

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
2 décembre 2010 (02.12.2010)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2010/136706 A1

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2010/050991

(22) Date de dépôt international :
21 mai 2010 (21.05.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0953576 29 mai 2009 (29.05.2009) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOMÉRIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy L'étoile (FR).
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I
[FR/FR]; 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, F-69622
Villeurbanne Cedex (FR). CENTRE NATIONAL DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 Rue
Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
LEMOINE, Jérôme [FR/FR]; 59 rue des vignes,
F-69480 Lucenay (FR). SALVADOR, Arnaud [FR/FR];
16 rue E. Hemingway, F-38080 L'île d'Abeau (FR).
CHARRIER, Jean-Philippe [FR/FR]; 28 rue B.
Thimonnier, F-69160 Tassin La Demi-Lune (FR).
FORTIN, Tanguy [FR/FR]; 2 rue de la République,
F-38300 Bourgoin-Jaillieu (FR).

(74) Mandataire : SARLIN, Laure; Cabinet Beau de
Loménie, 51 Avenue Jean Jaurès, BP 7073, F-69301
Lyon Cedex 07 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues (règle 48.2.h)
- avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2.a)

(54) Title : NOVEL METHOD FOR QUANTIFYING PROTEINS BY MASS SPECTROMETRY

(54) Titre : NOUVEAU PROCEDE DE QUANTIFICATION DE PROTEINES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

(57) Abstract : The present invention relates to a method for the quantitative detection of a target protein in a sample, in which the second-generation fragment ions are detected for providing a series of quantitative measurements, at least one of which is correlated to the amount of proteotypic peptide generated and to the amount of target protein in the sample, characterized in that the selected first-generation fragment ion having a mass (m/z)₂ is a doubly-charged peptide having a proline and/or a histidine in position 1.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé pour détecter, de manière quantitative, une protéine cible dans un échantillon, dans lequel des ions fragments de seconde génération sont détectés pour donner une série de mesures quantitatives, dont au moins une est corrélée à la quantité du peptide protéotypique généré et à la quantité de protéine cible présente dans l'échantillon, caractérisé en ce que l'ion fragment de première génération de masse (m/z)₂ sélectionné est un peptide doublement chargé qui présente, une proline et/ou une histidine en position 1.



WO 2010/136706 A1

Nouveau procédé de quantification de protéines par spectrométrie de masse

La présente invention concerne le domaine technique du dosage quantitatif de protéines. En particulier, la présente invention concerne un nouveau procédé de dosage quantitatif de protéine par spectrométrie de masse.

De nombreuses techniques de dosage quantitatif de protéines ont été développées, le dosage de protéines dans des fluides complexes comme des échantillons sanguins (sérum, plasma) de patients étant d'une importance capitale en diagnostic. Les dosages ELISA (dosage d'immunosorption liée à enzyme, de l'anglais « Enzyme-linked immunosorbent assay ») sont les plus utilisés à ce jour. Parmi les différentes techniques ELISA connues, la réaction de type sandwich est la plus utilisée. Elle nécessite deux anticorps de la protéine d'intérêt, l'un étant lié à l'enzyme. Plus récemment, le dosage quantitatif de protéines, *via* leurs peptides protéotypiques, par des techniques de spectrométrie de masse telles que la SRM de l'anglais « Selected Reaction Monitoring » ou la MRM de l'anglais « Multiple Reaction Monitoring » lorsque plusieurs dosages SRM sont réalisés simultanément, a été validé, dans des fluides complexes, par la demanderesse (T. Fortin et al., MCP, 2008 E-pub) et d'autres (L. Anderson & C. Hunter, MCP, 2006, 573-588 ; H. Zhang et al., MCP, 2007, 64-71). En amont du dosage par spectrométrie de masse, les protéines à doser sont digérées, grâce à une enzyme, pour fragmenter les protéines en peptides. Les peptides spécifiques de la protéine, nommés peptides protéotypiques, sont alors dosés par spectrométrie de masse.

L'avantage des dosages par SRM ou MRM par rapport aux dosages ELISA, est une réduction considérable du coût et de la durée de développement du dosage, notamment si des anticorps nécessaires au dosage ELISA doivent être développés. De telles techniques par spectrométrie de masse apparaissent donc comme des méthodes de choix pour le dosage de protéines, et permettraient, par exemple de valider, plus simplement et plus rapidement, l'intérêt clinique du dosage des nombreuses

protéines identifiées comme marqueurs potentiels par les recherches en analyse protéomique (S. Carr & L. Anderson, Clin. Chem. 2008, 1749-1752).

Dans le cas d'un dosage MRM, dans un spectromètre de masse de type triple quadripôle, particulièrement adapté au mode MRM, les peptides protéotypiques sont quantifiés selon le principe détaillé ci-après. Tout d'abord, l'échantillon contenant les peptides à doser est introduit dans une source d'ionisation, où les peptides sont ionisés à l'état gazeux et transformés en ions dits moléculaires qui correspondent aux peptides initiaux avec un, deux, voire trois protons supplémentaires et sont donc porteurs de une, deux, voire trois charges. On obtient par exemple, grâce à une source de type électrospray, une ionisation des peptides, tout en les faisant passer d'un état liquide à un état gazeux (Gaskell, Electrospray: principles and practise, J. Mass Spectrom. (1997), 32, 677-688). Ce type de source est particulièrement bien adapté, lorsque les peptides sont préalablement séparés par chromatographie liquide en phase inverse. Néanmoins, le rendement d'ionisation des peptides peut varier en fonction de la concentration et de la nature des différentes espèces en présence. Ce phénomène se traduit par un effet matrice bien connu de l'homme de l'art. Par ailleurs, il est également possible d'ioniser les peptides à partir d'un état solide grâce à une source MALDI (de l'anglais « Matrice Assisted Laser Desorption Ionisation »).

Ensuite, un analyseur quadripolaire (Q1) permet de filtrer les peptides protéotypiques en fonction de leur ratio masse sur charge (m/z). Seuls les peptides ayant le ratio masse/charge du peptide protéotypique recherché, ratio appelé $(m/z)_1$, sont transmis dans le deuxième quadripôle (q2) et jouent le rôle d'ions précurseurs pour la fragmentation ultérieure.

L'analyseur q2 permet de fragmenter les peptides de ratio masse/charge $(m/z)_1$ en ions fragments de première génération. La fragmentation est généralement obtenue par collision des peptides précurseurs avec un gaz inerte, comme de l'azote ou de l'argon.

Les ions fragments de première génération sont transmis dans un troisième quadripôle (Q3) qui filtre les ions fragments de première

génération en fonction d'un ratio masse sur charge spécifique, ratio appelé $(m/z)_2$. Seuls les ions fragments de première génération ayant le ratio masse/charge d'un fragment caractéristique du peptide protéotypique recherché $(m/z)_2$ sont transmis dans le détecteur pour être quantifiés.

5 Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité, en relation avec la sélection de l'ion précurseur d'une part et de la sélection de l'ion fragment de première génération d'autre part. La spectrométrie de masse en mode MRM est donc avantageuse pour la quantification.

