cette technique est rapide, et généralement plus sensible que les autres méthodes de détections chromatographiques, mais également plus onéreuse. Néanmoins, elle est de plus en plus utilisées dans les laboratoires de pharmacologie, pour le dosage des médicaments (Saint-Marcoux et al., 2007) ou les études de métabolisme par exemple (Picard et al., 2005a). Le but de notre étude était de mettre au point une nouvelle technique de dosage de la calcineurine, basée sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, afin d'augmenter la sensibilité de détection du peptide déphosphorylé, de façon à pouvoir secondairement mesurer précisément l'activité calcineurine résiduelle en présence de médicaments inhibiteurs (cyclosporine ou tacrolimus), *in vitro* et/ou *in vivo*.

3.2. Matériel et méthodes.

3.2.1. Produits chimiques et réactifs.

Le NaCl, le Tris-HCl pH7.5, le MgCl₂, le DL-Dithiothréitol (DTT), l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA), la calmoduline de cerveau bovin, la calcineurine de cerveau bovin (C1907), le peptide [Glu¹]-Fibrinopeptide B humain (GluFib, F3261, séquence : QGVNDNEEGFFSAR) et un fragment auto-inhibiteur de la calcineurine (C3937, séquence : ITSFEAKGLDRINERMPPRRDAMP) ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Les peptides RII et RII phosphorylé (RII-P) synthétisés par Millegen (Labège, France) ont pour séquence respective : DLDVPIPGRFDRRVSVAAE (pureté >90%) et DLDVPIPGRFDRRVpSVAAE (pureté >90%).

3.2.2. Cinétique enzymatique.

Les cinétiques enzymatiques sont réalisées en co-incubant 5 min à 30°C : 2 µmoles de NaCl, 1 µmole de TrisHCl pH7,5, 120 nmol de MgCl₂, 10 nmol de CaCl₂, 10 nmol de DTT, 5 pmol de calmoduline de cerveau bovin et 0,5 U de calcineurine de cerveau bovin. Différentes quantités (2 nmol, 3.75 nmol, 4,5 nmol, 5,5 nmol, 6,5 nmol et

7,5 nmol) du peptide RII-P sont ajoutées au mélange précédent et incubées à 30°C. A des temps prédéfinis (0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min, 60 min, 90 min et 120 min), 2 µL de chaque mix sont prélevés et dilués au 1/10^e, puis additionnés de 50 nmol d'EDTA (pour arrêter la réaction) et 99 fmol de GluFib (étalon interne de la chromatographie).

3.2.3. Etude d'inhibition de la calcineurine.

Sont co-incubés pendant 5 min à 37°C : 2 µmoles de NaCl, 1 µmole de TrisHCl pH7,5, 120 nmol de MgCl₂, 10 nmoles de CaCl₂, 10 nmoles de DTT, 5 pmoles de calmoduline de cerveau bovin et 0,5 U de calcineurine de cerveau bovin en présence ou en absence de 107 pmoles de peptide auto-inhibiteur (AI) (quantité maximale compte-tenu de la concentration de la solution). 10 nmoles de RII-P sont ajoutés au mélange précédent et incubés à 37°C pendant 1 h. La réaction est arrêtée par 50 nmoles d'EDTA et 99 fmoles de GluFib servant d'étalon interne pour la chromatographie.

3.2.4. Méthode LC-MS/MS.

Le système chromatographique est composé d'une pompe binaire (Shimadzu LC-20AD) et d'un passeur d'échantillon (Shimadzu SIL-20AC) équipé d'une boucle d'injection de 100 µL. Les échantillons sont maintenus dans le passeur à +4°C avant l'injection. La séparation est réalisée grâce à une colonne Atlantis T3 de Waters (150 × 2,1 mm, 5µm de taille particulaire) en 20 min. La phase mobile (débit : 200 µL/min) consiste en une solution A (0,1% d'acide formique dans de l'eau pure pour HPLC) et une solution B (0,1% d'acide formique dans le méthanol) qui forment le gradient suivant : 0-2 min (10% B) ; 2-4 min (30% B) ; 4-14 min (90% B) ; 14-16 min (90% B) ; 16-16.5 min (10% B) ; 16.5-20 min (10% B). La colonne est maintenue à 25°C.

La détection et la quantification du peptide RII phosphorylé restant et du RII déphosphorylé est effectuée en utilisant un spectromètre de masse 4000 QTrap d'Applied Biosystems, équipé d'une source ion-spray Turbo V. L'ionisation est réalisée en mode positif et l'acquisition en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) en utilisant trois transitions par composé. Les temps de rétention et les transitions MRM des différents composés sont donnés dans le tableau 10. L'ensemble du système est contrôlé par le logiciel Analyst® 1.5. Un exemple de chromatogramme est présenté en figure 38.

Tableau 10. Conditions LC-MS/MS pour les trois peptides : RII, RII phosphorylé et GluFib.

Peptide	Charge	Transition 1 (m/z)	Transition 2 (m/z)	Transition 3 (m/z)	Temps de rétention (min)
RII-P	3+	731.7→344.2	731.7→229.2	731.7→201.2	12.4
RII	3+	705.1→344.2	705.1→229.2	705.1→201.2	11.9
GluFib	2+	785.9→813.3	785.9→480.2	785.9→333.0	11.5

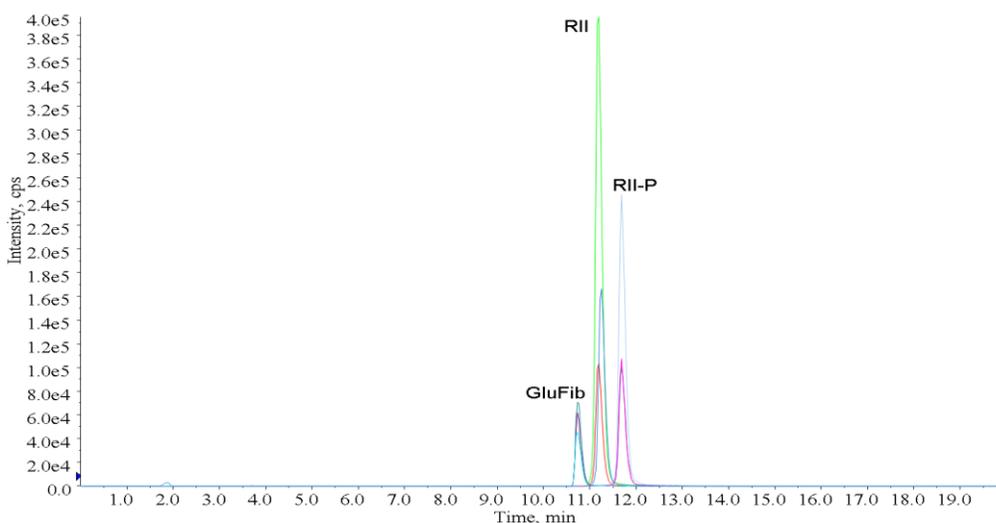


Figure 38. Chromatogramme LC-MS/MS des peptides RII, RII phosphorylé et GluFib (MRM en mode positif).

3.2.5. Courbes de calibration.

Les solutions mères des peptides sont préparées dans l'eau ultrapure et conservées à -20°C, comme préconisé par le fournisseur. Une gamme de calibrateurs du peptide RII à 0 µM, 4.74 µM, 9.47 µM, 18.40 µM, 28.42 µM, 47.36 µM, 94.72 µM et 189.44 µM a été réalisée par dilutions en cascade. Après avoir été vortexés, 50 µL de chaque calibrateur sont transférés dans des vials pour HPLC contenant 19.8 fmoles/µL de GluFib, utilisé comme étalon interne.

3.3. Résultats.

3.3.1. Cinétique enzymatique.

La Figure 39 présente la moyenne des cinétiques effectuées en duplicata pour chaque concentration de RII-P, dont a été soustrait le bruit de fond correspondant à la déphosphorylation naturelle du peptide (cinétique en absence de calcium).

Grâce à une représentation de Lineweaver et Burk, les constantes cinétiques de la calcineurine de cerveau bovin ont été déterminées : $K_M = 34.7 \mu\text{M} \pm 2.8 \mu\text{M}$ et $V_{\text{max}} = 20.8 \text{ nmoles/min/mg protéines} \pm 2.6 \text{ nmoles/min/mg protéines}$.

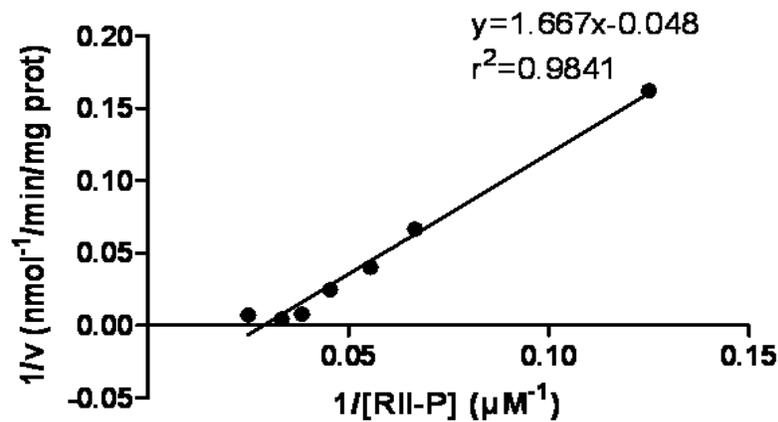


Figure 39. Cinétique enzymatique de la calcineurine pure de cerveau bovin. Représentation de Lineweaver et Burk afin de déterminer les constantes cinétiques : $K_M = 34.7 \mu\text{M}$ et $V_{\text{max}} = 20.8 \text{ nmoles/min/mg protéines}$ ($n = 2$).

3.3.2. Etude d'inhibition de la calcineurine.

La figure 40 confirme que l'activation de la calcineurine est dépendante du calcium. De plus, cette activité calcium dépendante est inhibée de 70% en présence de 107 pmol du fragment auto-inhibiteur (AI).

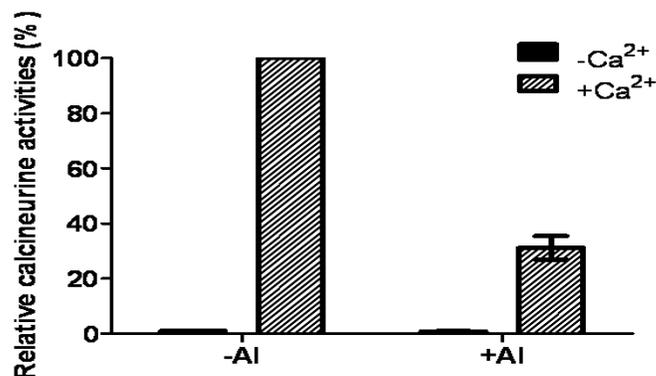


Figure 40. Activité relative de la calcineurine pure de cerveau bovin. Contribution de l'apport en calcium (Ca^{2+}) et inhibition de l'activité phosphatase par un peptide auto-inhibiteur (AI). Les barres représentent les déviations standard ($n = 2$).

3.4. Discussion.

Ces résultats préliminaires indiquent que la technique de spectrométrie de masse en tandem peut être appliquée à la détermination de l'activité de la calcineurine *in vitro*. Cette méthode alternative à l'utilisation de la radioactivité est quantitative, mais une validation de la gamme de RII-NP reste à faire. De plus aucune extraction de l'échantillon n'est nécessaire avant l'analyse. Des expériences complémentaires sont à effectuer concernant la stabilité des produits détectés, la détermination de la limite de détection/quantification du RII-NP, et la validation de la gamme d'étalonnage.

Les constantes cinétiques de la réaction de la calcineurine extraite de cerveau bovin ont été déterminées avec succès : $K_M = 34.7 \mu\text{M}$ et $V_{\text{max}} = 20.8 \text{ nmoles/min/mg}$ protéines. Le K_M que nous trouvons est en accord avec la littérature ($K_M = 26 \mu\text{M}$) ; en revanche, la V_{max} est cent fois inférieure à ce qui a été décrit ($V_{\text{max}} = 1.7 \mu\text{moles/min/mg}$ protéines) (Blumenthal et al., 1986). Cette différence peut être due à l'origine des produits utilisés (calcineurine, calmoduline) utilisés, associée à la technique de mesure de l'activité de la calcineurine.

L'inhibition de l'activité de la calcineurine en présence de calcium est bien induite par le fragment auto-inhibiteur (AI). 107 pmol de AI suffisent à provoquer une diminution de 70% de son activité. Ces résultats ne sont pas en désaccord avec la littérature puisque les IC_{50} de ce même peptide diffèrent selon le substrat utilisé : $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ pour 2.8 μM de la chaîne légère de la myosine ; $IC_{50} = 40 \mu\text{M}$ pour 50 mM de p-nitrophénylphosphate.

Afin de confirmer ces résultats, d'autres expériences sur la calcineurine pure sont nécessaires, et en particulier : l'inactivation enzymatique par chauffage et par un agent inhibiteur autre que le peptide AI, tel que la trifluopérazine. Ensuite, avant de doser l'activité de la calcineurine dans des lymphocytes de patients, une mise au point sur des extraits cellulaires est indispensable pour laquelle deux incubations seront nécessaires : (i) en présence d'acide okadaïque (inhibiteur de la PP1 et PP2A) et de calcium (activités de la PP2B et PP2C), et (ii) d'EGTA (activité de la PP2C). L'activité de la calcineurine sera calculée en soustrayant l'activité obtenue en (ii) à celle déterminée en (i). De plus, il faudra s'assurer que les transitions suivies (lors de la méthode d'analyse) correspondant aux peptides RII et RII-P soient bien spécifiques des molécules dans un milieu biologique complexe. Cette vérification a déjà été réalisée informatiquement grâce au site internet UniProt (<http://www.uniprot.org>) où seules trois protéines sont identifiées (Q9BUB1, A8KAH7 et P13861), correspondant à une protéine kinase de type II dépendant de l'cAMP, avec chacune un score de 103, avec une taxonomie focalisée sur l'Homme (*Homo sapiens*). Le pourcentage d'identification entre le peptide et les protéines trouvées est de 73%. Ces résultats sont encourageant quant à la spécificité de la méthode pour les peptides choisis, mais ils doivent être confirmés par des expériences *in vitro*.

Chapitre 4. La recherche de biomarqueurs urinaires : approches protéomiques et peptidomiques.

1. Diagnostic et prédiction exacte dans la gestion de maladies.

Le développement d'un outil de diagnostic spécifique d'une maladie donnée s'avère important pour le milieu médical.

Pour l'identification d'un biomarqueur potentiel, il est nécessaire de rappeler un certain nombre de définitions concernant les performances de(s) test(s) clinique(s) et/ou biologique(s) quantitatif(s), utilisé(s) dans la discrimination d'au moins deux groupes de patients.