L'intensité de courant induit par les ions fragments de première
10 génération, mesurée dans le détecteur, est proportionnelle à la quantité d'ions fragments de première génération, elle-même proportionnelle à la quantité d'ions précurseurs, elle-même proportionnelle à la quantité de protéine à doser. La quantité de courant dosée, induit par les ions fragments de première génération, est donc directement proportionnelle à la quantité
15 de la protéine à doser. Un calibrage est néanmoins nécessaire pour pouvoir corrélérer l'aire du pic mesurée, correspondant à la quantité de courant induit par les ions fragments de première génération, à la quantité d'ions fragments de première génération correspondant, et au final à la quantité de protéine à doser. Les couples $(m/z)_1$ et $(m/z)_2$, baptisés transitions, peuvent être dosés
20 dans différents modèles de spectromètre de masse pouvant fonctionner en mode MRM ou en mode MS/MS (ou MS^2). A titre d'exemple on peut citer les modèles de type triple quadripôle (L. Anderson & C. Hunter, MCP, 2006, 573-588...), ou de type trappe ionique (B. Han & R. Higgs, Brief Funct Genomic Proteomic. 2008 Sep;7(5):340-54), ou encore de type temps de vol (MALDI-
25 TOF) (K.-Y. Wang et al, Anal Chem, 2008, 80(16) 6159-6167).

Les transitions utilisées pour doser une protéine doivent être caractéristiques de la protéine à doser et conduire aux dosages les plus sensibles, les plus spécifiques et les plus robustes possibles, en termes de reproductibilité et fiabilité. Ils doivent, pour cela, faire l'objet d'un choix
30 minutieux.

Dans les méthodes développées pour la sélection des peptides protéotypiques $(m/z)_1$ et $(m/z)_2$, le choix est essentiellement basé sur

l'intensité de la réponse. Pour plus de détails, on pourra se référer à V. Fusaro et al., Nature Biotech. 27 ; 2009 ; 190-198. La qualité de la séparation des peptides, en amont du dosage, la composition en acides aminés, l'absence d'un peptide précurseur identique dans une autre protéine susceptible d'être présente et l'état de charge du peptide précurseur sont également des facteurs qui sont pris en compte dans la sélection. En général, les masses générées par fragmentation de l'ion précurseur sont mesurées en mode MRM ou en mode MS/MS (MS^2). Puis, l'ion fragment de première génération conduisant au signal le plus intense est sélectionné.

5

10 Ensuite, les conditions de fragmentation de l'ion précurseur et les conditions d'analyse sont optimisées pour maximiser le signal obtenu. Il est connu qu'il est favorable de sélectionner des ions doublement chargés en Q1, et des ions fragments de première génération monochargés en Q3, de préférence de ratio m/z plus élevé que celui de l'ion précurseur dichargé.

15 Des logiciels commerciaux, tels que les logiciels MIDAS et MRM Pilote d'Applied Biosystems ou encore MRMAid (J. Mead et al., MCP, 15 nov 2008, E-pub) pourront être utilisés par l'homme de l'art, pour lui permettre de prédire tous les couples de transitions possibles. Il pourra également être fait appel à une base de données nommée PeptideAtlas, construite par F. Desiere et al.,

20 (Nucleic Acids Res. 2006, Jan 1 ; 34(database issue) : D655-8) pour compiler l'ensemble des transitions MRM de peptides, décrites par la communauté scientifique. Cette base PeptideAtlas est disponible en accès libre sur internet.

Une approche alternative pour sélectionner les peptides protéotypiques

25 $(m/z)_1$ et $(m/z)_2$ consiste à utiliser les spectres de fragmentation MS/MS obtenus à l'occasion d'autres travaux. Ces travaux peuvent être, par exemple, les phases de découverte et d'identification des biomarqueurs par analyse protéomique. Cette approche a été proposée par Thermo Scientific lors de réunion utilisateurs (J. Mead et al., MCP, 15 nov 2008, E-pub). Elle

30 permet de générer une liste de transitions candidates à partir des peptides identifiés expérimentalement par le logiciel SIEVE (Thermo Scientific).

Certains critères ont été détaillés par J. Mead et al. (MCP, supra) pour le choix des ions $(m/z)_1$ et $(m/z)_2$ et sont détaillés ci-après :

- 5 • Les peptides avec des sites de clivage interne, c'est à dire avec de la Lysine ou de l'Arginine interne, doivent être évités, sauf si la Lysine ou l'Arginine est suivie par de la Proline,
- Les peptides avec de l'Asparagine ou de la Glutamine doivent être évités car ils peuvent se désaminer,
- Les peptides avec de la Glutamine ou de l'Acide Glutamique en N-terminal doivent être évités car ils peuvent se cycliser spontanément,
- 10 • Les peptides avec de la Méthionine doivent être évités car ils peuvent être oxydés,
- Les peptides avec de la Cystéine doivent être évités car ils peuvent être modifiés de façon non reproductible lors d'une éventuelle étape de dénaturation, réduction et blocage des fonctions thiols,
- 15 • Les peptides avec de la Proline peuvent être considérés comme favorables parce qu'ils produisent généralement des fragments intenses en MS/MS avec un seul pic très majoritaire. Cependant, un seul fragment très majoritaire ne permet pas de valider l'identité de la transition dans un mélange complexe. En effet, seule la présence
- 20 simultanée de plusieurs fragments caractéristiques permet de vérifier que l'ion précurseur recherché est bien détecté,
- Les peptides ayant une Proline adjacente au C-terminal (position n-1) ou en seconde position par rapport au C-terminal (position n-2) sont à éviter car, dans ce cas, la taille du peptide fragment de première
- 25 génération est généralement considérée comme trop petite pour être suffisamment spécifique,
- La sélection de fragments ayant une masse supérieure au précurseur est à privilégier pour favoriser la spécificité. Pour cela, il faut sélectionner un ion précurseur dichargé et sélectionner l'ion fragment
- 30 de première génération le plus intense ayant une masse supérieure au précurseur, c'est à dire un ion fragment de première génération monochargé.

Par ailleurs, le plus souvent, pour assurer une sensibilité et une spécificité compatibles avec le dosage de protéine à une concentration de quelques ng/ml dans un fluide complexe (sang, sérum, plasma, urine, selle, crachat...), le dosage quantitatif par spectrométrie de masse doit être
5 précédé, en plus de l'étape de digestion, d'autres étapes venant s'intercaler avec l'étape de digestion, comme par exemple :

Phase 1 : fractionnement des protéines pour éliminer les protéines majoritaires, ne correspondant pas à la protéine à doser, ou encore une purification de l'échantillon par toute technique appropriée : électrophorèse,
10 chromatographie, immunocapture (Kulasingam et al., J. Proteome Res., 2008, 640-647). Néanmoins, cette dernière technique nécessite l'existence ou la préparation d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine à doser, ce qui peut être long et coûteux à obtenir. De plus, les performances ultérieures du dosage par spectrométrie de masse seront en partie liées à la
15 qualité et à la spécificité de l'anticorps.

Phase 2 : dénaturation, réduction et blocage des fonctions thiols.

Phase 3 : digestion.

Phase 4 : fractionnement des peptides.