La **sensibilité (Se)** est la mesure de la capacité du test à identifier une condition quand elle est présente. C'est la proportion de vrais positifs (VP) qui est détectée par le test comme ayant la « maladie » [$Se = VP/(VP+FN)$]. Les faux négatifs sont les patients ayant la « maladie » mais non détectés par le test. Une forte sensibilité est préférée dans un screening, car il est plus facile d'écartier les patients n'ayant pas la maladie (Tableau 11) (Soreide, 2009).

La **spécificité (Sp)** est la capacité du test d'exclure une condition quand elle est absente. C'est la proportion de vrais négatifs (VN) qui est détectée par le test comme n'ayant pas la « maladie » [$Sp = VN/(VN+FP)$]. Les faux positifs sont les patients n'ayant pas la « maladie », mais détectés par le test comme étant positifs. (Tableau 11) (Soreide, 2009).

Un test parfait serait celui qui posséderait 100% de sensibilité ($FN = 0$) ainsi que 100% de spécificité ($FP = 0$) (Figure 41). Chaque patient serait alors effectivement attribué au bon groupe de diagnostic. La principale limite de cette méthode est de définir correctement le seuil de séparation des deux groupes définis. Un biais est introduit quand le seuil est fixé à un niveau non approprié (Linden, 2006).

La valeur prédictive d'un test ne dépend pas seulement de la sensibilité et de la spécificité du test, mais également de la **prévalence** de la maladie dans la population étudiée. La prévalence est définie comme la fréquence de la maladie dans la population.

La **valeur prédictive positive (VPP)**, ou probabilité post-test d'avoir un test positif, est la mesure de la probabilité d'avoir des vrais positifs dans la population diagnostiquée comme positive par le test [$VPP = VP/(VP+FP)$] (Tableau 11) (LaBaer, 2005).

La **valeur prédictive négative (VPN)**, ou probabilité post-test d'avoir un test négatif, est la mesure de la probabilité d'avoir des vrais négatifs dans la population diagnostiquée comme négative par le modèle [$VPN = VN/(VN+FN)$] (Tableau 11) (Soreide, 2009).

La **précision** donne la proportion de tous les tests qui donne les bons résultats (vrais positifs et vrais négatifs). L'évaluation d'une procédure de diagnostic mesure son habilité à catégoriser les patients avec exactitude dans l'un ou l'autre des groupes, sain ou malade.

Tableau 11. Evaluation de l'exactitude d'un modèle prédictif de la présence ou de l'absence d'un diagnostic. Vrai positif (VP), faux positif (FP), vrai négatif (VN), faux négatif (FN).

Prédiction du modèle	Diagnostic	
	Positif	Négatif
Positif	VP	FP
Négatif	FN	VN

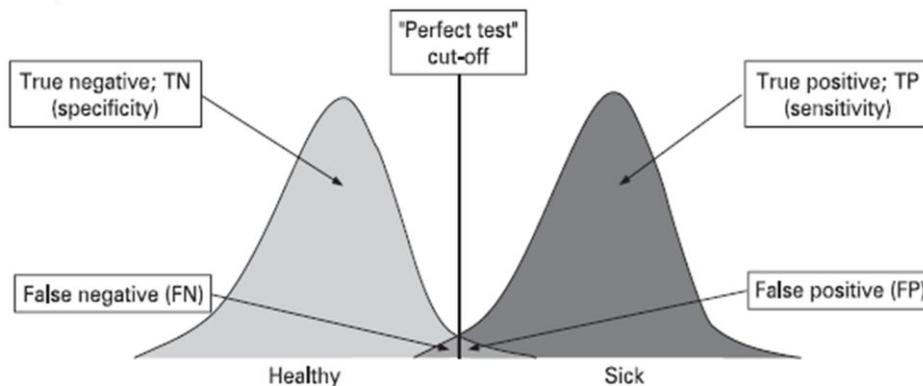


Figure 41. Modèle de discrimination correct avec distinction entre les états sains et malades (Soreide, 2009).

L'introduction de l'analyse caractéristique opérateur-receveur (ROC) d'un test diagnostique dans le domaine médical provient de la radiologie, où elle a été utilisée pour tester l'habileté d'un observateur à discriminer entre des patients sains et malades. L'efficacité du test diagnostique radiologique a été comparée à d'autres tests couramment utilisés (MacMahon et al., 1986). Puis, les courbes ROC ont été adaptées dans divers domaines médicaux afin d'évaluer l'efficacité d'un test à permettre de classifier correctement des patients dans l'un ou l'autre des groupes cliniques formés (patient malade/sain, cancer agressif/bénin ...). La précision du diagnostic réside dans la qualité des informations données permettant cette classification (biomarqueur définissant ainsi la limite entre les deux groupes) (Soreide, 2009).

Les courbes de ROC sont représentées graphiquement en traçant le taux de vrais positifs (sensibilité) en fonction du taux de faux positifs (1-spécificité). Plus la courbe ainsi formée est proche de l'axe des ordonnées, et plus le modèle est précis. Au contraire,

plus la courbe se rapproche de la diagonale à 45° du graphique de ROC, moins le modèle est précis (Figure 42) (Zweig and Campbell, 1993).

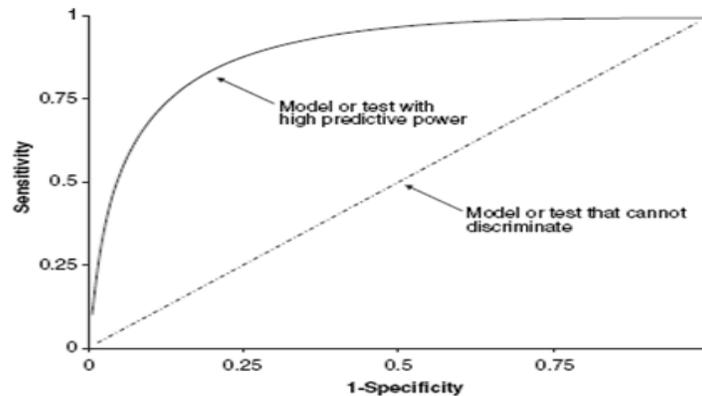


Figure 42. Courbes de ROC hypothétiques. Fort pouvoir discriminant (trait plein) ou non (trait en pointillé) (Linden, 2006).

2. Protéomique et biomarqueurs : définitions.

Les sciences «-omiques» (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique ...) visent d'une part, à identifier en totalité les différents constituants de l'être vivant, et d'autre part, à mesurer et à comprendre leurs variations sous l'influence de modifications physiopathologiques et environnementales.

Le génome humain étant maintenant connu dans sa séquence nucléotidique, l'identification de ces 22 000 gènes environ permet d'envisager des méthodes d'analyse globale au sein d'un échantillon biologique normal ou pathologique. Les recherches de mutations, de délétions, de polymorphismes et de signatures d'expression des gènes (par puces à ADN dans les tumeurs par exemple) sont maintenant réalisables. Cependant, de nombreux processus physiopathologiques ne se traduisent pas par la perturbation de la transcription et/ou de la traduction (Rai and Chan, 2004). C'est pourquoi, la protéomique, qui consiste à étudier la composition et l'abondance des protéines, peut être considérée comme un moyen plus direct d'observer les variations phénotypiques, aboutissant à un « catalogue des protéines » avec la détermination de leurs fonctions biologiques, mais aussi à leur quantification.

La peptidomique, déclinaison de la protéomique, s'intéresse aux peptides, séquences d'acides aminés de taille inférieure à celle des protéines.

Le terme « biomarqueur » désigne tout indicateur biochimique (protéine, peptide, métabolite ...) ou signal moléculaire quantifiable, présent dans un organisme vivant dans un état physiopathologique donné et spécifique de cet état. Cet indicateur pris comme modèle (la glycémie est un bon exemple) est utilisé à des fins de diagnostic et/ou de pronostic pour certaines pathologies (Biomarkers definitions working group, 2001). Les

biomarqueurs peuvent être catégorisés, et les principales catégories sont les biomarqueurs d'exposition, biomarqueurs de susceptibilité et biomarqueurs de réponse (Amacher, 2010). Actuellement, la médecine utilise des constantes biologiques ou physiologiques (glycémie, contenu du sang en oxygène ...) comme biomarqueurs. Ces éléments abondants (et régulés) permettent la détection et le suivi des désordres physiopathologiques « simples », de façon non spécifique. Pour des maladies plus complexes ou pour des mécanismes physiopathologiques mal connus (comme le diabète, les cancers, ou le rejet du greffon en transplantation...), ou pour détecter les processus pathologiques plus tôt ou de manière moins invasive, il est nécessaire de découvrir de « nouveaux biomarqueurs ».

Les vingt dernières années ont vu émerger quelques molécules considérées comme biomarqueurs, notamment en oncologie. C'est le cas pour la leucémie myéloïde chronique, causée par une translocation d'une partie des chromosomes 9 et 22 provoquant la formation d'une nouvelle protéine de fusion BCR-ABL (Burke and Carroll, 2010). Chez certaines patientes atteintes de cancer du sein, le gène *HER2* dupliqué en de nombreuses copies est de mauvais pronostic (Alvarez et al., 2010). Il est rare de trouver des anomalies aussi spécifique d'une maladie, car dans la plupart des cas, c'est un profil (ou pattern) de plusieurs biomarqueurs altérés qui permet de distinguer un état physiologique d'un état pathologique (Rai and Chan, 2004).

3. La recherche de biomarqueurs : définitions et concepts.

Les éléments ou les variables quantitatives directement ou indirectement impliqué(e)s dans l'origine de la physiopathologie sont considérés comme des biomarqueurs potentiels. L'origine de ces derniers est supposée être liée aux changements biologiques majeurs survenant au cours d'une pathologie donnée (dérégulation(s) de facteurs de transcription, modification(s) du métabolisme...). Ces changements se traduisent en effet par des variations quantitatives et/ou qualitatives du protéome.

Deux types de biomarqueurs peuvent donc être distingués : les biomarqueurs liés directement à la cause de la pathologie (par exemple, l'altération du rein par un médicament néphrotoxique peut entraîner la libération de composé(s) spécifique(s) de la destruction de cellules rénales) et les biomarqueurs de conséquences, liés au mauvais fonctionnement d'un organe (l'altération du glomérule rénal laisse passer plusieurs protéines sériques dans les urines). Ces derniers ne sont pas spécifiques de la pathologie mais en sont le reflet.

Le but ultime de la recherche de biomarqueurs est le développement de tests cliniques de dépistage, simples et non-invasifs, pour détecter/différencier des maladies

avant qu'elles ne soient symptomatiques ou à un stade où le traitement pourrait être plus efficace.

La clé du succès de la recherche de biomarqueurs est une approche hautement multidisciplinaire (Thatcher and Caputo, 2008).

3.1. Le concept de recherche de biomarqueurs.

3.1.1. Considérations à prendre en compte et questions à se poser.

Le projet de recherche de biomarqueurs doit toujours commencer par plusieurs questions, posées dans la revue de LaBaer (LaBaer, 2005) :

- Quelle est le but de l'utilisation du biomarqueur ? Le screening diagnostique, le suivi de la progression d'une maladie. L'utilisera-t-on seul ou en complément d'autres analyses ?

- Comment le test de ce biomarqueur va-t-il influencer la décision du clinicien ? Est-ce que le choix ou l'initiation de la thérapie seront basés sur ce test ? Sera-t-il utilisé pour le diagnostic ?

- Quelle population sera ciblée pour le test ? Quelle maladie sera étudiée ? Quelle est la meilleure population contrôle ? Quelles sont les autres populations à considérer ? Le test sera-t-il préconisé pour les adultes, les enfants, les hommes, les femmes, ou tout autre groupe ?

- Quelles qualités sont demandées pour ce test ? Est-ce que la sensibilité et la spécificité sont nécessaires ? Quelle est la prévalence de la condition dans la population cible ?

- Comment le test va-t-il être utilisé ? Pour établir l'efficacité ou la sécurité d'un traitement ? Dans le but de commercialiser le test ? Quel sera son coût ? Est-ce financièrement intéressant ? Est-il en compétition avec d'autres tests déjà existants ?

La question clinique doit être clairement posée. Pour cela, il est nécessaire que la maladie soit bien définie, car toutes les maladies ne peuvent pas prétendre à la découverte de biomarqueurs, particulièrement les maladies complexes et difficiles à diagnostiquer (or, ce sont ces maladies qui en ont le plus besoin).

La mesure quantitative du ou des biomarqueurs doit être corrélée à la sévérité de la maladie (LaBaer, 2005). Par conséquent, les groupes de patients chez lesquels nous cherchons des signatures moléculaires distinctes doivent être rigoureusement prédéfinis : existe-t-il des différences physiopathologiques décelables dans les fluides biologiques entre un groupe de patients atteints de la maladie et un groupe de patients non atteints par cette même maladie ?

Il en résulte une importance du choix de la population dans laquelle la recherche de biomarqueurs sera effectuée, sans oublier d'établir des critères d'inclusion et

d'exclusion des patients (Fung E.T., 2004). En effet, les valeurs prédictives VPP et VPN seront directement dépendantes de la prévalence de la maladie dans la population choisie (LaBaer, 2005).

3.1.2. Les échantillons.

Le choix de la nature des prélèvements à effectuer est important et va dépendre de la maladie à étudier. En effet, il peut être préféré un fluide biologique facilement accessible (sang, urine, salive) à du tissu biopsié ou à du liquide cébrospinal, par exemple (Rifai et al., 2006). Est-ce que l'échantillon a besoin d'un traitement spécial avant conservation ? Si oui, faut-il changer la nature de l'échantillon pour le test ? (LaBaer, 2005)

Le recueil des échantillons doit être effectué à l'identique chez tous les patients, même ceux provenant de différents centres d'inclusion, afin de minimiser la variabilité inter-patients. Des efforts de standardisation dans la préparation des échantillons sanguins et urinaires ont été réalisés ces dernières années (Annexe 3).

Une remarque similaire peut être effectuée concernant la conservation des échantillons, car s'ils sont conservés de différentes manières, les résultats pourraient en être affectés. De plus, les échantillons nécessitent généralement l'apport extérieur d'un « conservateur », afin d'être utilisables pendant une période prolongée (Fung E.T., 2004).

3.1.3. La technique d'analyse des échantillons.

Avant de pouvoir choisir la technique d'analyse des échantillons, une question primordiale doit être posée : est-ce que la méthode de préparation des échantillons est robuste et reproductible d'un échantillon à l'autre ? (LaBaer, 2005) Sinon quelque soit la méthode d'analyse utilisée en aval de la préparation d'échantillons, les résultats ne seront pas cohérents.

La sélection de la technique pour l'analyse des échantillons est largement orientée par la nature des prélèvements et l'appareillage à disposition au sein du laboratoire. Elle doit tenir compte de ces deux éléments, ainsi que de la robustesse, de la reproductibilité des résultats, et surtout de la faisabilité de la méthode d'analyse. Au stade de la validation, il sera aussi important de prendre en considération son degré d'automatisation car il sera nécessaire d'analyser un grand nombre d'échantillons (dépendant de la prévalence de la maladie étudiée).

Classiquement, un projet de recherche de biomarqueurs est constitué en trois étapes : la découverte de candidats potentiels, la validation des candidats choisis à l'étape de découverte et la confirmation des biomarqueurs à plus grande échelle (Gao et al., 2005).

3.1.4. La découverte de candidats potentiels.

Les échantillons sains et pathologiques doivent être bien caractérisés, et ceux provenant de patients dont le diagnostic n'est pas confirmé, ou présentant des particularités physiopathologiques, doivent être exclus à ce stade du projet (Fung E.T., 2004).

La découverte de candidats biomarqueurs est réalisée en général sur un nombre restreint de patients (6 à 15), ou « population de développement » du modèle (training set) (Thatcher and Caputo, 2008). La comparaison des analytes présents ou absents dans les divers groupes définis, ou ayant des concentrations significativement modifiées, aboutira à la sélection du plus grand nombre possible d'analytes discriminatoires.

3.1.5. La validation des candidats choisis à l'étape de découverte.

Celle-ci est effectuée sur un nombre plus important de patients que pour l'étape de découverte (30 à 50), ou « population de test » (test set). Cette population aura les mêmes caractéristiques physiopathologiques que la population ayant servi pour le développement du modèle, mais en aucun cas n'aura pas été utilisée pour l'étape de découverte (Fung E.T., 2004).

La méthode MRM sur un analyseur de masse de type triple quadrupôle est généralement reconnue comme la meilleure technique pour le développement d'une méthode quantitative (Rifai et al., 2006).

Cette étape a pour but de se focaliser sur les biomarqueurs potentiels susceptibles de répondre au mieux à la question posée. Leur quantification permet de diminuer le nombre de biomarqueurs éventuels en confirmant ou en infirmant leur significativité statistique dans une nouvelle population (Thatcher and Caputo, 2008).

Le pouvoir discriminant des candidats biomarqueurs permettant de différencier les patients du groupe de validation est établi en traçant les courbes de ROC pour chacun d'entre eux ou de façon combinée.

Au cours de cette étape, seuls les analytes ayant une grande spécificité et sensibilité sont retenus pour l'étape de confirmation (quelques dizaines d'analytes).

3.1.6. La confirmation des biomarqueurs.

La confirmation des candidats biomarqueurs sélectionnés à l'étape précédente consiste à les rechercher précisément dans une large population (quelques centaines de patients ou plus), afin d'évaluer leurs performances (sensibilité et spécificité) (Thatcher and Caputo, 2008).

Contrairement aux deux autres phases précédentes, les méthodes analytiques doivent être faciles à réaliser et peu onéreuses, afin qu'elles puissent être largement

utilisées par les centres d'investigations cliniques, mais reproductibles et robustes. Il s'agit le plus souvent de techniques immunologiques utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre les analytes sélectionnés. Il arrive parfois que cette technique ne soit pas applicable, et que la spectrométrie de masse soit la seule alternative. Il est possible que tous les centres investigateurs ne possèdent pas cette expertise, auquel cas un système de collecte et d'acheminement dans des laboratoires spécialisés doit être mis en place.

3.1.7. Les inconvénients liés à la recherche de biomarqueurs.

Les étapes de découverte et de validation de biomarqueurs ne sont pas des tâches aisées, et impliquent certaines contraintes :

- humaines : mobiliser une équipe pluridisciplinaire (cliniciens spécialisés, biologistes, biochimistes, informaticiens, statisticiens...), qui doit être très motivée et parfaitement coordonnée pendant toute la période, longue (plusieurs années), de réalisation de cette recherche ; obtenir le consentement des patients ;
- biologiques : liées principalement au nombre, à la qualité et à la facilité/difficulté d'obtention des échantillons (stockage sécurisé des échantillons) ;
- matérielles ou technologiques, concernant le choix stratégique de la méthode analytique à utiliser. Il faut prendre en considération le coût des appareils, des réactifs, du personnel, du temps de l'analyse, de son rapport qualité/prix par rapport à un autre test, ainsi que la fiabilité et la sensibilité de chaque technique.

3.2. L'analyse des données.

L'analyse de données peut être classée en deux parties : le pre-processing qui prépare les données brutes à l'analyse et le post-processing qui est l'analyse détaillée des données, qui aboutira à des conclusions fiables.

3.2.1. Le pre-processing.

Il consiste en la préparation initiale de toutes les données afin de s'assurer qu'elles peuvent être comparées entre elles, en incluant la soustraction de la ligne de base, la calibration en masse, la prise en compte des données manquantes, la normalisation par le courant ionique total ou autre... (Fung E.T., 2004).

Une fois ces étapes de pre-processing effectuées, la véritable analyse de données peut commencer. Un seuil de détection général, basé sur un rapport signal-sur-bruit de fond minimal est déterminé, afin de détecter les pics et de déterminer leur valeur pour chaque échantillon. La décision doit être prise également de conserver toutes les données ou seulement un certain nombre, par exemple celles présentes de façon commune dans un certain pourcentage de la population (Fung E.T., 2004).

3.2.2. Le post-processing.

Des statistiques, utilisant des tests univariés ou multivariés, sont appliquées afin de déterminer le ou les analyte(s) (ou variables) qui est (sont) le(s) plus discriminant(s) pour répondre à la question clinique. Ces tests statistiques procurent en général une valeur p pour chaque analyte reflétant ainsi la probabilité que les différences qualitatives ou quantitatives observées pour cet analyte particulier (pris comme un test clinique potentiel) sont dues purement au hasard. Cette valeur n'est pas toujours à elle seule indicative de l'utilité finale d'un analyte comme biomarqueur (Fung E.T., 2004). L'établissement de courbes de ROC permet de déterminer le seuil du (des) peptide(s) afin d'avoir, en fonction de la pathologie étudiée, un bon compromis entre sensibilité et spécificité. Il faut ensuite, dans tous les cas, réaliser une analyse multivariée afin de sélectionner les facteurs les plus prédictifs d'un état physiopathologique.

3.2.3. La conservation des données.

Il est fortement recommandé de construire une base de données (database) compilant toutes les données recueillies aux différentes phases de l'étude (échantillons, analyse technique et traitement des résultats). Les données peuvent être transformées en un format commun (par exemple mzXML) permettant un rassemblement des données provenant de plusieurs types d'appareillage (Pedrioli et al., 2004). Ces formes de conservation des données permettent de manipuler plus facilement l'information, de les distribuer à la communauté scientifique et clinique, ainsi que d'effectuer des études complémentaires (Marko-Varga et al., 2005).

3.3. Les sources de variabilités lors d'une recherche de biomarqueurs.

L'interprétation des résultats est rendue difficile par des sources de variabilité indésirable, représentant des facteurs d'erreur et de confusion : la variabilité physiologique intra-et interindividuelle, ainsi que la variabilité technique et analytique.

3.3.1. La variabilité physiologique intra- et interindividuelle.

La variabilité physiologique correspond aux variations normales de composition et d'abondance du protéome pour un même individu et entre des individus. La variation biologique « normale », de 10% à 40%, est impossible à réduire ou à éliminer. C'est pourquoi il faut en tenir compte lors du traitement des données et des analyses statistiques (Thatcher and Caputo, 2008).

La variabilité intra-individuelle correspond aux fluctuations observables chez une personne durant la journée et d'une journée à l'autre. Les causes sont multiples : environnementales, alimentaires, activité physique, physiologiques... (Sun et al., 2009).

La variabilité interindividuelle est due à la constitution génétique de chaque individu, à son environnement, à son régime alimentaire, à son activité physique, à son âge, à son sexe...

Chez l'Homme, cette variabilité ne peut être contrôlée, contrairement à l'utilisation de modèles animaux, mais elle peut être réduite (Thatcher and Caputo, 2008). Dans l'idéal, afin que les groupes formés soient les plus homogènes possibles, les patients présentant d'autres pathologies que celle étudiée ne devraient pas être inclus. Lorsque le nombre de patients est limité (pathologies peu fréquentes), il est difficile de s'affranchir de ces patients présentant des comorbidités. En revanche, ces différents facteurs doivent donc être pris en considération lors de l'établissement du plan d'expérience et prennent toute leur importance au cours de la première phase de découverte, afin d'éviter de sélectionner des marqueurs spécifiques correspondant aux pathologies associées.

Les variabilités intra- et inter-patients doivent donc être évaluées afin d'aider à caractériser l'utilité clinique des biomarqueurs (Rifai et al., 2006).

3.3.2. La variabilité technique et analytique.

La variabilité technique et analytique correspond aux fluctuations techniques observables entre les différentes analyses réalisées sur un même échantillon, dépendant des appareils ou des logiciels (dont la variabilité est facilement mesurable...), des méthodes analytiques utilisées (préparation des échantillons, séparation chromatographique, détection, quantification...), ainsi que de l'expérimentateur. Elle doit être estimée et minimisée (Thatcher and Caputo, 2008). Des contrôles de qualité sont indispensables pour s'assurer de la reproductibilité et de la fiabilité des résultats. Cette variabilité doit être inférieure à la variabilité physiologique afin de permettre la détection de la variabilité physiopathologique, seule importante pour le test envisagé, et de ce fait, d'identifier les biomarqueurs potentiels.

4. Mise au point d'un test non invasif pour la détection d'état de rejet aigu et de néphropathie chronique chez des patients transplantés rénaux.

4.1. Protocole d'essai clinique ML 19912 « OPERA ».

Le protocole d'essai clinique OPERA, promu par le laboratoire Roche Pharma France et coordonné par le Pr. Y. Le Meur (CHU de Limoges puis CHU de Brest), est une étude multicentrique (26 centres hospitaliers français), randomisée, comparant l'efficacité du CellCept® (Mycophénolate mofétil) 3 g/j en dose initiale avec suivi thérapeutique personnalisé versus CellCept® 2 g/j à dose fixe chez des patients transplantés rénaux de novo bénéficiant d'une induction par anti-IL-R2, d'un traitement par ciclosporine et d'une épargne précoce en corticoïdes.

4.1.1. Objectifs du protocole OPERA.

L'objectif principal était de comparer l'incidence de survenue d'un rejet aigu clinique dans les douze premières semaines, entre les deux bras de randomisation.

Les objectifs secondaires étaient de comparer entre les deux groupes de l'étude : (i) l'évolution de la fonction rénale, (ii) la survie des patients et des greffons, (iii) le délai de la survenue d'un rejet aigu prouvé par biopsie systématique dans les douze premières semaines, (iv) l'incidence et le délai de survenue d'un rejet aigu prouvé par biopsie systématique après douze semaines, (v) l'histologie du greffon, (vi) la tolérance ; et enfin de corrélérer la présence de biomarqueurs urinaires (étude du protéome/peptidome urinaire) et la survenue d'un rejet aigu.

4.1.2. Schéma de l'étude.

IL s'agissait d'une étude prospective de phase III b, nationale, multicentrique, en ouvert, et randomisée en deux groupes parallèles A et B. Le groupe A a reçu une induction par anti-IL-R2, des corticoïdes et de la ciclosporine, avec une dose ajustée de CellCept®. Le groupe B quant à lui a reçu une induction par anti-IL-R2, des corticoïdes et de la ciclosporine, avec une dose fixe de CellCept® (Figure 32).

L'induction par anti-IL-R2 a été réalisée par voie intraveineuse, selon les habitudes des centres et conformément à l'AMM.

La corticothérapie a consisté en : 500 mg de solumédrol par voie intraveineuse avant et après la greffe et de 0,5 mg/kg/j par voie orale avec une dose maximale de 60 mg/j, du jour de la greffe (J0) au septième jour post-greffe (J7) (arrêt définitif après J7).

La ciclosporine a été introduite dans les soixante douze premières heures après la greffe avec des concentrations cibles à deux heures (C2) suivantes : (i) comprises entre 1000 et 1500 ng/mL de J0 à la semaine 4 (S4), (ii) comprises entre 800 et 1200 ng/mL de S4 à S12, et (iii) comprises entre 500 et 800 ng/mL de S12 à S52.

La prise de CellCept® ne devait pas être interrompue pendant une durée supérieure à quatorze jours consécutifs entre J0 et J52. Les patients du groupe A devaient prendre 3 g/j dès J0 ; puis la dose était ajustée sur la base de l'aire sous la courbe (ASC) estimée par méthode bayésienne aux temps S2, S6, S12, S26 et S52 (Le Meur et al., 2007). L'objectif à atteindre était d'obtenir une ASC_{0-12} à 40 mg.h/L. Les patients du groupe contrôle B devaient prendre 2g/j dès J0, puis la dose être maintenue jusqu'à S52. Si nécessaire, une adaptation de la dose sur des critères cliniques pouvait être réalisée.

La durée totale de l'essai a été de deux ans, comprenant une période de recrutement d'un an et un suivi thérapeutique de cinquante-deux semaines.

Les patients ont eu des visites d'évaluation aux temps suivants : J0, S2, S4, S6, S12, S16, S26, S39, S52. L'investigateur avait la possibilité, s'il le jugeait nécessaire, de demander au patient de revenir à une visite non prévue par le protocole, pour un examen clinique, ou paraclinique, ou pour effectuer des prélèvements sanguins.

De plus, des biopsies rénales ont été effectuées : systématiquement aux temps S12 et S52 ainsi qu'en cas de suspicion de rejet (à n'importe quel temps) (Figure 43). Des échantillons urinaires (frais) ont été prélevés avant chaque biopsie rénale et conservés à -20°C en présence d'un cocktail d'inhibiteurs des protéases.

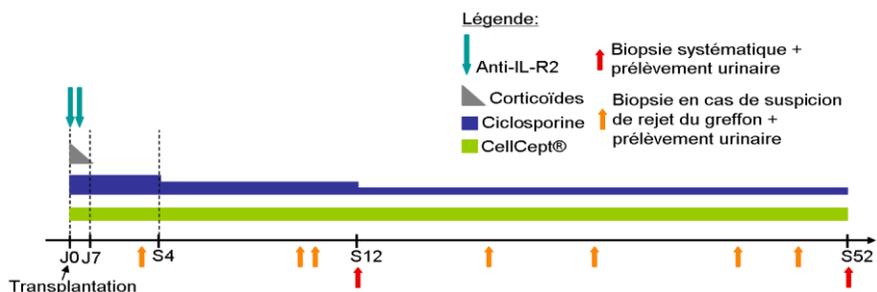


Figure 43. Schéma du protocole d'essai clinique « OPERA ». Le traitement immunosuppresseur se compose de plusieurs produits : traitement d'induction par anti-IL-R2 (flèche bleue) après la transplantation, corticothérapie (triangle gris) stoppant à J7, ciclosporine (rectangle bleu) adaptée diminuant dans le temps et CellCept® (rectangle vert) à dose fixe ou adaptée. Les prélèvements biopsiques et urinaires sont réalisés systématiquement (flèche rouge) ou en cas de suspicion de rejet du greffon (flèche orange).