La phase 2 permet d'augmenter le rendement de digestion et assure
20 une meilleure robustesse du dosage, en termes de reproductibilité et fiabilité. Les phases 1 et 4 sont optionnelles lorsqu'une grande sensibilité n'est pas requise (L. Anderson & C. Hunter, MCP, supra). En revanche, elles sont indispensables lorsqu'une grande sensibilité est nécessaire (quelques ng/ml). C'est ce qui a été démontré par T. Fortin et al., supra, H. Keshishian et al.,
25 MCP, 2007, 2212-2229 et V. Kulasingam et al., J. Proteome Res., 2008, 640-647, L. Anderson et al., J. Proteome Res., 2004, 235-2344 et US 2004/0072251. En effet, compte tenu de la précision des triples quadripôles en Q1 et Q3, de nombreux peptides — peptides isobariques ou quasi-isobariques — peuvent générer des transitions identiques ou comprises dans
30 les tolérances de masse de l'instrument (J. Sherman et al., Proteomics, 2008, 9 :1120-1123). Dans ce cas, l'injection simultanée d'un peptide protéotypique et d'un contaminant isobarique ou quasi-isobarique conduit à une

quantification erronée par défaut de spécificité. La séparation des peptides par chromatographie en amont de la spectrométrie de masse apporte un niveau supplémentaire de spécificité en réduisant le nombre de peptides contaminants (M. Duncan et al., *Proteomics*, 2009, 9 :1124-1127). Mais cette

5 étape de fractionnement supplémentaire peut ne pas être suffisante (H. Keshishian et al., *supra*), ce qui rend nécessaire de valider avec précaution toute transition utilisée pour quantifier une protéine. En outre, un procédé de dosage complet comprenant les phases 1, 2 et 4 en plus de l'étape de digestion, notamment lorsque des anticorps doivent être utilisés lors de la

10 phase 1 ou 4, est long et coûteux.

Plus récemment une technique nommée MRM³ a été mise en œuvre pour détecter des protéines. Cette technique consiste à sélectionner un ion fragment de première génération, et à le soumettre à une nouvelle fragmentation pour générer des ions fragments de deuxième génération.

15 C'est alors ces ions fragments de deuxième génération qui sont détectés. J. Niessen et al. (*MCP*, 23 février 2009, E-Pub) notamment ont utilisé le triplé : précurseur / ion fragment de première génération / ion fragment de deuxième génération (baptisés transitions MRM³) **SEQ ID N°1** : VLLQTLR (2 fois chargé) / **SEQ ID N°2** : LLQTLR (2 fois chargé) / **SEQ ID N°3** : LQTLR

20 (1 fois chargé). Toutefois, les auteurs ne commentent pas les raisons du choix de cette transition MRM³ en particulier, et se contentent uniquement de mettre en évidence la présence de la protéine cible, sans effectuer de dosage de cette dernière. Plus récemment, A. Izrael-Tomasevic et al. (*Journal of Proteome Research*, Targeting Interferon Alpha Subtypes in serum : A comparison of analytical approaches to the detection and quantitation of proteins in complex biological mixtures, date de publication sur internet : 7 avril 2009) ont utilisé la MS³ pour la détection de IFN-alpha, la MS³ se distinguant de la MRM³ en ce que la totalité du spectre de MS³ est utilisé pour qualifier la nature du peptide protéotypique analysé. Pour cela,

25 les auteurs sélectionnent, pour la détection de IFN-alpha 4, un ion moléculaire **SEQ ID N°4** : HDFGFPPQEEFGNQFQK (3 fois chargé) et l'ion y_{15}^{2+} **SEQ ID N°5** : DFGFPQEEFGNQFQK (deux fois chargé) en ion fragment

30

de première génération qui est soumis à une deuxième fragmentation, ainsi que pour l'ensemble des sous-types de IFN-alpha 4, un ion moléculaire **SEQ ID N°6** : YSPCAWEVVR (deux fois chargé) et l'ion y_8^{2+} **SEQ ID N°7** : PCAWEVVR (deux fois chargé) en ion fragment de première génération qui est soumis à une deuxième fragmentation. Aucun dosage quantitatif n'est effectué ni en mode MRM³, ni en mode MS³, et les auteurs soulignent que la quantification avec une trappe ionique de l'IFN-alpha n'est pas satisfaisante. Les auteurs constatent que même si le rapport signal/bruit des ions fragments de deuxième génération est amélioré en MS³, le nombre de coups est au moins mille fois plus faible qu'en FT-ICR et concluent qu'ils ont privilégié les approches SRM (MS2) et AMT (de l'anglais « Accurate Mass and Time ») (MS sans fragmentation).

Dans ce contexte, la présente invention se propose de fournir un nouveau procédé de dosage de protéine, mettant en œuvre une technique de spectrométrie de masse qui soit fiable, facile à mettre en œuvre, et ce à faible coût. L'invention se propose de fournir un procédé de dosage de protéine mettant en œuvre la MRM³ et qui repose également sur un choix spécifique d'ions fragments de première génération, autorisant un tel dosage quantitatif satisfaisant.

L'invention concerne un procédé pour détecter, de manière quantitative, une protéine cible dans un échantillon comprenant les étapes suivantes :

- a) le traitement de l'échantillon pour générer des peptides,
- b) le dosage quantitatif, d'au moins un peptide protéotypique généré à partir de la protéine cible, par une technique de spectrométrie de masse dans laquelle :
 - i) le peptide protéotypique est ionisé en ions précurseurs qui sont filtrés en fonction de leur masse m/z , et un ion précurseur de masse $(m/z)_1$ donné est sélectionné en fonction de la protéine cible recherchée,
 - ii) l'ion précurseur sélectionné est fragmenté en ions fragments de première génération,

- iii) les ions fragments de première génération générés sont filtrés en fonction de leur masse m/z et un ion fragment de première génération de masse $(m/z)_2$ donné est sélectionné en fonction de la protéine cible recherchée,
- 5 iv) l'ion fragment de première génération sélectionné est fragmenté en ions fragments de deuxième génération,
- v) au moins une partie des ions fragments de seconde génération sont détectés pour donner une série de mesures quantitatives,
- 10 vi) au moins une mesure quantitative associée à un ion fragment de seconde génération est sélectionnée, et corrélée à la quantité du peptide protéotypique généré et à la quantité de protéine cible présente dans l'échantillon,

caractérisé en ce que l'ion fragment de première génération de masse
15 $(m/z)_2$ sélectionné est un peptide doublement chargé qui présente une proline et/ou une histidine en position 1.

La description qui suit permet de mieux comprendre l'invention. En préliminaire, certaines définitions des termes employés sont données ci-dessous.

20 Par « peptide », on entend un enchaînement d'au moins deux acides aminés. Les acides aminés en question peuvent être des acides aminés naturels, ou encore des acides aminés naturels modifiés tels que des acides aminés modifiés par action enzymatique.

En général, on nomme « peptide », un enchaînement de 2 à 100 acides
25 aminés. Un enchaînement d'un nombre supérieur à 6 acides aminés pourra également être nommé « protéine », ces deux notions ne pouvant pas être séparées par une frontière claire. Dans le cadre de l'invention, on désignera par « protéine », les enchaînements d'acides aminés initialement présents dans l'échantillon et par « peptides », les enchaînements d'acides aminés
30 issus du clivage d'au moins une liaison peptidique des protéines initiales ou de leurs peptides, par exemple par digestion, coupure chimique ou fragmentation dans un spectromètre de masse. Le terme « protéine » inclut

les holoprotéines et les hétéroprotéines comme les nucléoprotéines, les lipoprotéines, les phosphoprotéines, les métalloprotéines et les glycoprotéines, les enzymes, les récepteurs, les anticorps, les antigènes.

Les protéines susceptibles d'être dosées par le procédé de l'invention
5 sont, notamment, des protéines comportant au moins un peptide composé de n acides aminés, qui comporte lui-même au moins une proline au niveau des positions 2 à $n-2$ et/ou une histidine au niveau des positions 1 à $n-2$ qui sera obtenu après clivage de la protéine initiale. De préférence, ce peptide comprend de 1 à 15 acides aminés et au moins 6 acides aminés.

10 Par « peptide protéotypique », on entend un peptide généré par traitement d'une protéine pour la fragmenter en peptides, qui est caractéristique de ladite protéine ou d'une famille de protéines très proches, à laquelle appartient ladite protéine.