4.1.3. Population de l'étude.

En théorie, 256 patients ont été recrutés dans 26 centres répartis sur toute la France, compilant un minimum de 512 prélèvements urinaires.

En pratique, 330 prélèvements urinaires ont été recueillis provenant de 223 patients inclus dans 19 centres (Tableau 12).

Tableau 12. Population du protocole d'essai clinique « OPERA ». Prélèvements urinaires classés, par centre investigateur. NC, non connu. PI, pas d'inclusion de patients.

Centre	Protéomique urinaire		Centre	Protéomique urinaire	
	Nombre de patients	Nombre de prélèvements		Nombre de patients	Nombre de prélèvements
Amiens	6	11	Nice	16	35
Bois Guillaume	NC	-	Grenoble	1	2
Bordeaux	9	12	Paris A	3	4
Brest	PI	-	Paris B	1	0
Caen	PI	-	Paris C	6	6
Clermont-Ferrand	20	1	Paris D	1	1
Créteil	7	10	Poitiers	27	39
Dijon	4	6	Rennes	PI	-
Le Kremlin-Bicêtre	PI	-	Strasbourg	PI	-
Lille	18	23	Suresnes	10	19
Limoges	25	44	Toulouse	34	63
Montpellier	22	35	Tours	9	14
Nantes	PI	-	Vandœuvre-lès-Nancy	4	5
			Total	223	330

4.1.4. Données recueillies pour l'analyse du protéome urinaire.

Afin de mener à bien la recherche de biomarqueurs urinaires chez des patients greffés rénaux, des données démographiques ont été recueillies : l'âge, le sexe, le délai du prélèvement urinaire post-transplantation ainsi que la classification fine du score de Banff (lésions élémentaires aiguës : glomérulaires, interstitielles, tubulaires et vasculaires ;

lésions élémentaires chroniques : glomérulaires, interstitielles, tubulaires, vasculaires, artériolaires et mésangiales) (Annexe 1). Les autres données récoltées lors des visites d'investigation et les dosages biologiques effectués ne nous ont pas été communiqués.

Les résultats anatomopathologiques d'analyse des biopsies selon les critères fins de Banff sont de très bonne qualité puisque dans un premier temps, les lames ont été lues par le centre investigateur (afin de commencer rapidement un traitement contre le rejet), puis une relecture centralisée de toutes les lames a été effectuée par une anatomopathologiste experte (Dr. Laure-Hélène Noël, Paris-Necker). Les différences d'interprétation entre la lecture locale et la lecture centralisée ont été évaluées par un comité de trois relecteurs anatomopathologistes et le coordinateur de l'essai. Les résultats utilisés dans cette étude sont ceux validés par ce comité.

4.2. Biomarqueurs urinaires candidats indicateurs du rejet aigu de greffe et de néphropathie chronique chez des patients transplantés rénaux.

4.2.1. Analyses du protéome et du peptidome urinaires pour la découverte de biomarqueurs potentiels chez des patients transplantés rénaux.

La majeure partie de cette étude est reprise dans un manuscrit qui sera soumis à publication dans le *Journal of the American Society of Nephrology* (Article 2).

Article 2

**Sequenced native urinary peptides
identified as biomarkers of graft lesions in
renal transplant recipients**

Prochainement soumis dans le journal *Journal of the American Society of
Nephrology*

Sequenced native urinary peptides identified as biomarkers of graft lesions in renal transplant recipients

A.-L. Gagez¹, P. Marquet^{1,2}, Y. Le Meur^{3,4}, N. Taguieva⁵, F. Bayle⁶, E. Cassuto-Viguiet⁷, M. Delahousse⁸, L. N. Gastinel¹ on behalf of the OPERA trial investigators

¹ INSERM UMR-S850, France; University of Limoges, France.

² Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacovigilance, CHU Limoges, France.

³ Department of Nephrology-Transplantation, CHU Limoges, France

⁴ Department of Nephrology-Transplantation, CHU Brest, France

⁵ Roche Pharma, France

⁶ Department of Nephrology-Transplantation, CHU Grenoble, France

⁷ Department of Nephrology-Transplantation, CHU Nice, France

⁸ Department of Nephrology-Transplantation, CHU Suresnes, France

Correspondence to:

Prof. Louis N. Gastinel

INSERM U850

Faculté de Médecine

2 rue du Dr. Marcland

87025 Limoges cedex

Tel.: +33555435895

Fax.: +33555438490

E-mail: louis.gastinel@unilim.fr

Keywords: Peptidome, biomarker, kidney transplantation, urine, MALDI-TOF/TOF

4.2.2. Travaux complémentaires.

4.2.1.1. Introduction.

L'objectif de ces travaux complémentaires portait sur la comparaison de nos résultats (correspondance protéique des peptides naturels identifiés) obtenus dans le cadre du protocole OPERA avec la base de données urinaires publique, mise à disposition par Mosaiques diagnostics (Allemagne).

4.2.1.2. Matériel et méthodes.

La base de données urinaire humaine et publique de Mosaiques diagnostics a été extraite du site internet de Mosaiques diagnostics & therapeutics AG ([http:// Mosaiques-diagnostics.de/diapatpcms/mosaiquescms/front_content.php?idcat=257](http://Mosaiques-diagnostics.de/diapatpcms/mosaiquescms/front_content.php?idcat=257)). La comparaison a été effectuée manuellement en comparant dans un premier temps les caractéristiques de ces deux bases, puis en recherchant les protéines communes. Pour chacune d'entre elles, les peptides ont été répertoriés.

4.2.1.3. Résultats.

Le tableau 13 dénombre les caractéristiques démographiques, protéiques et peptidiques pour les bases de données Mosaiques diagnostics et OPERA. Nos résultats proviennent exclusivement de patients transplantés rénaux tandis que cette population ne représente que 9% des patients dont sont issues les données disponibles sur le site internet de Mosaiques diagnostics. Malgré cela, le nombre de protéines identifiées est similaire (60 protéines différentes) entre les deux bases de données, dont 20 sont identiques. La quantité de peptides ayant servi à l'identification de ces protéines est deux fois plus importante dans la base de Mosaiques diagnostics que dans la nôtre, mais seulement 38 peptides avaient la même séquence dans les deux bases de données.

Tableau 13. Comparaison des deux bases de données urinaires humaines: Mosaiques diagnostics vs OPERA.

	Mosaiques diagnostics	OPERA	Commun
Patients transplantés rénaux	341	68	0
Autres patients	3585	0	0
Total des patients	3926	68	0
Protéines détectées	60	61	20
Peptides détectés	444	221	38*

* Voir Tableau 14 pour plus de détails.

Le détail des 20 protéines et des peptides communs entre les deux bases de données est présenté dans le tableau 14. La distribution peptidique semble équivalente dans les deux bases de données. En effet, l'identification d'une protéine par un grand nombre de peptides (rapporté au nombre total de peptides identifié) dans une base est avérée identique dans la seconde base de données. Aucune disparité extrême concernant cette assignation peptidique n'est à noter. Toutefois, notre base de données compte très peu de peptides redondants, contrairement à celle de Mosaiques diagnostics. De plus, les peptides séquencés et identiques pour ces deux bases ne représentent que 6% de la masse peptidique identifiée.

4.2.1.4. Discussion.

La confrontation de résultats avec ceux d'une autre équipe (accessible publiquement) est une étape importante dans toute étude de recherche, car elle permet de pondérer les résultats obtenus.

Les données récoltées par Mosaiques diagnostics et au cours de l'essai OPERA peuvent être comparées car elles s'intéressent toutes les deux au peptidome urinaire naturel humain (sans digestion trypsique) et la préparation des échantillons est très proche. Nous avons détecté la présence de peptides qui étaient assignés à des protéines majoritairement présentes dans les urines (collagènes, uromoduline). Effectivement, 8 protéines sur les 20 communes entre les deux bases appartiennent à la famille des collagènes. De plus, nous pouvons approcher l'abondance protéique par le nombre de peptides assignés à celle-ci, renforçant ainsi la présence des protéines de la famille des collagènes. Pour les 20 protéines communes, les séquences peptidiques identifiées sont différentes entre les deux bases de données. Ceci pourrait être dû à la différence des techniques utilisées, car nous avons utilisé un couplage NanoHPLC-MALDI-TOF/TOF, tandis que l'autre équipe a utilisé la CE-FTICR-MS. Le large panel d'identification protéique dans la totalité des deux bases n'est pas étonnant compte tenu de la diversité des pathologies recensées par Mosaiques diagnostics. Nous avons travaillé uniquement sur une population de transplantés rénaux, alors que les résultats de Mosaiques diagnostics prennent en compte 28 états physiopathologiques différents, pas tous liés au rein. Par ailleurs, il est fort probable que les données accessibles au public sur le site internet de la société Mosaiques diagnostics ne soient pas exhaustives, car il s'agit d'une entreprise de service.

La comparaison avec une base de données proche de la nôtre nous a toutefois permis de conforter nos résultats. Après cette première étape de « débroussaillage » dans la recherche de biomarqueurs urinaires chez des transplantés rénaux, suivra une étape de validation sur les mêmes échantillons, ainsi que sur de nouveaux échantillons, utilisant une méthode quantitative et plus rapide (en mode MRM sur le QTrap 4000) que celle développée au laboratoire (couplage off line NanoHPLC MALDI-TOF/TOF). L'objectif

Tableau 14. Comparaison des peptides séquencés correspondant aux 20 protéines retrouvées en commun dans les bases de données urinaires humaines Mosaïques diagnostics et OPERA.

Numéro d'accension	Nom de la protéine	Peptides totaux		Peptides redondants		Peptides communs
		Mosaïques	OPERA	Mosaïques	OPERA	
gi121946588; gi1703025; gi177824; gi177836; gi1942953; gi225768; gi231240; gi231241	Alpha-1 antitrypsin	22	5	2	0	3
gi29387000; gi4502005	Alpha-2-HS glycoprotein	3	2	0	0	1
gi113992	Apolipoprotein A-I	2	6	0	0	0
gi24212664	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	1	3	-	0	1
gi48428791	Beta-2-microglobulin	10	1	2	-	1
gi110349772; gi115269; gi1418928; gi179629; gi180380; gi180392; gi1888409; gi22328092; gi224045; gi3288495; gi62088774	Collagen alpha-1 (I) chain	86	19	71	0	3
gi111118976; gi115287	Collagen alpha-1 (II) chain	3	1	0	-	0
gi115306; gi16197601; gi180410; gi30058; gi4502951; gi62988777	Collagen alpha-1 (III) chain	48	6	22	0	5
gi68839886	Collagen alpha-1 (XV) chain	1	5	-	0	0
gi55957394	Collagen alpha-1 (XVII) chain	1	2	-	0	1
gi82654930; gi179596; gi2388555; gi32451581; gi45708783; gi48762934; gi82654930	Collagen alpha-2 (I) chain	18	1	6	-	1
gi56204476	Collagen alpha-2 (VIII) chain	1	1	-	-	0
gi5712087	Collagen alpha-3 (IX) chain	1	1	-	2	0
gi13591824; gi1706799; gi4033511	Fibrinogen alpha chain	13	4	0	0	1
gi56749856	Fibrinogen beta chain	1	2	-	0	1
gi57013850	Hemoglobin alpha subunit	17	21	0	0	10
gi56749856	Hemoglobin beta subunit	20	17	0	0	5
gi113576	Serum albumin	16	7	0	0	4
gi136464	Transthyretin precursor (prealbumin)	3	1	0	-	0
gi137116	Uromodulin	18	1	0	-	1

est de rechercher spécifiquement les peptides intéressants et de les quantifier. Le transfert de résultats entre ces deux appareillages n'est pas aisé puisque les ions détectés sur le MALDI sont monochargés et ceux détectés grâce au QTrap sont multichargés. De plus, la fragmentation par des sources d'ionisation différentes et la sensibilité de détection des peptides ne sera pas forcément identique d'un appareil à l'autre. Ce travail est actuellement en cours de développement dans l'unité.

Conclusion.

La pharmacologie est un domaine de la science qui étudie les effets de l'organisme sur les médicaments (pharmacocinétique) et les effets des médicaments sur l'organisme (pharmacodynamie). La compréhension des mécanismes d'action de ces préparations pharmaceutiques, à travers : leur transport, leurs interactions protéiques, leurs actions pharmacologiques, leur biotransformation et leur excrétion, a pour objectif clinique l'individualisation thérapeutique. En particulier, l'ajustement des doses médicamenteuses administrées à un patient permet dans certains cas d'optimiser leurs effets thérapeutiques, mais aussi de minimiser leurs effets secondaires.

Les travaux de cette thèse ont consisté à développer des applications de la spectrométrie de masse, à l'aide des appareils disponibles dans le laboratoire, à différents domaines de la pharmacologie, concernant en particulier les médicaments immunosuppresseurs utilisés en transplantation.

La fixation covalente des acyl-glucuronides aux protéines est considérée comme un évènement précoce, conduisant à la toxicité pour l'organisme des molécules ayant un acide carboxylique et un acyl-glucuronide. L'appréciation du degré de formation de ces adduits conduirait donc à une estimation potentielle du degré de toxicité d'un acyl-glucuronide. Nous nous sommes intéressés à l'AcMPAG, métabolite mineur issu de la biotransformation du MPA, dont la prodrogue immunosuppressive est le MMF. Asif et al (Asif et al., 2007) ont démontré chez le rat, mais de manière non formelle (co-immunoprécipitation) que l'AcMPAG était capable de former des adduits covalents avec l'albumine. Nous avons essayé de confirmer ces résultats en utilisant une méthode de détection plus formelle, la spectrométrie de masse, avec laquelle des études concluantes ont déjà été menées pour d'autres métabolites acyl-glucuronide (Ding et al., 1993; Ding et al., 1995). Malheureusement, nous n'avons détecté aucun adduit covalent entre l'AcMPAG et les protéines testées : BSA, HSA, IMPDH et UGTs. L'obtention d'un contrôle positif (la tolmétine acyl-glucuronide), que nous n'avons pas réussi à nous procurer, permettrait de confirmer la méthode utilisée ainsi que les résultats obtenus.