Par « échantillon », on entend tout échantillon susceptible de contenir
15 la protéine à détecter. L'échantillon peut être d'origine biologique, soit animale, végétale ou humaine. Il peut alors correspondre à un prélèvement de fluide biologique (sang total, sérum, plasma, urine, liquide céphalo-rachidien, sécrétion organique, par exemple), un prélèvement tissulaire ou des cellules isolées. Ce prélèvement peut être utilisé tel quel ou, peut, à
20 moins qu'il n'en soit spécifié autrement dans la description, subir préalablement à l'analyse, une préparation de type enrichissement, extraction, concentration, purification, selon des méthodes connues de l'homme du métier. L'échantillon peut être d'origine industrielle, soit, selon une liste non exhaustive un prélèvement d'air, un prélèvement d'eau, un
25 prélèvement effectué sur une surface, une pièce ou un produit manufacturé, un produit d'origine alimentaire. Parmi les échantillons d'origine alimentaire, on peut citer de façon non exhaustive un échantillon de produits lactés (yaourts, fromages,), de viande, de poisson, d'œufs, de fruits, de légumes, d'eau, de boisson (lait, jus de fruits, soda, etc). Ces échantillons d'origine
30 alimentaire peuvent aussi provenir de sauces ou de plats élaborés. Un échantillon alimentaire peut enfin être issu d'une alimentation destinée aux animaux, telle que notamment des farines animales.

Le ratio m/z correspond au rapport masse sur charge des peptides ionisés utilisés dans le cadre de l'invention. On parlera indifféremment, pour parler de ce ratio m/z , de rapport masse sur charge, de ratio, et même de masse. L'unité de ce ratio est en Th, mais on pourra également la donner en 5 Da, par extension avec son appellation de « masse ».

La première étape a) du procédé selon l'invention correspond à un traitement des protéines contenues dans l'échantillon d'intérêt. L'ensemble des protéines de l'échantillon sont traitées pour fragmenter les protéines en peptides, par exemple par digestion avec une enzyme protéolytique 10 (protéase), ou par action d'un réactif chimique. En effet, le clivage des protéines peut être fait par un traitement physico-chimique, par un traitement biologique ou par une combinaison des deux traitements. Parmi les traitements utilisables, on peut citer le traitement par des radicaux hydroxyle, notamment avec de l' H_2O_2 . Le traitement par les radicaux 15 hydroxyle provoque une coupure des liaisons peptidiques qui se fait de manière aléatoire sur n'importe quelle liaison peptidique de la protéine. La concentration en radicaux hydroxyle conditionne le nombre de clivages opérés et donc la longueur des fragments peptidiques obtenus. D'autres traitements chimiques peuvent également être utilisés comme, par exemple, 20 le traitement au bromure de cyanogène (CNBr) qui scinde spécifiquement les liaisons peptidiques au niveau du groupe carboxylique des résidus méthionyle. Il est également possible de réaliser un clivage acide partiel au niveau des résidus aspartyle par chauffage à $1000^{\circ}C$ d'une solution de protéines dans de l'acide trifluoroacétique.

25 Le traitement des protéines par digestion enzymatique est néanmoins préféré. Par rapport au traitement physico-chimique, il préserve d'avantage la structure des protéines, et est plus facile à contrôler. Par « digestion enzymatique », on entend l'action simple ou combinée d'une ou de plusieurs enzymes dans des conditions de réaction appropriées. Les enzymes 30 effectuant la protéolyse, appelées protéases, coupent les protéines à des endroits spécifiques. Chaque protéase reconnaît généralement une séquence d'acides aminés au sein desquels elle effectue toujours la même coupure.

Certaines protéases reconnaissent un seul acide aminé ou une séquence de deux acides aminés entre lesquels elles opèrent un clivage, d'autres protéases ne reconnaissent que des séquences plus longues. Ces protéases peuvent être des endoprotéases ou des exoprotéases. Parmi les protéases connues on peut citer, comme décrit dans WO2005/098071 :

5 - les enzymes spécifiques comme la trypsine qui scinde la liaison peptidique au niveau du groupe carboxylique des résidus Arg et Lys, l'endolysine qui clive la liaison peptidique du groupe -CO des lysines, la chymotrypsine qui hydrolyse la liaison peptidique au niveau du groupe carboxylique des résidus
10 aromatiques (Phe, Tyr et Trp), la pepsine qui coupe au niveau du groupe NH₂ des résidus aromatiques (Phe, Tyr et Trp), la protéase V8 de la souche V8 de *Staphylococcus aureus* qui clive la liaison peptidique au niveau du groupe carboxylique du résidu Glu ;

15 - les enzymes non-spécifiques comme la thermolysine provenant de la bactérie *Bacillus thermoproteolyticus* qui hydrolyse la liaison peptidique du groupe NH₂ des acides aminés hydrophobes (Xaa-Leu, Xaa-Ile, Xaa-Phe), la subtilisine et la pronase qui sont des protéases bactériennes qui hydrolysent pratiquement toutes les liaisons et peuvent transformer les protéines en oligopeptides dans des conditions de réaction contrôlées (concentration en
20 enzyme et durée de réaction).

Plusieurs protéases peuvent être utilisées de façon simultanée, si leurs modes d'action sont compatibles, ou elles peuvent être utilisées de façon successive. Dans le cadre de l'invention, la digestion de l'échantillon est, de préférence, réalisée par action d'une enzyme protéase, par exemple la
25 trypsine.

Une telle étape de traitement permet de transformer les grosses molécules que sont les protéines présentes dans l'échantillon, en peptides, qui sont de plus petites molécules. La sensibilité de la détection obtenue ultérieurement par spectrométrie de masse se trouve ainsi augmentée. En
30 outre, l'étape de traitement permet de générer plusieurs peptides protéotypiques, également nommés peptides rapporteurs pour une protéine

cible donnée. La spécificité de chaque peptide protéotypique doit être vérifiée en s'assurant, par exemple, qu'aucune autre protéine ne comporte une séquence peptidique identique, ou qu'aucune autre transition n'interfère. Le traitement permet ainsi d'augmenter la possibilité d'obtenir un ou
5 plusieurs peptides protéotypiques spécifiques de la protéine à doser. Chaque peptide protéotypique permet de quantifier la protéine par un dosage indépendant. La spécificité des dosages MRM dans des fluides complexes, tels que les échantillons sanguins, n'est pas assurée. Aussi, dans un tel cas, le dosage de plusieurs peptides protéotypiques pour chaque protéine
10 permettra de vérifier que chaque dosage indépendant conduit bien à la même dose. L'obtention de dosages indépendants correctement corrélés entre eux permettra donc de s'assurer de la spécificité et de la robustesse, en termes de fiabilité et reproductibilité, de chaque dosage pris individuellement.

15 Ainsi, dans la suite du procédé, chaque ion précurseur de ratio $(m/z)_1$ donné, qui va être sélectionné pour l'analyse par spectrométrie de masse, sera issu d'un peptide protéotypique de la protéine cible à doser.

En fonction de la complexité de l'échantillon, l'étape de traitement pourra être précédée d'une ou plusieurs étapes optionnelles. Une toute
20 première étape de fractionnement des protéines présentes dans l'échantillon d'intérêt pourra être mise en œuvre pour réduire la complexité de l'échantillon, avant le traitement des protéines restantes. Par fractionnement, on entend, de façon classique, une épuration du nombre de protéines présentes : cela peut consister en la suppression d'une ou plusieurs protéines
25 au sein de l'échantillon ou une sélection d'une ou plusieurs protéines, dont la protéine à doser. Une telle étape peut consister en la déplétion des protéines majoritaires présentes dans l'échantillon telle que l'albumine, l'IgG, l'IgA..., ces dites protéines ne correspondant pas à la protéine d'intérêt à doser. Une telle déplétion peut, par exemple, être effectuée par chromatographie
30 d'affinité. Cette déplétion permet de réduire la complexité de l'échantillon en réduisant le nombre de protéines présentes. Une déplétion de l'albumine a été proposée par la demanderesse (T. Fortin et al., *supra*). La déplétion d'un

panel plus important de protéines a également été utilisée par d'autres équipes (H. Keshishian et al., supra et V. Kulasingam et al., supra). Ces techniques pourront être mises en œuvre dans le cadre de l'invention. Néanmoins, la chromatographie d'affinité présente l'inconvénient de mettre
5 en œuvre un milieu chromatographique coûteux lorsqu'il s'agit d'une résine d'immunoaffinité. De plus, si la spécificité de la capture est insuffisante, la protéine à doser peut être, elle aussi, en partie retenue par la résine d'affinité et perdue pour le dosage ultérieur, comme mis en évidence par T. Fortin et al., *supra*.

10 Une autre alternative pour fractionner les protéines consiste à immunopurifier la protéine d'intérêt, par exemple par chromatographie d'affinité. Ce procédé permet de réduire drastiquement la complexité de l'échantillon en obtenant une fraction comportant seulement la protéine à doser (et éventuellement quelques protéines contaminantes). Une telle
15 approche est décrite par Kulasingam et al., *supra*. Néanmoins, de façon avantageuse, le procédé selon l'invention ne mettra pas en œuvre une telle technique nécessitant de disposer d'anticorps de la protéine à doser. En effet, le procédé selon l'invention, de part sa spécificité vis-à-vis de la protéine à doser, rend superflu un fractionnement des protéines conduisant à
20 un nombre très réduit de protéines restantes.

Une autre alternative pour fractionner les protéines consiste à purifier l'échantillon à doser par électrophorèse de type SDS-PAGE, puis à découper la bande correspondant à la masse moléculaire de la protéine à doser, comme notamment décrit par S.A. Gerber et al., *supra*. D'une manière
25 générale, toutes les techniques de fractionnement de protéines du type électrophorèse, chromatographie..., bien connues de l'homme de l'art, peuvent être utilisées pour réduire la complexité de l'échantillon.

Une autre étape optionnelle de dénaturation, de réduction puis de blocage des fonctions thiols des protéines pourra être mise en œuvre, notamment, avant l'étape de traitement entraînant le clivage des protéines,
30 et après l'étape de fractionnement des protéines, lorsque celle-ci est présente. Cette étape, bien qu'optionnelle, permet d'augmenter le

rendement de traitement par digestion et assure une meilleure robustesse du dosage ultérieur. Du fait de leur conformation tridimensionnelle, certaines protéines résistent naturellement à l'action protéolytique des protéases (V. Brun et al., MCP, 2007, 2139-2149). Dans un tel cas, une étape de
5 dénaturation, de réduction puis de blocage des fonctions thiols des protéines facilite l'action des protéases et assure un rendement de traitement par digestion similaire d'un échantillon à l'autre. L'ensemble des protéines présentes dans l'échantillon d'intérêt peuvent être dénaturées et réduites, avec, par exemple, de l'urée ou de la guanidine et du dithiothreitol (DTT) ou
10 du tris-(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) (M. Sun et al., Bioconjug. Chem. 2005, 16(5) :1282-1290). Les fonctions thiols libres générées sont alors bloquées, avec, par exemple, de l'iodoacétamide ou de l'acrylamide (B. Herbert et al. Electrophoresis, 2001, 22 :2046-2057).

Selon le procédé de l'invention, au moins un peptide protéotypique
15 généré lors de l'étape de traitement est dosé par spectrométrie de masse. En général, un seul peptide protéotypique par protéine, est dosé. Il est néanmoins possible de doser plusieurs peptides par protéine. Il est, également, possible de doser successivement des peptides protéotypiques de différentes protéines. L'ensemble des peptides générés lors de l'étape de
20 traitement peuvent être injectés dans le spectromètre de masse. Mais le plus souvent, les peptides générés seront fractionnés, notamment pour focaliser le dosage sur des peptides protéotypiques de la protéine d'intérêt. Un tel fractionnement des peptides peut, par exemple, être réalisé par des techniques d'électrophorèse ou de chromatographie. Ces techniques
25 séparatives peuvent être utilisées seules ou combinées entre elles pour obtenir une séparation multidimensionnelle. Par exemple, une chromatographie multidimensionnelle peut être utilisée en associant une séparation par chromatographie d'échange d'ions à une chromatographie en phase inverse, comme décrit par T. Fortin et al., *supra*, H. Keshishian et al.
30 *supra*. Dans ces publications, le milieu chromatographique peut être en colonne ou en cartouche (extraction en phase solide).

La fraction électrophorétique ou chromatographique (ou le temps de rétention en chromatographie mono ou multidimensionnelle) des peptides protéotypiques est caractéristique de chaque peptide et la mise en œuvre de ces techniques permet donc de sélectionner le ou les peptides protéotypiques à doser. Un tel fractionnement des peptides générés permet d'accroître la spécificité du dosage ultérieur par spectrométrie de masse.

Une alternative aux techniques d'électrophorèse ou de chromatographie, pour le fractionnement des peptides, consiste à purifier spécifiquement les N-glycopeptides (J. Stal-Zeng et al., MCP, 2007, 1809-1817 et demande de brevet WO 2008/066629). Néanmoins, une telle purification ne permet que la quantification des peptides ayant subi une modification post-traductionnelle de type N-glycosylation. Or toutes les protéines ne sont pas glycosilées, ce qui limite donc son utilisation.

Une autre alternative pour fractionner les peptides consiste à immunopurifier le peptide d'intérêt, par exemple par chromatographie d'affinité. Ce procédé permet de réduire drastiquement la complexité de l'échantillon en obtenant une fraction comportant seulement le peptide à doser (et éventuellement quelques peptides contaminants). Une telle approche nommée SISCAPA est décrite dans L. Anderson et al., *supra*, et dans la demande de brevet US 2004/0072251. Néanmoins, l'obtention d'anticorps anti-peptide spécifiques peut être difficile et dans ce cas, le procédé selon l'invention ne mettra pas en œuvre une telle technique. De plus, le procédé selon l'invention, de part sa spécificité vis-à-vis de la protéine à doser, rend superflu un fractionnement par immunoaffinité des peptides conduisant au seul peptide protéotypique à doser.

En conclusion, dans le cadre du procédé selon l'invention, le dosage quantitatif des peptides générés par spectrométrie de masse (correspondant à l'étape b)) est, de préférence, précédée d'une séparation par chromatographie ou électrophorèse des peptides générés à l'étape a). Une telle séparation par chromatographie utilisera, de préférence, une séparation par chromatographie en phase inverse, une chromatographie avec micro-débit, c'est-à-dire un débit de 100 µl à 500 µl par minutes, ou encore une

purification par extraction en phase solide (nommé en anglais Solide Phase Extraction ou SPE).

L'étape b) du procédé selon l'invention consiste en la détection d'au moins un peptide protéotypique généré, lors des étapes précédentes, par une technique de spectrométrie de masse. En général, un seul peptide protéotypique est dosé par protéine, mais il pourrait être possible d'en doser deux ou plus, leur ordre d'arrivée étant conditionné en amont du spectromètre de masse, par la technique de fractionnement des peptides sélectionnés.