La biotransformation des substances endogènes et des xénobiotiques est indispensable à l'organisme pour leur excrétion. Il est important de souligner que l'étude du métabolisme et le phénotypage *in vitro* constituent des étapes-clés dans la compréhension des mécanismes pharmacologiques et des interactions médicamenteuses pouvant intervenir *in vivo*. Afin d'identifier et de doser différentes molécules à partir de quantités infimes d'échantillons, nous avons utilisé le potentiel de la spectrométrie de masse (sensibilité, rapidité et spécificité élevées) et établi une méthode permettant la détermination de l'activité simultanée et spécifique de chacune des six uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférases (UGT) majoritairement présentes dans les microsomes hépatiques et catalysant les réactions de glucuroconjugaison. Les méthodes

de phénotypage d'UGTs existantes à ce jour concernaient la détermination simultanée de l'activité enzymatique d'un nombre limité d'isoformes, mais aucune stratégie dite de « cocktail » n'avait été envisagée (Court MH, 2005; Donato et al., 2010; Liu et al., 2008). Notre méthode consiste en trois incubations microsomaux séparées avec un, deux et trois substrats spécifiques de chacune des six isoformes d'UGTs choisies, qui sont réunies avant l'unique analyse par LC-MS/MS. Cette méthode permet de faire des économies de réactifs et surtout de prélèvements humains hépatiques. Les micro-volumes utilisés sont compatibles avec une automatisation sur des plaques 96 puits, conférant un débit analytique sans précédent. La caractérisation rapide de banques de microsomes est rendue possible, ainsi que l'étude d'inhibition de composés comme les médicaments. Les connaissances actuelles sur les relations génotype-phénotype des UGTs pourront être complétées. La procédure dite de « cocktail » pourra être utile, après optimisation, pour la réalisation d'études d'induction de ces enzymes sur des modèles autres que les microsomes (hépatocytes, coupes de foie).

La calcineurine est la cible directe de molécules immunosuppressives, ciclosporine et tacrolimus, qui modulent son activité. Cette enzyme étant impliquée dans diverses voies de signalisation cellulaire, il semble intéressant d'analyser son comportement. La mise au point d'une méthode de détection de faibles niveaux d'activité de la calcineurine par spectrométrie de masse pourrait être une alternative fiable et supérieure aux techniques jusqu'à présent développées (Blanchet et al., 2009; Gong et al., 1996; Kilka et al., 2009; Roberts et al., 2008; van Rossum et al., 2008), et ne nécessitant pas d'extraction de l'échantillon. Les paramètres cinétiques de la calcineurine extraite de cerveau bovin ont pu être déterminés ($K_M = 34.7 \mu\text{M}$ et $V_{\text{max}} = 20.8 \text{ nmol/min/mg}$ protéines), mais des expériences complémentaires d'inhibition devront être conduites avant de pouvoir doser son activité dans des milieux plus complexes. En effet, suivre l'activité de la calcineurine dans des lymphocytes de patients, pourrait servir comme indicateur d'efficacité des traitements immunosuppresseurs administrés ; mais demande une mise au point plus fine, et nécessite en particulier de tenir compte des autres protéines phosphatases (PP) de la même famille que la calcineurine (PP1, PP2A et PP2C).

Le développement d'un outil de diagnostic spécifique d'une maladie donnée est important pour les patients. Pour cela, des projets doivent être mis en place afin d'identifier des biomarqueurs de cette maladie, permettant de répondre à la question clinique initialement posée et/ou d'améliorer la prise en charge des patients. Grâce au projet de recherche de candidats biomarqueurs urinaires potentiellement indicateurs des états de rejet aigu de greffe et/ou de néphropathie chronique d'allogreffe dans une cohorte de patients transplantés rénaux, nous avons pu appréhender les divers problèmes rencontrés liés à la recherche de biomarqueurs, comme ceux de bien définir la question supportant le projet, ou d'identifier les différentes sources de variabilités des résultats, liées aux échantillons et à la méthode d'analyse. L'objectif de ce projet est la mise au

point d'un test urinaire de diagnostic précoce des lésions du greffon rénal, pouvant limiter le recours à la biopsie, geste médical invasif. Nous avons pu constater que le retraitement et l'analyse des données récoltées n'étaient pas chose aisée compte tenu du volume énorme. C'est pourquoi nous nous sommes concentrés sur les peptides séquencés avec certitude, ce qui a permis de les relier à un identifiant protéique (> 99% de confiance). Une analyse statistique comparant les intensités normalisées pour chacun des 39 peptides retenus selon le groupe de diagnostic (stable (ST), néphropathie chronique d'allogreffe de grade 1 (CAN1) et rejet aigu (AR)) a été effectuée en utilisant les tests de Mann-Witney ou Kruskal-Wallis. La sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) ont été calculées pour chacun de ces peptides (ou combinaison peptidique) spécifiques d'un diagnostic histologique : p4 pour les patients ST avec Se = 72.7% et Sp = 74.3% ; p17-p35 pour les patients CAN1 avec Se = 76.5% et Sp = 87.5% ; et p17-p24 pour les patients AR avec Se = 91.7% et Sp = 84.4%. Ces résultats restent à valider sur une population externe à celle utilisée afin de confirmer leurs valeurs prédictives. Une méthode quantitative (en mode MRM sur le QTrap 4000), plus rapide et plus sensible que celle utilisée pour l'identification de candidats potentiels, est en cours de développement au laboratoire dans ce but. De plus, la très grande quantité de données recueillies, ne nous a pas permis d'étudier la totalité des analytes détectés, par manque d'outil d'analyse satisfaisant à nos exigences. Continuer le retraitement des données récoltées est envisageable, en restreignant la quantité de données en ne s'intéressant par exemple qu'à une gamme de m/z donnée, ou à condition de disposer d'un outil répondant à nos besoins. D'où l'importance de prévoir un système de conservation des données afin de pouvoir gérer plus facilement les informations et éventuellement de les compléter.

Annexe 1. Classification de Banff de la pathologie rénale d'allogreffe : rejets cellulaire et humoral (Racusen et al., 1999b; Solez et al., 2008).

Le diagnostic et l'évaluation de la sévérité et de la nature du rejet de l'allogreffe sont effectués grâce à une biopsie sur l'organe une fois transplanté chez le patient.

Rejet aigu cellulaire.

L'évaluation se concentre sur l'extension de l'inflammation lymphocytaire. Elle doit aussi prendre en compte que les lymphocytes infiltrent certaines structures du transplant, provoquant une tubulite et une artérite.

L'inflammation interstitielle est évaluée en considérant l'étude du cortex non fibreux présentant des infiltrats mononucléés/lymphocytaires : i0 si 0-10%, i1 si 11-25%, i2 si 26-50%, i3 si $\geq 51\%$. Si l'infiltrat contient plus de 5-10% d'éosinophiles, de neutrophiles ou de cellules plasmiques, d'autres diagnostics différentiels doivent être envisagés, tels qu'une réaction d'hypersensibilité ou une infection.

La tubulite (t) et les lésions d'artérite (v) sont évaluées sur une échelle de 0 à 3.

La classification de Banff permet de classer les rejets selon un ordre de grade de gravité :

- rejet tubulo-interstitiel discret à modéré de type 1A : t2, i2 ou i3 (lésions de tubulites modérées (5-10 lymphocytes par section tubulaire), associées à une extension de l'inflammation interstitielle modérée) ;
- rejet tubulo-interstitiel modéré à sévère de type 1B : t3, i2 ou i3 (tubulite sévère (>10 lymphocytes par section) avec l'extension de l'inflammation interstitielle modérée) ;
- rejet de type 2A : v1 (gonflement et inflammation de l'intima entraînant une obstruction de moins de 25% de la lumière) ;
- rejet de type 2B : v2 (artérite intimale plus sévère que pour le type 2A) ;
- rejet sévère de type 3 : v3 (inflammation lymphocytaire et/ou nécrose fibrinoïde de la média artérielle atteignant parfois la circonférence du vaisseau). Lors des lésions vasculaires, il est nécessaire de noter le nombre total d'artères et le nombre d'artères atteintes.

D'autres paramètres peuvent être mesurés :

- glomérulite : g0 pour pas de glomérulite, g1 pour une glomérulite dans moins de 25% des glomérules, g2 pour une glomérulite segmentaire ou totale dans 25 à

- 75% des glomérules, g3 pour une glomérulite (la plupart globale) dans plus de 75% des glomérules ;
- fibrose interstitielle : ci0 jusqu'à 5% de l'aire corticale atteinte, ci1 (légère) entre 6 et 25% de l'aire corticale atteinte, ci2 (modérée) entre 26 et 50% de l'aire corticale atteinte, ci3 (sévère) plus de 50% de l'aire corticale atteinte ;
 - atrophie tubulaire : ct0 pas d'atrophie tubulaire, ct1 jusqu'à 25% de l'aire corticale tubulaire atteinte, ct2 entre 26 et 50% de l'aire corticale tubulaire atteinte, ct3 plus de 50% de l'aire corticale tubulaire atteinte ;
 - glomérulopathie d'allogreffe : cg0 pas de glomérulopathie et double contour membranaire inférieur à 10% des boucles de capillaires périphériques dans les glomérules les plus sévèrement atteints, cg1 double contour membranaire affecte jusqu'à 25% des boucles de capillaires périphériques dans les plus affectés des glomérules non-sclérotiques, cg2 double contour membranaire affecte entre 26 et 50% des boucles de capillaires périphériques dans les plus affectés des glomérules non-sclérotiques, cg3 double contour membranaire affecte plus de 50% des boucles de capillaires périphériques dans les plus affectés des glomérules non-sclérotiques ;
 - augmentation de la matrice mésangiale : mm0 pas d'augmentation de la matrice mésangiale, mm1 jusqu'à 25% de glomérules non sclérotiques affectés (augmentation modérée de la matrice), mm2 entre 26 et 50% de glomérules non sclérotiques affectés (augmentation modérée de la matrice), mm3 plus de 50% de glomérules non sclérotiques affectés (augmentation modérée de la matrice) ;
 - épaisseur de l'intima fibreuse vasculaire : cv0 pas de changement chronique vasculaire, cv1 rétrécissement vasculaire jusqu'à 25% de la lumière par épaissement fibro-intimale des artères avec ou sans brèche de la membrane élastique interne ou présence de cellules spumeuses ou occasionnellement des cellules mononucléaires, cv2 augmentation sévère des changements décrits précédemment avec entre 26 et 50% de rétrécissement de la lumière vasculaire, cv3 changement vasculaire sévère avec plus de 50% de rétrécissement de la lumière vasculaire ;
 - épaisseur artériolaire hyaline : ah0 pas d'augmentation de l'épaisseur hyaline, ah1 augmentation légère à modérée de l'épaisseur hyaline dans une artériole, ah2 augmentation modérée à sévère de l'épaisseur hyaline dans plus d'une artériole, ah3 augmentation sévère de l'épaisseur hyaline dans plusieurs artérioles ;
 - capillarite péri-tubulaire : ptc0 pas de capillarite péri-tubulaire corticale (PTC) ou <10% de PTC avec inflammation, ptc1 \geq 10% de PTC avec maximum 3 à 4 cellules luminales inflammatoires, ptc2 \geq 10% de PTC avec maximum 5 à 10 cellules luminales inflammatoires, ptc3 \geq 10% de PTC avec plus de 10 cellules luminales inflammatoires ;

- inflammation interstitielle : ti0 pas ou <10% d'inflammation interstitielle du parenchyme, ti1 10-25% du parenchyme inflammatoire, ti2 26-50% du parenchyme inflammatoire, ti3 plus de 50% du parenchyme inflammatoire.

Rejet aigu humoral.

Les lésions observées au cours du rejet humoral comprennent la glomérulite/capillarite péritubulaire avec margination des neutrophiles et/ou des cellules mononuclées, l'artérite nécrosante sévère, la fuite capillaire avec œdème interstitiel et/ou hémorragie, la thrombose et l'infarctus. La présence d'un grand nombre de monocytes/macrophages dans les capillaires, détectée par immunomarquage, est corrélée avec la présence de C4d dans les capillaires péritubulaires.

Trois sous-types histologiques de rejet humoral ont été définis :

- lésions tubulaires aiguës ;
- capillarite avec margination ;
- lésions d'artérites.

Il est également possible d'identifier des formes infra-cliniques (anticorps, lésion du transplant, présence du C4d sans dysfonctionnement du transplant) et des formes latentes (anticorps, présence du C4d sans lésion du transplant) (Takemoto et al., 2004).

La présence du C4d peut être scoré : C4d0 pas de détection, C4d1 détection minimale (1-10%), C4d2 détection d'un point focal (10-50%), C4d3 détection diffuse (>50%).

Lésions borderline.

C'est le terme utilisé lorsqu'une suspicion de rejet aigu est détectée. Les paramètres sont considérés comme étant intermédiaires entre l'état normal et le rejet aigu : pas d'artérite intimale, tubulite légère (1 à 4 cellules mononucléaires/tubulaires coupent la section), i1.

Néphropathie chronique d'allogreffe.

Les néphropathies chroniques sont réparties en plusieurs groupes selon leur gravité d'atteinte :

- néphropathie chronique de grade I : fibrose interstitielle légère et atrophie tubulaire avec ou sans changements spécifiques suggérant un rejet chronique ;
- néphropathie chronique de grade II : fibrose interstitielle modérée et atrophie tubulaire avec ou sans changements spécifiques suggérant un rejet chronique ;
- néphropathie chronique de grade III : fibrose interstitielle sévère, atrophie et perte tubulaire avec ou sans changements spécifiques suggérant un rejet chronique.

Annexe 2. Les modes d'acquisition utilisés sur le spectromètre de masse QTrap.

Le QTrap est un spectromètre de masse hybride pouvant fonctionner selon deux modes combinables : triple quadrupôle et à trappe à ions linéaire. De nombreux modes d'acquisition sont ainsi accessibles sur cet appareil. Le quadrupôle Q3 fonctionne comme le Q1, mais il peut être utilisé comme un quadrupôle conventionnel ou comme une trappe à ion linéaire avec une éjection ionique axiale. A titre indicatif, nous présentons ci-dessous les modes d'analyse utilisés pendant la thèse, ce qui ne reflète en aucun cas la totalité des possibilités offertes par cet appareil (manuel utilisateur).

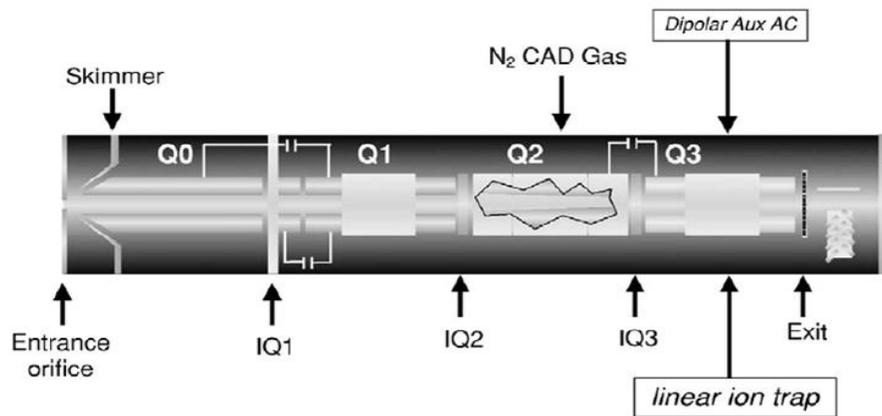


Figure 1 Annexe 2. Schéma d'un système hybride triple quadrupôle à trappe à ions linéaire. Q1 représente le premier quadrupôle et Q3 le 3^e quadrupôle. Ce dernier peut être utilisé comme une trappe à ions grâce à la présence à l'entrée et à la sortie de barrières électromagnétiques. Q2 correspond à la cellule de collision.