Différents modèles de spectromètre de masse sont utilisables, dans le cadre de l'invention. Ces modèles doivent permettre trois étapes de séparation en fonction du ratio m/z avec deux fragmentations successives intercalées entre les étapes de séparation, c'est-à-dire un type d'analyse appelée MS/MS/MS ou encore MS^3 . A titre d'exemple, on peut citer les modèles de type triple quadripôle (L. Anderson & C. Hunter, MCP, 2006, 573-588...), ou de type trappe ionique (B. Han & R. Higgs, Brief Funct Genomic Proteomic. 2008 Sep;7(5):340-54), ou encore de type temps de vol (MALDI-TOF) (K.-Y. Wang et al, Anal Chem, 2008, 80(16) 6159-6167). Les modèles de type triple quadripôle hybride, intégrant une trappe ionique, sont néanmoins préférés. Les peptides à doser, le plus souvent en solution, sont injectés et dosés dans le spectromètre de masse choisi.

Dans une première étape i), les peptides issus du traitement des protéines entraînant leur clivage, qui sont injectés dans le spectromètre de masse, sont ionisés en ions moléculaires, nommés précurseurs étant donné qu'ils vont être soumis ultérieurement à fragmentation pour générer des ions fragments. Pour être injectés, dans le spectromètre de masse, les peptides sont en général dissous dans une solution aqueuse. L'échantillon à doser sera donc, de préférence, liquide. La source d'ions dans laquelle les molécules sont ionisées est, par exemple, du type MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*) ou Electrospray (ESI de l'anglais « *ElectroSpray Ionisation* »). Une ionisation par électrospray, réalisée dans des conditions

douces, notamment à pression atmosphérique et température ambiante, est néanmoins préférée.

Les ions précurseurs générés sont alors filtrés en fonction de leur masse m/z et un ion précurseur de masse $(m/z)_1$ donnée est sélectionné en fonction de la protéine cible recherchée. Pour cela, classiquement, les ions sont accélérés dans un champ électrique, puis dirigés dans un champ électrique et/ou magnétique selon une trajectoire qui dépend de leur rapport masse/charge (m/z) . Une variation du champ électrique et/ou magnétique appliqué, permet de faire varier la trajectoire des ions précurseurs, et permet ainsi de sélectionner le rapport $(m/z)_1$ souhaité. Selon une caractéristique préférée de l'invention, l'ion précurseur sélectionné est un peptide doublement chargé qui contient un nombre n de 6 à 15 acides aminés, et qui présente au moins une proline au niveau des positions 2 à $n-2$ et/ou une histidine au niveau des positions 1 à $n-2$. Une telle sélection va permettre d'obtenir une bonne spécificité et sélectivité dans les étapes suivantes avec une amélioration du rapport signal sur bruit. Selon un mode de réalisation préféré, l'ion précurseur sélectionné est doublement chargé et présente au moins deux prolines ou une proline et une histidine. En effet, l'utilisation d'ions précurseurs ayant deux prolines ou une proline et une histidine génère encore moins de fragmentations secondaires en MS^3 et est encore plus adaptée pour obtenir le dosage quantitatif le plus performant.

Par peptide comprenant une proline (ou une histidine) au niveau des positions 2 à $n-2$, on entend que cette dernière peut être en position 2, 3, 4, 5 ... $n-5$, $n-4$, $n-3$ ou $n-2$. La position 1 correspond à la partie N-terminale et la position n à la partie C-terminale, n correspondant au nombre d'acides aminés présents dans le peptide.

L'ion précurseur sélectionné, en fonction de la protéine cible recherchée, est ensuite fragmenté en ions fragments de première génération dans une étape ii). Les ions fragments de première génération générés sont, ensuite, filtrés en fonction de leur masse m/z et un ion fragment de première génération de masse $(m/z)_2$ donné est sélectionné, dans une étape iii). Selon une caractéristique essentielle de l'invention, l'ion fragment de première

génération sélectionné correspond à un peptide dichargé comportant une proline ou une histidine en position 1 (N-terminale). En effet, lorsque l'ion précurseur comporte une proline ou une histidine, il existe un ion fragment de première génération qui correspond à une fragmentation de la liaison peptidique en N-terminal de la proline ou de l'histidine, respectivement. Dans l'étape iv) du procédé selon l'invention, l'ion fragment de première génération sélectionné va subir une nouvelle fragmentation et le choix particulier de l'ion précurseur et de l'ion fragment de première génération conduit à une bonne fragmentation et à l'obtention de pics intenses. Dans le cadre de l'invention, les ions précurseurs de ratio $(m/z)_1$ et les ions fragments de première génération de ratio $(m/z)_2$, sont choisis, de manière à être caractéristiques de la protéine à doser et conduire aux dosages les plus sensibles, les plus spécifiques et les plus robustes possibles, en termes de reproductibilité et fiabilité.

Les deux fragmentations successives seront classiquement réalisées par collision avec un gaz inerte, comme de l'azote ou de l'argon au sein d'un champ électrique, ou encore par la seule application d'une différence de potentiel, par exemple dans un tube de temps de vol. Les caractéristiques du champ électrique conditionnent l'intensité et la nature de la fragmentation. Ainsi, le champ électrique appliqué en présence d'un gaz inerte, par exemple dans un quadripôle, conditionne l'énergie de collision apportée aux ions. Cette énergie de collision sera optimisée, par l'homme du métier, pour accroître la sensibilité de la transition à doser. A titre d'exemple, il est possible de faire varier l'énergie de collision entre 5 et 180 eV en q2 dans un spectromètre de masse AB SCIEX QTRAP® 5500 de la société Applied Biosystems (Foster City, Etats Unis d'Amérique). De même, la durée de l'étape de collision et l'énergie d'excitation au sein, par exemple, d'une trappe ionique seront optimisées, par l'homme du métier, pour conduire au dosage le plus sensible. A titre d'exemple, il est possible de faire varier cette durée, baptisée temps d'excitation, entre 0,010 et 50 ms et l'énergie d'excitation entre 0 et 1 (unité arbitraire) en Q3 dans un spectromètre de masse AB SCIEX QTRAP® 5500 de la société Applied Biosystems.

Les étapes i) à iii) correspondent aux étapes utilisées classiquement dans un dosage MRM. De telles étapes peuvent être menées dans un triple quadripôle notamment. Un triple quadripôle comporte deux analyseurs quadripolaires (nommés Q1 et Q3) en série, séparés par une cellule de collision (nommée q2) souvent constituée d'un quadripôle plus court. Bien évidemment, il est nécessaire de mettre en œuvre le procédé selon l'invention, dans un spectromètre de masse ayant la capacité de fragmenter les ions fragments de première génération en ions fragments de deuxième génération. La fragmentation d'un ion fragment de première génération en ion fragment de deuxième génération et la sélection de l'ion fragment de première génération, dans le cadre de l'invention, peut par exemple être réalisée en Q3 d'un triple quadripôle comportant une trappe ionique. Des triples quadripôles hybrides possédant une capacité de trappe ionique dans le quadripôle Q3 pourront être utilisés. De tels instruments sont commercialisés par la société Applied Biosystems sous les appellations de 3200QTRAP®, de 4000QTRAP® ou de AB SCIEX QTRAP® 5500. Il est également possible de fragmenter un ion fragment de première génération en mode MS³ dans tout analyseur de type trappe ionique. Dans ce cas, l'ion précurseur est sélectionné dans la trappe ionique, puis fragmenté en ions fragments de première génération. Un ion fragment de première génération est à son tour sélectionné puis fragmenté en ions de seconde génération dans le même dispositif de type trappe ionique. Les ions de seconde génération sont finalement détectés en les expulsant séquentiellement hors de la trappe ionique vers le détecteur.

Dans le cadre de l'invention, classiquement, l'analyseur quadripolaire (Q1) permet de filtrer les ions moléculaires précurseurs issus du peptide protéotypique sélectionné, en fonction de leur ratio masse sur charge $(m/z)_1$. Seuls les peptides ayant le ratio masse/charge de l'ion précurseur recherché $(m/z)_1$ sont transmis dans le deuxième quadripôle (q2). L'analyseur q2 permet de fragmenter les ions précurseurs de ratio masse/charge $(m/z)_1$ en ion fragment de première génération. La fragmentation est généralement obtenue par collision des peptides précurseurs avec un gaz inerte, comme de

l'azote ou de l'argon. Les ions fragments de première génération sont, alors, transmis dans un troisième quadripôle (Q3) qui filtre les ions fragments de première génération en fonction d'un ratio masse sur charge (m/z). Seul un ion fragment de première génération ayant le ratio masse/charge (m/z)₂ d'un fragment caractéristique du peptide protéotypique recherché va subir les dernières étapes du procédé selon l'invention. En effet, le procédé selon l'invention comporte une fragmentation supplémentaire : dans une étape ultérieure iv), l'ion fragment de première génération sélectionné de masse (m/z)₂ est fragmenté en ions fragments de deuxième génération. Après la sélection en Q3 d'un ion fragment de première génération ayant le ratio masse/charge (m/z)₂ d'un fragment du peptide protéotypique recherché, cet ion fragment de première génération est à son tour fragmenté, par exemple grâce à une trappe ionique. Différents ions fragments de deuxième génération issus de la fragmentation de l'ion fragment de première génération sont alors obtenus. Ces différents ions de seconde génération vont alors être expulsés vers un détecteur, par l'analyseur de masse constitué par exemple d'une trappe ionique ou d'un quadripôle. L'expulsion est, par exemple, réalisée séquentiellement hors de la trappe ionique, par l'application d'une tension modulée en fonction du temps par une radio fréquence.

Afin de détecter le courant induit, les ions fragments de deuxième génération sont dirigés vers un détecteur qui collecte les ions fragments de deuxième génération qui arrivent à des temps différents en fonction du rapport m/z et qui amplifie le signal associé aux ions. Selon une variante de mise en œuvre du procédé selon l'invention, à l'étape v), l'intensité du courant induit par les ions fragments de deuxième génération est détectée en fonction du temps et le signal obtenu sur une période donnée est décomposé en un spectre de masse des différents ions présents en fonction de leur masse m/z , de manière à obtenir un pic de masse associé à chacun des ions de seconde génération détectés présents sur la période donnée, et le signal correspondant au courant d'au moins un ion de deuxième génération sélectionné est recomposé, et l'intensité du courant

correspondant mesurée est la mesure quantitative sélectionnée à l'étape vi). En général, le signal total est obtenu par fraction de temps, ou période t . La durée des périodes t est fonction de la vitesse de balayage de l'analyseur de masse et de la plage de masses à balayer, elle est généralement inférieure à

5 une seconde. Le signal total obtenu sur chaque période t donnée est décomposé en un spectre de masse des différents ions présents en fonction de leur masse m/z , de manière à obtenir un pic de masse associé à chacun des ions de seconde génération détectés sur cette période t . Les ions de seconde génération sont observés pendant plusieurs périodes t consécutives,

10 correspondant à la période T durant laquelle le peptide protéotypique est élué. La période t au cours de laquelle le signal des ions fragments de deuxième génération induits par le peptide protéotypique, est maximal correspond au temps d'élué, ou temps de rétention, du peptide protéotypique. Le temps d'élué du peptide protéotypique peut être

15 déterminé, par exemple, de façon classique par MRM, à partir d'une solution du peptide protéotypique purifié ou d'une solution de la protéine cible purifiée ou d'une solution dans laquelle l'un ou l'autre est particulièrement abondant. La durée minimale de la période T est classiquement de 5 à 30s. Cependant, la durée de la période T est généralement allongée, pour que la

20 mesure du signal ne soit pas affectée par une micro-variation du temps d'élué du peptide protéotypique. La durée de la période T peut ainsi être allongée jusqu'à atteindre la totalité du temps de la séparation chromatographique. Cependant, de façon classique, la période T est généralement fixée entre une minute et cinq minutes, centrée autour du

25 temps d'élué du peptide protéotypique. Le signal correspondant au courant d'au moins un ion de deuxième génération, spécifique du peptide protéotypique issu de la protéine à quantifier, peut être sélectionné pour chaque fraction de temps t , durant la période T . Ce signal peut alors être

30 extrait du signal total. L'intensité du courant correspondant à la somme des intensités mesurées à chaque instant t de la période T ou d'une fraction de la période T correspondra à la mesure quantitative sélectionnée à l'étape vi). En effet, comme cela est détaillé à l'exemple 1, le signal correspondant au

courant généré par les ions détectés, en fonction du temps, peut être décomposé pour chaque période t donnée (qui est en fait une très courte période), et sommé, par exemple, pour la fraction la plus représentative de la période T , pour obtenir un spectre de masse des différents ions présents

5 en fonction de leur masse m/z . On obtient ainsi un pic de masse associé à chacun des ions de seconde génération détectés à l'étape v) et présents sur la fraction la plus représentative de la période T . Il est ensuite possible de sélectionner un ou plusieurs ions de seconde génération de masse donnée et de recomposer le signal correspondant au courant des ions sélectionnés. On

10 obtient, ainsi, la somme des intensités du courant induit par les ions fragments de chaque période t , survenant durant la fraction la plus représentative de la période T , par intégration de la somme des signaux observés durant les périodes t consécutives de la fraction la plus représentative de la période T correspondant à l'élution du peptide

15 protéotypique. Cette somme correspond, par exemple, à la mesure quantitative, qui va permettre de déterminer la quantité de peptide protéotypique présent. La première et la dernière période t de la fraction la plus représentative de la période T dont les signaux sont sommés pourront correspondre à la première et la dernière période t pour lesquelles le signal

20 est supérieur au bruit de fond du détecteur. L'intensité de courant ainsi mesurée pourra servir de mesure quantitative permettant de déterminer la quantité de peptide protéotypique présent, laquelle est caractérisée par son expression en unités du Système International (SI) de type mol/m^3 ou kg/m^3 , ou par les multiples ou sous-multiples de ces unités, ou par les

25 dérivées usuelles des unités SI, y compris leurs multiples ou sous-multiples. A titre d'exemple non limitatif, les unités telles que ng/ml ou fmol/l sont des unités caractérisant une mesure quantitative. De préférence, à l'étape vi), on sélectionne la mesure quantitative associée à l'ion fragment de deuxième génération, présentant le pic m/z le plus intense. Il est également possible

30 de sommer les mesures quantitatives de différents ions fragments de deuxième génération. Dans ce cas, à l'étape vi), la corrélation est, par exemple, effectuée à partir de la somme d'au moins deux mesures

quantitatives (notamment deux ou trois), chacune étant associée aux ions fragments de deuxième génération présentant les pics m/z les plus intenses.

Un ensemble informatique de traitement des données permet de transformer les informations reçues par le détecteur en spectre de masse.