Analyse en mode quadrupolaire.

- MRM (Multiple ou Single reaction monitoring).

Q1 est focalisé sur un rapport m/z donné et la cellule de collision est optimisée pour fragmenter cet ion parent. Q3 est focalisé sur un rapport m/z spécifique. Seules les molécules ayant cette transition exacte seront détectées.

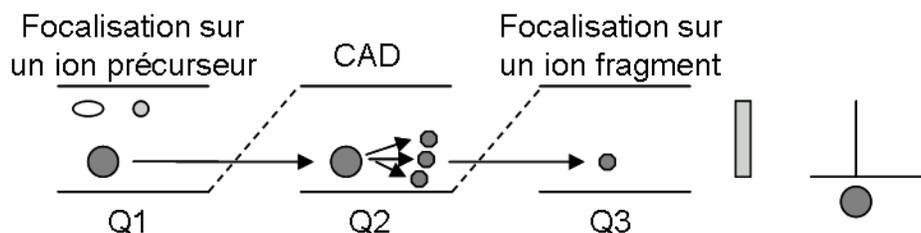


Figure 2 Annexe 2. Mode quadrupolaire : Multiple Reaction Monitoring.

- Prec (Precursor Ion scan).

Un balayage de masse, sur une large gamme de m/z est réalisée en Q1 afin d'identifier quels sont les ions parents générant l'ion sélectionné en Q3.

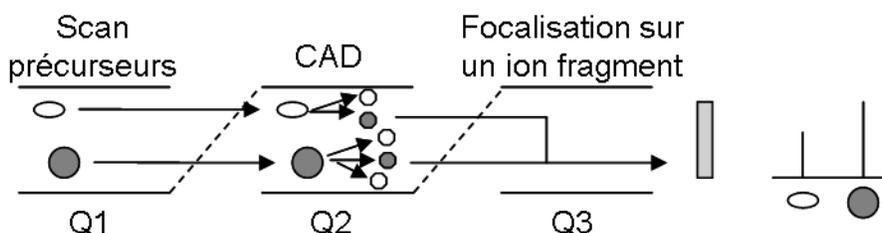


Figure 3 Annexe 2. Mode quadrupolaire : Precursor Ion Scan.

Analyses en mode trappe à ions linéaire.

- EMS (Enhanced mass spectrometry).

Les ions sont transférés directement de l'orifice au Q3, où ils sont conservés pendant un temps pouvant varier jusqu'à quelques millisecondes et les rapports m/z sont détectés.

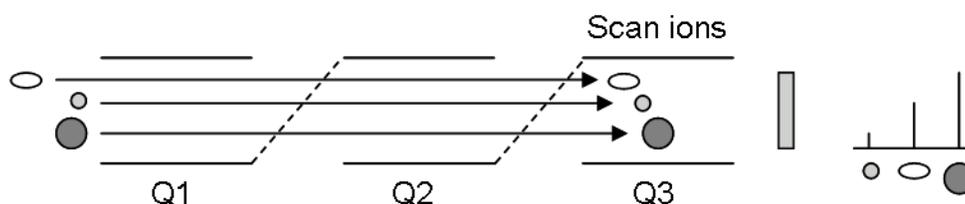


Figure 4 Annexe 2. Mode trappe à ions linéaire : Enhanced Mass Spectrometry.

- EPI (Enhanced product ion).

Le rapport m/z des ions est déterminé en Q1. Certain d'entre eux sont sélectionnés pour aller en Q2 et être fragmentés. Les ions produits sont conservés pendant un temps pouvant varier jusqu'à 250 millisecondes (Dynamic fill time) en Q3.

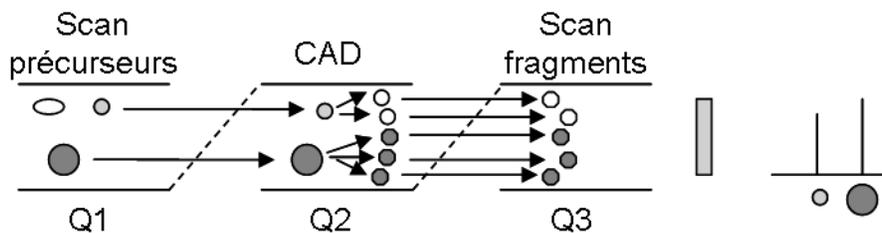


Figure 5 Annexe 2. Mode trappe à ions linéaire : Enhanced Product Ion.

- ER (Enhanced Resolution).

Le m/z des ions est déterminé en Q1. Certains d'entre eux sont sélectionnés, passent à travers le Q2 sans être fragmentés, et sont scannés en Q3 à une faible vitesse pour produire la meilleure résolution spectrale possible (détermination de l'état de charge).

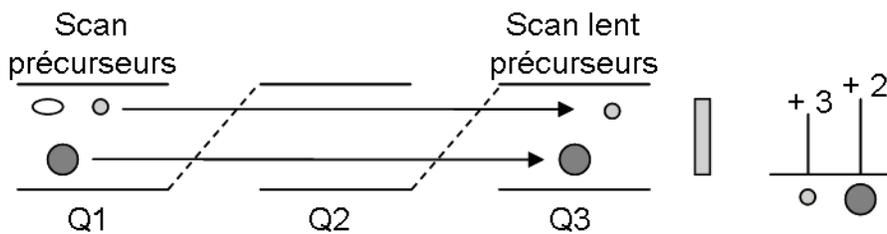


Figure 6 Annexe 2. Mode trappe à ions linéaire : Enhanced Resolution.

Annexe 3. Recommandations pratiques pour l'utilisation d'urine comme fluide biologique pour les programmes de détection de biomarqueurs.

Bien que l'urine fut considérée dans le passé comme un fluide biologique instable contenant très peu d'informations, elle a gagné considérablement en intérêt et les obstacles supposés relèvent plus du mythe que de la réalité (Mischak et al., 2009).

L'urine est un des fluides biologiques idéal pour la découverte de biomarqueurs non invasifs de maladies humaines. Son recueil est simple chez tous les patients et ne nécessite pas une procédure invasive.

L'analyse du protéome urinaire n'est pas considérée comme une chose aisée car l'urine renferme des protéines dans une large gamme de concentrations, de fortes concentrations en sels et en d'autres composés interférants, et surtout une très grande variabilité, intra- et interindividuelles (Thongboonkerd, 2007).

Le recueil des urines.

Parce que la physiologie d'une personne peut altérer son protéome urinaire d'un jour à l'autre, mais aussi au cours d'une journée, minimiser ses variations s'avère indispensable. La première miction du matin a un fort potentiel de contamination bactérienne due à un long temps de résidence de l'urine dans la vessie et le tractus urogénital. D'autant plus que sa composition résulte en partie de l'activité du jour précédent. La seconde miction du matin est le meilleur choix pour l'analyse clinique du protéome (Sun et al., 2009).

Il est essentiel d'ajouter aux échantillons urinaires des inhibiteurs de protéases afin de limiter la dégradation de l'échantillon, et ainsi préserver les interactions éventuelles entre les protéines/peptides urinaires (Zhou et al., 2006). Mais ils peuvent interagir avec l'analyse protéomique et former des liaisons covalentes avec les protéines, induisant un déplacement de leur point isoélectrique (Thongboonkerd, 2007). C'est pourquoi il faut bien les choisir et en tenir compte pour l'analyse.

L'addition d'un conservateur (azide de sodium ou acide borique) lors du recueil des urines semble indispensable afin de prévenir une contamination bactérienne (Thongboonkerd, 2007).

Le prétraitement pour la conservation des urines.

Éliminer les cellules et les débris urinaires est une étape cruciale (Thongboonkerd, 2007). Des prélèvements peuvent contenir un grand nombre d'hématies ou des globules

blancs, qui doivent dans l'idéal être retirés par centrifugation à 1000 g pendant 10 min, juste après le recueil des urines (Yamamoto, 2010).

Il a été montré que le protéome urinaire ne changeait pas significativement quand l'urine était conservée plus de trois jours à +4°C ou plus de six heures à température ambiante. En revanche, afin d'éviter des altérations significatives après plusieurs années de stockage, il est nécessaire de les conserver à -20°C ou à -80°C (Decramer et al., 2008).

Aucun effet de cycles de congélation/décongélation (de zéro à cinq) n'a été observé sur l'identification des peptides et des protéines (Lee et al., 2008). En revanche, quatre à sept cycles de congélation/décongélation peuvent causer des variations (augmentation et diminution) de la concentration de certaines protéines urinaires (Thongboonkerd, 2007).

La préparation des échantillons urinaires.

Le choix de la préparation des échantillons est crucial pour optimiser la résolution et la sensibilité lors de l'analyse du protéome urinaire. Plusieurs méthodes sont possibles pour concentrer les urines : les plus courantes sont la dialyse suivie d'une lyophilisation, la filtration, l'ultracentrifugation, et la précipitation. La perte des protéines est plus grande par ultracentrifugation ou par dialyse-lyophilisation que par la méthode de précipitation (acétonitrile, acétone) (Khan and Packer, 2006). Il n'existe pas un protocole parfait pour étudier l'intégralité du protéome urinaire. Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients. Une combinaison de plusieurs de ces méthodes de préparation semble intéressante pour obtenir les informations les plus quantitatives et qualitatives possibles (Thongboonkerd et al., 2006).

Sels et composés chargés interfèrent avec l'analyse du protéome urinaire. Par conséquent, ils doivent être éliminés par exclusion de taille utilisant des colonnes filtrantes, par précipitation ou par dialyse (Thongboonkerd, 2007).

Les protéines/peptides en faible concentration sont masqué(e)s par (celles) ceux présent(e)s en forte quantité. Cette abondance peut être diminuée par l'utilisation de systèmes de déplétion partielle ou totale : ProteoMinerTM (BIO-RAD) (Guerrier et al., 2008), cartouche ou colonne de déplétion de protéines définies (Agilent Technologies)... (Bjorhall et al., 2005).

Pooler les échantillons permet d'éliminer les variations interindividuelles en augmentant l'abondance des protéines/peptides en commun. Mais les données générées sont incomplètes avec la perte de l'information individuelle et peuvent être altérées par la présence d'« outliers ». L'analyse individuelle des échantillons demande plus de travail, néanmoins elle permet une meilleure compréhension de la variation observée (Sun et al., 2009).

La normalisation des résultats quantitatifs.

La normalisation des données à des fins de comparaison est un sujet délicat car elle est échantillon- et appareil-dépendante. Toutefois, il est possible de compenser les variations de concentration en réajustant sur la créatinine urinaire, ou sur l'abondance de peptides urinaires « de ménage », qui sont présents dans tous les prélèvements (Theodorescu et al., 2005).

Bibliographie

- Aebersold R and Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**: 198-207.
- Alvarez RH, Valero V, and Hortobagyi GN (2010) Emerging targeted therapies for breast cancer. *J Clin Oncol* **28**: 3366-3379.
- Amacher DE (2010) The discovery and development of proteomic safety biomarkers for the detection of drug-induced liver toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **245**: 134-142.
- Anderson NL and Anderson NG (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* **1**: 845-867.
- Anglicheau D, Flamant M, Schlageter MH, Martinez F, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, and Thervet E (2003a) Pharmacokinetic interaction between corticosteroids and tacrolimus after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* **18**: 2409-2414.
- Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, and Thervet E (2003b) Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* **14**: 1889-1896.
- Aoyagi T, Yamashita K, Suzuki T, Uno M, Goto R, Taniguchi M, Shimamura T, Takahashi N, Miura T, Okimura K, Itoh T, Shimizu A, Furukawa H, and Todo S (2009) A human anti-CD40 monoclonal antibody, 4D11, for kidney transplantation in cynomolgus monkeys: induction and maintenance therapy. *Am J Transplant* **9**: 1732-1741.
- Armstrong VW. The acylglucuronide of mycophenolic acid forms a specific covalent adduct with inosine monophosphate dehydrogenase 2. (2004) *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 31[Suppl. 1], A99.
Ref Type: Abstract
- Asif AR, Armstrong VW, Volland A, Wieland E, Oellerich M, and Shipkova M (2007) Proteins identified as targets of the acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in kidney tissue from mycophenolate mofetil treated rats. *Biochimie* **89**: 393-402.
- Barford D (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci* **21**: 407-412.
- Baumgrass R, Weiwad M, Erdmann F, Liu JO, Wunderlich D, Grabley S, and Fischer G (2001) Reversible inhibition of calcineurin by the polyphenolic aldehyde gossypol. *J Biol Chem* **276**: 47914-47921.
- Benain JP, Faller B, Briat C, Jacquelinet C, Brami M, Aoustin M, Dubois JP, Rieu P, Behaghel C, and Duru G (2007) [Cost of dialysis in France]. *Nephrol Ther* **3**: 96-106.

- Biomarkers definitions working group (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* **69**: 89-95.
- Bjorhall K, Miliotis T, and Davidsson P (2005) Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics* **5**: 307-317.
- Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King SP, Miwa G, Ni L, Kumar G, McLeod J, Obach RS, Roberts S, Roe A, Shah A, Snikeris F, Sullivan JT, Tweedie D, Vega JM, Walsh J, and Wrighton SA (2003) The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab Dispos* **31**: 815-832.
- Blanchet B, Hulin A, Duvoux C, and Astier A (2003) Determination of serine/threonine protein phosphatase type 2B PP2B in lymphocytes by HPLC. *Anal Biochem* **312**: 1-6.
- Blanchet B, Hurtova M, Roudot-Thoraval F, Costentin CE, Barrault C, Jouault H, Medkour F, Laurent A, Duvoux C, and Hulin A (2009) Deficiency in calcineurin activity in liver transplantation candidates with alcoholic cirrhosis or hepatocellular carcinoma. *Liver Int* **29**: 1152-1157.
- Blumenthal DK, Takio K, Hansen RS, and Krebs EG (1986) Dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit (type II) by calmodulin-dependent protein phosphatase. Determinants of substrate specificity. *J Biol Chem* **261**: 8140-8145.
- Bosio A, Binczek E, Le Beau MM, Fernald AA, and Stoffel W (1996) The human gene CGT encoding the UDP-galactose ceramide galactosyl transferase (cerebroside synthase): cloning, characterization, and assignment to human chromosome 4, band q26. *Genomics* **34**: 69-75.
- Boyd MR (1981) Toxicity mediated by reactive metabolites of furans. *Adv Exp Med Biol* **136 Pt B**: 865-879.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brondyk WH (2009) Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods Enzymol* **463**: 131-147.
- Buhaescu I, Segall L, Goldsmith D, and Covic A (2005) New immunosuppressive therapies in renal transplantation: monoclonal antibodies. *J Nephrol* **18**: 529-536.
- Burchell B, Brierley CH, and Rance D (1995) Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sci* **57**: 1819-1831.
- Burke BA and Carroll M (2010) BCR-ABL: a multi-faceted promoter of DNA mutation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* **24**: 1105-1112.
- Christ P, Rutzinger S, Seidel W, Uchaikin S, Pro F, Koy C, and Glocker MO (2004) High detection sensitivity achieved with cryogenic detectors in combination with matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* **10**: 469-476.

Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B, Carter S, Cavallo T, Haas M, Lindblad A, Manivel JC, Nast CC, Salomon D, Weaver C, and Weiss M (1997) Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol* **8**: 1930-1941.

Court MH (2005) Isoform-selective probe substrates for in vitro studies of human UDP-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymol* **400**: 104-116.

Court MH, Hazarika S, Krishnaswamy S, Finel M, and Williams JA (2008) Novel polymorphic human UDP-glucuronosyltransferase 2A3: cloning, functional characterization of enzyme variants, comparative tissue expression, and gene induction. *Mol Pharmacol* **74**: 744-754.

Crespi CL, Penman BW, Steimel DT, Smith T, Yang CS, and Sutter TR (1997) Development of a human lymphoblastoid cell line constitutively expressing human CYP1B1 cDNA: substrate specificity with model substrates and promutagens. *Mutagenesis* **12**: 83-89.

De Hoffmann E. and Stroobant V. Spectrométrie de masse. Dunod (1994) [3].
Ref Type: Conference Proceeding

Decramer S, Gonzalez de PA, Breuil B, Mischak H, Monsarrat B, Bascands JL, and Schanstra JP (2008) Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics* **7**: 1850-1862.

Deuse T, Velotta JB, Hoyt G, Govaert JA, Taylor V, Masuda E, Herlaar E, Park G, Carroll D, Pelletier MP, Robbins RC, and Schrepfer S (2008) Novel immunosuppression: R348, a. *Transplantation* **85**: 885-892.

Ding A, Ojingwa JC, McDonagh AF, Burlingame AL, and Benet LZ (1993) Evidence for covalent binding of acyl glucuronides to serum albumin via an imine mechanism as revealed by tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3797-3801.

Ding A, Zia-Amirhosseini P, McDonagh AF, Burlingame AL, and Benet LZ (1995) Reactivity of tolmetin glucuronide with human serum albumin. Identification of binding sites and mechanisms of reaction by tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* **23**: 369-376.

Donato MT and Castell JV (2003) Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P450 in drug metabolism: focus on in vitro studies. *Clin Pharmacokinet* **42**: 153-178.

Donato MT, Montero S, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, and Lahoz A (2010) Validated assay for studying activity profiles of human liver UGTs after drug exposure: inhibition and induction studies. *Anal Bioanal Chem* **396**: 2251-2263.

Donella-Deana A, Krinks MH, Ruzzene M, Klee C, and Pinna LA (1994) Dephosphorylation of phosphopeptides by calcineurin (protein phosphatase 2B). *Eur J Biochem* **219**: 109-117.

Elias E and Mills CO (2007) Coordinated defence and the liver. *Clin Med* **7**: 180-184.

Emamaullee J, Toso C, Merani S, and Shapiro AM (2009) Costimulatory blockade with belatacept in clinical and experimental transplantation - a review. *Expert Opin Biol Ther* **9**: 789-796.

- Fishman JA (2007) Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* **357**: 2601-2614.
- Frances B, Gout R, Monsarrat B, Cros J, and Zajac JM (1992) Further evidence that morphine-6 beta-glucuronide is a more potent opioid agonist than morphine. *J Pharmacol Exp Ther* **262**: 25-31.
- Frank M, Labov SE, Westmacott G, and Benner WH (1999) Energy-sensitive cryogenic detectors for high-mass biomolecule mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **18**: 155-186.
- Fruman DA, Pai SY, Klee CB, Burakoff SJ, and Bierer BE (1996) Measurement of Calcineurin Phosphatase Activity in Cell Extracts. *Methods* **9**: 146-154.
- Fung E.T. (2004) Strategies in clinical proteomics: from discovery to assay. *Preclinica* **2**: 253-258.
- Gao J, Garulacan LA, Storm SM, Opiteck GJ, Dubaquié Y, Hefta SA, Dambach DM, and Dongre AR (2005) Biomarker discovery in biological fluids. *Methods* **35**: 291-302.
- Ghosh SS, Sappal BS, Kalpana GV, Lee SW, Chowdhury JR, and Chowdhury NR (2001) Homodimerization of human bilirubin-uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase-1 (UGT1A1) and its functional implications. *J Biol Chem* **276**: 42108-42115.
- Gong CX, Shaikh S, Grundke-Iqbal I, and Iqbal K (1996) Inhibition of protein phosphatase-2B (calcineurin) activity towards Alzheimer abnormally phosphorylated tau by neuroleptics. *Brain Res* **741**: 95-102.
- Gong QH, Cho JW, Huang T, Potter C, Gholami N, Basu NK, Kubota S, Carvalho S, Pennington MW, Owens IS, and Popescu NC (2001) Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics* **11**: 357-368.
- Grgic I, Kiss E, Kaistha BP, Busch C, Kloss M, Sautter J, Muller A, Kaistha A, Schmidt C, Raman G, Wulff H, Strutz F, Grone HJ, Kohler R, and Hoyer J (2009) Renal fibrosis is attenuated by targeted disruption of KCa3.1 potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14518-14523.
- Guerini D (1997) Calcineurin: not just a simple protein phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 271-275.
- Guerrier L, Righetti PG, and Boschetti E (2008) Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library. *Nat Protoc* **3**: 883-890.
- Guillemette C, Levesque E, Harvey M, Bellemare J, and Menard V (2010) UGT genomic diversity: beyond gene duplication. *Drug Metab Rev* **42**: 22-42.
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, and Aebersold R (2000) Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9390-9395.

- Halloran PF (2004) Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* **351**: 2715-2729.
- Hashimoto Y, Perrino BA, and Soderling TR (1990) Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin. *J Biol Chem* **265**: 1924-1927.
- Hertig A, Verine J, Mougenot B, Jouanneau C, Ouali N, Sebe P, Glotz D, Ancel PY, Rondeau E, and Xu-Dubois YC (2006) Risk factors for early epithelial to mesenchymal transition in renal grafts. *Am J Transplant* **6**: 2937-2946.
- Hilton GC, Martinis JM, Wollman DA, Irwin KD, Dulcie LL, Gerber D, Gillevet PM, and Twerenbold D (1998) Impact energy measurement in time-of-flight mass spectrometry with cryogenic microcalorimeters. *Nature* **391**: 672-675.
- Hopfgartner G, Varesio E, Tschappat V, Grivet C, Bourgogne E, and Leuthold LA (2004) Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *J Mass Spectrom* **39**: 845-855.
- Horiuchi S, Higashi T, Ikeda K, Saishoji T, Jinnouchi Y, Sano H, Shibayama R, Sakamoto T, and Araki N (1996) Advanced glycation end products and their recognition by macrophage and macrophage-derived cells. *Diabetes* **45 Suppl 3**: S73-S76.
- Hubert P (1996) [Mechanism of activation of T-lymphocytes by CD3-receptor T complex]. *Rev Med Interne* **17**: 954-956.
- Ikushiro S, Sahara M, Emi Y, Yabusaki Y, and Iyanagi T (2004) Functional co-expression of xenobiotic metabolizing enzymes, rat cytochrome P450 1A1 and UDP-glucuronosyltransferase 1A6, in yeast microsomes. *Biochim Biophys Acta* **1672**: 86-92.
- Ingebritsen TS, Stewart AA, and Cohen P (1983) The protein phosphatases involved in cellular regulation. 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues; an assessment of their physiological roles. *Eur J Biochem* **132**: 297-307.
- Ishii Y, Takeda S, and Yamada H (2010) Modulation of UDP-glucuronosyltransferase activity by protein-protein association. *Drug Metab Rev* **42**: 140-153.
- Issaq HJ and Blonder J (2009) Electrophoresis and liquid chromatography/tandem mass spectrometry in disease biomarker discovery. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**: 1222-1228.
- Iwaki M, Bischer A, Nguyen AC, McDonagh AF, and Benet LZ (1995) Stereoselective disposition of naproxen glucuronide in the rat. *Drug Metab Dispos* **23**: 1099-1103.
- Iwaki M, Ogiso T, Inagawa S, and Kakehi K (1999) In vitro regioselective stability of beta-1-O- and 2-O-acyl glucuronides of naproxen and their covalent binding to human serum albumin. *J Pharm Sci* **88**: 52-57.
- Iyanagi T (2007) Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *Int Rev Cytol* **260**: 35-112.
- Izukawa T, Nakajima M, Fujiwara R, Yamanaka H, Fukami T, Takamiya M, Aoki Y, Ikushiro S, Sakaki T, and Yokoi T (2009) Quantitative analysis of UDP-

- glucuronosyltransferase (UGT) 1A and UGT2B expression levels in human livers. *Drug Metab Dispos* **37**: 1759-1768.
- Jarvis DL (2009) Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods Enzymol* **463**: 191-222.
- Jonscher KR and Yates JR, III (1997) The quadrupole ion trap mass spectrometer--a small solution to a big challenge. *Anal Biochem* **244**: 1-15.
- Karas M and Hillenkamp F (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**: 2299-2301.
- Karin M (1998) New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* **93**: 487-490.
- Kenny JR, Maggs JL, Tettey JN, Harrell AW, Parker SG, Clarke SE, and Park BK (2005) Formation and protein binding of the acyl glucuronide of a leukotriene B4 antagonist (SB-209247): relation to species differences in hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* **33**: 271-281.
- Khan A and Packer NH (2006) Simple urinary sample preparation for proteomic analysis. *J Proteome Res* **5**: 2824-2838.
- Kiang TK, Ensom MH, and Chang TK (2005) UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* **106**: 97-132.
- Kilford PJ, Stringer R, Sohal B, Houston JB, and Galetin A (2009) Prediction of drug clearance by glucuronidation from in vitro data: use of combined cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase cofactors in alamethicin-activated human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **37**: 82-89.
- Kilka S, Erdmann F, Migdoll A, Fischer G, and Weiwad M (2009) The proline-rich N-terminal sequence of calcineurin A β determines substrate binding. *Biochemistry* **48**: 1900-1910.
- Knechtle SJ, Pirsch JD, Fechner H, Becker BN, Friedl A, Colvin RB, Lebeck LK, Chin LT, Becker YT, Odorico JS, D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Hamawy MM, Hu H, Bloom DD, and Sollinger HW (2003) Campath-1H induction plus rapamycin monotherapy for renal transplantation: results of a pilot study. *Am J Transplant* **3**: 722-730.
- Kollock R, Rost K, Batke M, and Glatt H (2009) Effect of pentachlorophenol and 2,6-dichloro-4-nitrophenol on the activity of cDNA-expressed human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Toxicol Lett* **191**: 360-364.
- Kolopp-Sarda MN, Malcus C, and Kohler C (2008) Immunologie de la transplantation : rejets et infections en transplantation d'organes solides. *Revue Francophone des Laboratoires* 23-30.
- Kretz-Rommel A and Boelsterli UA (1994) Mechanism of covalent adduct formation of diclofenac to rat hepatic microsomal proteins. Retention of the glucuronic acid moiety in the adduct. *Drug Metab Dispos* **22**: 956-961.

Kumar GN, Dykstra J, Roberts EM, Jayanti VK, Hickman D, Uchic J, Yao Y, Surber B, Thomas S, and Granneman GR (1999) Potent inhibition of the cytochrome P-450 3A-mediated human liver microsomal metabolism of a novel HIV protease inhibitor by ritonavir: A positive drug-drug interaction. *Drug Metab Dispos* **27**: 902-908.

LaBaer J (2005) So, you want to look for biomarkers (introduction to the special biomarkers issue). *J Proteome Res* **4**: 1053-1059.

Lahoz A, Donato MT, Castell JV, and Gomez-Lechon MJ (2008) Strategies to in vitro assessment of major human CYP enzyme activities by using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Curr Drug Metab* **9**: 12-19.

Lapolla A, Basso E, and Traldi P (2005) Mass spectrometry of advanced glycation end products. *Adv Clin Chem* **40**: 165-217.

Le Meur Y, Buchler M, Thierry A, Caillard S, Villemain F, Lavaud S, Etienne I, Westeel PF, Hurault de LB, Rostaing L, Thervet E, Szelag JC, Rerolle JP, Rousseau A, Touchard G, and Marquet P (2007) Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. *Am J Transplant* **7**: 2496-2503.

Lee RS, Monigatti F, Briscoe AC, Waldon Z, Freeman MR, and Steen H (2008) Optimizing sample handling for urinary proteomics. *J Proteome Res* **7**: 4022-4030.

Linden A (2006) Measuring diagnostic and predictive accuracy in disease management: an introduction to receiver operating characteristic (ROC) analysis. *J Eval Clin Pract* **12**: 132-139.

Liu HX, He YQ, Hu Y, Liu Y, Zhang JW, Li W, Wang ZT, and Yang L (2008) Determination of UDP-glucuronosyltransferase UGT2B7 activity in human liver microsomes by ultra-performance liquid chromatography with MS detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **870**: 84-90.

Lu AY, Wang RW, and Lin JH (2003) Cytochrome P450 in vitro reaction phenotyping: a re-evaluation of approaches used for P450 isoform identification. *Drug Metab Dispos* **31**: 345-350.

Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, and Nebert DW (2005) Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* **15**: 677-685.

Mackenzie PI, Rogers A, Treloar J, Jorgensen BR, Miners JO, and Meech R (2008) Identification of UDP glycosyltransferase 3A1 as a UDP N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* **283**: 36205-36210.

MacMahon H, Vyborny CJ, Metz CE, Doi K, Sabeti V, and Solomon SL (1986) Digital radiography of subtle pulmonary abnormalities: an ROC study of the effect of pixel size on observer performance. *Radiology* **158**: 21-26.

Marko-Varga G, Lindberg H, Lofdahl CG, Jonsson P, Hansson L, Dahlback M, Lindquist E, Johansson L, Foster M, and Fehniger TE (2005) Discovery of biomarker candidates within disease by protein profiling: principles and concepts. *J Proteome Res* **4**: 1200-1212.

- McDonald V and Leandro M (2009) Rituximab in non-haematological disorders of adults and its mode of action. *Br J Haematol* **146**: 233-246.
- Meech R and Mackenzie PI (2010) UGT3A: novel UDP-glycosyltransferases of the UGT superfamily. *Drug Metab Rev* **42**: 43-52.
- Miners JO, Knights KM, Houston JB, and Mackenzie PI (2006) In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises. *Biochem Pharmacol* **71**: 1531-1539.
- Miners JO, Mackenzie PI, and Knights KM (2010) The prediction of drug-glucuronidation parameters in humans: UDP-glucuronosyltransferase enzyme-selective substrate and inhibitor probes for reaction phenotyping and in vitro-in vivo extrapolation of drug clearance and drug-drug interaction potential. *Drug Metab Rev* **42**: 189-201.
- Mischak H, Coon JJ, Novak J, Weissinger EM, Schanstra JP, and Dominiczak AF (2009) Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in biomarker discovery and clinical diagnosis: an update of recent developments. *Mass Spectrom Rev* **28**: 703-724.
- Moffat GJ, Burns A, Van MJ, Joiner R, and Ashby J (2001) Glucuronidation of nonylphenol and octylphenol eliminates their ability to activate transcription via the estrogen receptor. *Regul Toxicol Pharmacol* **34**: 182-187.
- Mondragon A, Griffith EC, Sun L, Xiong F, Armstrong C, and Liu JO (1997) Overexpression and purification of human calcineurin alpha from *Escherichia coli* and assessment of catalytic functions of residues surrounding the binuclear metal center. *Biochemistry* **36**: 4934-4942.
- Muramatsu T and Kincaid RL (1992) Molecular cloning and chromosomal mapping of the human gene for the testis-specific catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A). *Biochem Biophys Res Commun* **188**: 265-271.
- Naesens M, Kuypers DR, and Sarwal M (2009) Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* **4**: 481-508.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, and Chapman JR (2003) The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* **349**: 2326-2333.
- Olsen J, Bjornsdottir I, Tjornelund J, and Honore HS (2002) Chemical reactivity of the naproxen acyl glucuronide and the naproxen coenzyme A thioester towards bionucleophiles. *J Pharm Biomed Anal* **29**: 7-15.
- Olthoff JK, Lys IA, and Cotter RJ (1988) A pulsed time-of-flight mass spectrometer for liquid secondary ion mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2**: 171-175.
- Ouzzine M, Magdalou J, Burchell B, and Fournel-Gigleux S (1999) An internal signal sequence mediates the targeting and retention of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A6 to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **274**: 31401-31409.
- Owens IS, Basu NK, and Banerjee R (2005) UDP-glucuronosyltransferases: gene structures of UGT1 and UGT2 families. *Methods Enzymol* **400**: 1-22.

- Paul LC (2001) Immunologic risk factors for chronic renal allograft dysfunction. *Transplantation* **71**: SS17-SS23.
- Peddi VR, Bryant M, Roy-Chaudhury P, Woodle ES, and First MR (2002) Safety, efficacy, and cost analysis of thymoglobulin induction therapy with intermittent dosing based on CD3+ lymphocyte counts in kidney and kidney-pancreas transplant recipients. *Transplantation* **73**: 1514-1518.
- Pedrioli PG, Eng JK, Hubley R, Vogelzang M, Deutsch EW, Raught B, Pratt B, Nilsson E, Angeletti RH, Apweiler R, Cheung K, Costello CE, Hermjakob H, Huang S, Julian RK, Kapp E, McComb ME, Oliver SG, Omenn G, Paton NW, Simpson R, Smith R, Taylor CF, Zhu W, and Aebersold R (2004) A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research. *Nat Biotechnol* **22**: 1459-1466.
- Picard N, Cresteil T, Djebli N, and Marquet P (2005a) In vitro metabolism study of buprenorphine: evidence for new metabolic pathways. *Drug Metab Dispos* **33**: 689-695.
- Picard N, Cresteil T, Premaud A, and Marquet P (2004) Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit* **26**: 600-608.
- Picard N, Ratanasavanh D, Premaud A, Le MY, and Marquet P (2005b) Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos* **33**: 139-146.
- Poulter LW, Bradley NJ, and Turk JL (1974) Differential effect of azathioprine on theta-antigenicity of mouse lymphocytes. *Immunology* **26**: 777-785.
- Priego CF and Sanchez JC (2009) Strategies for proteomic analysis of non-enzymatically glycosylated proteins. *Mass Spectrom Rev* **28**: 135-146.
- Proctor NJ, Tucker GT, and Rostami-Hodjegan A (2004) Predicting drug clearance from recombinantly expressed CYPs: intersystem extrapolation factors. *Xenobiotica* **34**: 151-178.
- Qiu Y, Burlingame AL, and Benet LZ (1998) Mechanisms for covalent binding of benoxaprofen glucuronide to human serum albumin. Studies By tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* **26**: 246-256.
- Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, and . (1999d) The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* **55**: 713-723.
- Radomska-Pandya A, Bratton SM, Redinbo MR, and Miley MJ (2010) The crystal structure of human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 C-terminal end is the first mammalian UGT target to be revealed: the significance for human UGTs from both the 1A and 2B families. *Drug Metab Rev* **42**: 128-139.
- Radomska-Pandya A, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, and Magdalou J (2005) Structure of UDP-glucuronosyltransferases in membranes. *Methods Enzymol* **400**: 116-147.

- Rai AJ and Chan DW (2004) Cancer proteomics: Serum diagnostics for tumor marker discovery. *Ann N Y Acad Sci* **1022**: 286-294.
- Rifai N, Gillette MA, and Carr SA (2006) Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* **24**: 971-983.
- Ritter JK (2000) Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* **129**: 171-193.
- Roberts B, Pohl J, and Gooch JL (2008) A fluorimetric method for determination of calcineurin activity. *Cell Calcium* **43**: 515-519.
- Rock DA, Foti RS, and Pearson JT (2008) The combination of chemical and antibody inhibitors for superior P450 3A inhibition in reaction phenotyping studies. *Drug Metab Dispos* **36**: 2410-2413.
- Rodrigues AD (1999) Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping: attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **57**: 465-480.
- Rusnak F and Mertz P (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* **80**: 1483-1521.
- Saint-Marcoux F, Sauvage FL, and Marquet P (2007) Current role of LC-MS in therapeutic drug monitoring. *Anal Bioanal Chem* **388**: 1327-1349.
- Sanquer S, Schwarzingler M, Maury S, Yakouben K, Rafi H, Pautas C, Kuentz M, Barouki R, and Cordonnier C (2004) Calcineurin activity as a functional index of immunosuppression after allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* **77**: 854-858.
- Schuler W, Sedrani R, Cottens S, Haberlin B, Schulz M, Schuurman HJ, Zenke G, Zerwes HG, and Schreier MH (1997) SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation* **64**: 36-42.
- Sellar KJ, van Rossum HH, Romijn FP, Smit NP, de Fijter JW, and van PJ (2006) Spectrophotometric assay for calcineurin activity in leukocytes isolated from human blood. *Anal Biochem* **358**: 104-110.
- Shelby MK and Klaassen CD (2006) Induction of rat UDP-glucuronosyltransferases in liver and duodenum by microsomal enzyme inducers that activate various transcriptional pathways. *Drug Metab Dispos* **34**: 1772-1778.
- Shibasaki F, Hallin U, and Uchino H (2002) Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem* **131**: 1-15.
- Shipkova M, Armstrong VW, Oellerich M, and Wieland E (2003) Acyl glucuronide drug metabolites: toxicological and analytical implications. *Ther Drug Monit* **25**: 1-16.
- Shou M and Lu AY (2009) Antibodies as a probe in cytochrome P450 research. *Drug Metab Dispos* **37**: 925-931.

- Smith PC, Benet LZ, and McDonagh AF (1990a) Covalent binding of zomepirac glucuronide to proteins: evidence for a Schiff base mechanism. *Drug Metab Dispos* **18**: 639-644.
- Smith PC and Liu JH (1993) Covalent binding of suprofen acyl glucuronide to albumin in vitro. *Xenobiotica* **23**: 337-348.
- Smith PC and Liu JH (1995) Covalent binding of suprofen to renal tissue of rat correlates with excretion of its acyl glucuronide. *Xenobiotica* **25**: 531-540.
- Smith RD, Loo JA, Edmonds CG, Barinaga CJ, and Udseth HR (1990b) New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Anal Chem* **62**: 882-899.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickeleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, and Valente M (2008) Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* **8**: 753-760.
- Sollinger HW (1995) Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* **60**: 225-232.
- Soreide K (2009) Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research. *J Clin Pathol* **62**: 1-5.
- Strassburg CP, Strassburg A, Nguyen N, Li Q, Manns MP, and Tukey RH (1999) Regulation and function of family 1 and family 2 UDP-glucuronosyltransferase genes (UGT1A, UGT2B) in human oesophagus. *Biochem J* **338** (Pt 2): 489-498.
- Sun W, Chen Y, Li F, Zhang L, Yang R, Zhang Z, Zheng D, and Gao Y (2009) Dynamic urinary proteomic analysis reveals stable proteins to be potential biomarkers. *Proteomics Clinical Applications* **3**: 370-382.
- Swanson SK, Born T, Zydowsky LD, Cho H, Chang HY, Walsh CT, and Rusnak F (1992) Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3741-3745.
- Takemoto SK, Zeevi A, Feng S, Colvin RB, Jordan S, Kobashigawa J, Kupiec-Weglinski J, Matas A, Montgomery RA, Nickerson P, Platt JL, Rabb H, Thistlethwaite R, Tyran D, and Delmonico FL (2004) National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am J Transplant* **4**: 1033-1041.
- Terrier N, Benoit E, Senay C, Lopicque F, Radomska-Pandya A, Magdalou J, and Fournel-Gigleux S (1999) Human and rat liver UDP-glucuronosyltransferases are targets of ketoprofen acylglucuronide. *Mol Pharmacol* **56**: 226-234.
- Thatcher BJ and Caputo E. Medical Applications of Mass Spectrometry. Vékey K., Telekes A., and Vertes A. (2008) Biomarker discovery [Elsevier B.V.], 505-532.
Ref Type: Conference Proceeding

Theodorescu D, Fliser D, Wittke S, Mischak H, Krebs R, Walden M, Ross M, Eltze E, Bettendorf O, Wulfing C, and Semjonow A (2005) Pilot study of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a tool to define potential prostate cancer biomarkers in urine. *Electrophoresis* **26**: 2797-2808.

Thongboonkerd V (2007) Practical points in urinary proteomics. *J Proteome Res* **6**: 3881-3890.

Thongboonkerd V, Chutipongtanate S, and Kanlaya R (2006) Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality, and variability. *J Proteome Res* **5**: 183-191.

Thornalley PJ (2005) Measurement of protein glycation, glycated peptides, and glycation free adducts. *Perit Dial Int* **25**: 522-533.

Toide K, Terauchi Y, Fujii T, Yamazaki H, and Kamataki T (2004) Uridine diphosphate sugar-selective conjugation of an aldose reductase inhibitor (AS-3201) by UDP-glucuronosyltransferase 2B subfamily in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **67**: 1269-1278.

Tukey RH and Strassburg CP (2000) Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 581-616.

Turgeon D, Carrier JS, Levesque E, Hum DW, and Belanger A (2001) Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members. *Endocrinology* **142**: 778-787.

Uchaipichat V, Mackenzie PI, Elliot DJ, and Miners JO (2006) Selectivity of substrate (trifluoperazine) and inhibitor (amitriptyline, androsterone, canrenoic acid, hecogenin, phenylbutazone, quinidine, quinine, and sulfinpyrazone) "probes" for human udp-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* **34**: 449-456.

Ueyama J, Wang D, Kondo T, Saito I, Takagi K, Takagi K, Kamijima M, Nakajima T, Miyamoto K, Wakusawa S, and Hasegawa T (2007) Toxicity of diazinon and its metabolites increases in diabetic rats. *Toxicol Lett* **170**: 229-237.

van Rossum HH, Romijn FP, Sellar KJ, Smit NP, van der Boog PJ, de Fijter JW, and van PJ (2008) Variation in leukocyte subset concentrations affects calcineurin activity measurement: implications for pharmacodynamic monitoring strategies. *Clin Chem* **54**: 517-524.

Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Obach RS, and Greenblatt DJ (2000) Microsomal binding of amitriptyline: effect on estimation of enzyme kinetic parameters in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **293**: 343-350.

Vestal ML and Campbell JM (2005) Tandem time-of-flight mass spectrometry. *Methods Enzymol* **402**: 79-108.

Vincenti F, Kirkman R, Light S, Bumgardner G, Pescovitz M, Halloran P, Neylan J, Wilkinson A, Ekberg H, Gaston R, Backman L, and Burdick J (1998) Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N Engl J Med* **338**: 161-165.

Vincenti F, Silva HT, Busque S, Yoshida A, O'Connell P, Friedewald J, Russ G, Cohney S, Budde K, Cibrik D, Kim YS, Grinyo J, Lawendy N, Kudlacz E, Lan S, and Chan G. A Phase 2B Study of CNI-Free Immunosuppression with the JAK Inhibitor CP-690, 550 in De Novo Kidney Transplant Patients: 6-Month Interim Analysis. (2010) American Transplant Congress.

Ref Type: Conference Proceeding

Wang M, Gorrell MD, Abbott CA, Jaggi R, Marguet D, and Dickinson RG (2002) Hepatic covalent adduct formation with zomepirac in the CD26-deficient mouse. *J Gastroenterol Hepatol* **17**: 66-71.

Wang M, Gorrell MD, McGaughan GW, and Dickinson RG (2001) Dipeptidyl peptidase IV is a target for covalent adduct formation with the acyl glucuronide metabolite of the anti-inflammatory drug zomepirac. *Life Sci* **68**: 785-797.

Wang YL, Wang Y, Tong L, and Wei Q (2008) Overexpression of calcineurin B subunit (CnB) enhances the oncogenic potential of HEK293 cells. *Cancer Sci* **99**: 1100-1108.

Weickhardt C, Draack L, and Amirav A (2003) Laser desorption combined with hyperthermal surface ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* **75**: 5602-5607.

Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, and Fenn JB (1985) Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem* **57**: 675-679.

Wiley WC (1956) Bendix Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Science* **124**: 817-820.

Wilkening S, Stahl F, and Bader A (2003) Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* **31**: 1035-1042.

Wilm M and Mann M (1996) Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* **68**: 1-8.

Workman P (2002) Challenges of PK/PD measurements in modern drug development. *Eur J Cancer* **38**: 2189-2193.

Yamamoto T (2010) The 4th Human Kidney and Urine Proteome Project (HKUPP) workshop. 26 September 2009, Toronto, Canada. *Proteomics* **10**: 2069-2070.

Yano I (2008) Pharmacodynamic monitoring of calcineurin phosphatase activity in transplant patients treated with calcineurin inhibitors. *Drug Metab Pharmacokinet* **23**: 150-157.

Zhou H, Yuen PS, Pisitkun T, Gonzales PA, Yasuda H, Dear JW, Gross P, Knepper MA, and Star RA (2006) Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int* **69**: 1471-1476.

Zweig MH and Campbell G (1993) Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* **39**: 561-577.