5 L'intensité de courant induit par les ions fragments de deuxième génération sélectionnés, mesurée dans le détecteur, est proportionnelle à la quantité d'ions fragments de deuxième génération, elle-même proportionnelle à la quantité d'ions fragments de première génération, elle-même proportionnelle à la quantité d'ions précurseurs obtenus par ionisation du peptide
10 protéotypique sélectionné, elle-même proportionnelle à la quantité de protéine à doser. La quantité de courant dosé, induit par les ions fragments de deuxième génération, est donc directement proportionnelle à la quantité de la protéine à doser. La sélection d'au moins une mesure quantitative associée à un ion de seconde génération, et la corrélation de cette mesure
15 quantitative à la quantité de peptide protéotypique généré et à la quantité de protéine présente dans l'échantillon, permet d'obtenir un dosage quantitatif.

Un calibrage est nécessaire pour pouvoir corréler l'aire du pic mesurée, correspondant à l'intensité de courant induit par le ou les ions fragments de deuxième génération, à la quantité d'ions fragments de deuxième génération
20 correspondants, qui pourra elle-même être corrélée à la quantité d'ions fragments de première génération correspondante, qui pourra elle-même être corrélée à la quantité d'ions précurseurs, qui pourra elle-même être corrélée à la quantité de la protéine d'intérêt. Pour cela, les calibrages classiquement utilisés dans les dosages MRM pourront être mis en œuvre,
25 dans le cadre de l'invention. Les dosages MRM sont classiquement calibrés à l'aide de standards externes ou, de préférence, à l'aide de standards internes tels que décrits par T. Fortin et al., *supra*. La corrélation entre la mesure quantitative et la quantité de peptide protéotypique, et par la suite de protéine cible, est obtenue en étalonnant le signal mesuré par rapport à un
30 signal étalon pour lequel la quantité à doser est connue. L'étalonnage peut être réalisé au moyen d'une courbe d'étalonnage, par exemple obtenue par injections successives de peptide protéotypique étalon à différentes

concentrations (étalonnage externe), ou de façon préférentielle, par étalonnage interne en utilisant un peptide lourd, comme standard interne, par exemple conformément aux méthodes AQUA, QconCAT ou PSAQ détaillées ci-après. Par « peptide lourd », on entend un peptide
5 correspondant au peptide protéotypique, mais dans lequel un ou plusieurs atomes de carbone 12 (^{12}C) est (sont) remplacé(s) par du carbone 13 (^{13}C), et/ou un ou plusieurs atomes d'azote 14 (^{14}N) est (sont) remplacé(s) par de l'azote 15 (^{15}N)

L'utilisation de peptides lourds, comme standards internes (AQUA), a
10 également été proposée par S.A. Gerber et al., *supra* et dans la demande de brevet US 2004/0229283. Le principe est de synthétiser artificiellement des peptides protéotypiques avec des acides aminés comportant des isotopes plus lourds que les isotopes naturels usuels. De tels acides aminés sont obtenus, par exemple, en remplaçant certains des atomes de carbone 12
15 (^{12}C) par du carbone 13 (^{13}C), ou en remplaçant certains des atomes d'azote 14 (^{14}N) par de l'azote 15 (^{15}N). Le peptide artificiel (AQUA) ainsi synthétisé a rigoureusement les mêmes propriétés physicochimiques que le peptide naturel (à l'exception d'une masse plus élevée). Il est généralement ajouté, à une concentration donnée, à l'échantillon, en amont du dosage par
20 spectroscopie de masse, par exemple entre le traitement entraînant le clivage des protéines de l'échantillon d'intérêt et le fractionnement des peptides obtenus après l'étape de traitement. De ce fait, le peptide AQUA est co-purifié avec le peptide naturel à doser, lors du fractionnement des peptides. Les deux peptides sont donc injectés simultanément dans le
25 spectromètre de masse, pour le dosage. Ils subissent alors les mêmes rendements d'ionisation dans la source. La comparaison des aires de pic des peptides naturels et AQUA, dont la concentration est connue, permet de calculer la concentration du peptide naturel et de remonter ainsi à la concentration de la protéine à doser. Une variante de la technique AQUA a
30 été proposée par J.-M. Pratt et al. (Nat. Protoc. 2006, 1:1029-1043) sous le nom de QconCat. Cette variante est également décrite dans la demande de brevet WO 2006/128492. Elle consiste à concaténer différents peptides

AQUA et à produire le polypeptide artificiel sous forme de protéine recombinante lourde. La protéine recombinante est synthétisée avec des acides aminés comportant des isotopes lourds. De cette façon, il est possible d'obtenir un standard pour calibrer le dosage simultané de plusieurs protéines à moindre coût. Le standard QconCAT est ajouté dès le début, en amont du traitement entraînant le clivage des protéines et avant les étapes de fractionnement des protéines, de dénaturation, de réduction puis de blocage des fonctions thiols des protéines, si celles-ci sont présentes. Le standard QconCAT subit donc le même cycle de traitement entraînant le clivage des protéines que la protéine naturelle, ce qui permet de tenir compte du rendement de l'étape de traitement entraînant le clivage des protéines. En effet, le traitement, notamment par digestion, de la protéine naturelle peut ne pas être complet. Dans ce cas l'utilisation d'un standard AQUA conduirait à sous-estimer la quantité de protéine naturelle. Pour un dosage absolu, il peut donc être important de tenir compte des rendements de traitement entraînant le clivage des protéines. Cependant, V. Brun et al. (MCP, 2007, 2139-2149) ont montré que, parfois, les standards QconQAT ne reproduisaient pas exactement le rendement de traitement notamment par digestion de la protéine naturelle, sans doute du fait d'une conformation tridimensionnelle différente de la protéine QconCAT.

V. Brun et al. *supra* ont alors proposé d'utiliser une méthode baptisée PSAQ et décrite dans la demande de brevet WO 2008/145763. Dans ce cas, le standard interne est une protéine recombinante, ayant la même séquence que la protéine naturelle mais synthétisée avec des acides aminés lourds. La synthèse est réalisée ex-vivo avec des acides aminés lourds. Ce standard a rigoureusement les mêmes propriétés physicochimiques que la protéine naturelle (à l'exception d'une masse plus élevée). Il est ajouté dès le début, avant l'étape de fractionnement des protéines, lorsque cette dernière est présente. Il est donc co-purifié avec la protéine native, lors de l'étape de fractionnement des protéines. Il présente le même rendement de traitement, notamment par digestion, que la protéine native. Le peptide lourd obtenu après clivage est également co-purifié avec le peptide naturel, si une étape

de fractionnement des peptides est réalisée. Les deux peptides sont donc injectés simultanément dans le spectromètre de masse, pour être dosé quantitativement. Ils subissent alors les mêmes rendements d'ionisation dans la source. La comparaison des aires de pic des peptides naturels et des peptides de référence dans la méthode PSAQ permet de calculer la concentration de la protéine à doser en tenant compte de la totalité des étapes du procédé de dosage.

L'ensemble de ces techniques, à savoir AQUA, QconCAT ou PSAQ ou toute autre technique de calibrage, utilisée dans des dosages par spectrométrie de masse et en particulier dans les dosages MRM ou MS, pourront être mises en œuvre pour effectuer le calibrage, dans le cadre de l'invention.

Le procédé selon l'invention pourra donc être mis en œuvre pour le dosage quantitatif et qualitatif de protéine, pour des applications de diagnostic *in vitro*, notamment. Le **TABLEAU 1A** ci-dessous détaille un certain nombre de protéines pouvant être dosées par le procédé selon l'invention, ainsi que le peptide protéotypique sélectionné. **TABLEAU 1A**

Protéine	Masse m/z de l'ion précurseur M2H+	Masse du peptide protéotypique	Position du peptide protéotypique au sein de la protéine	Séquence du peptide protéotypique
Plastine-1	730,37935	1458,7587	349-362	SEQ ID N°8 : QFVTPADVSGNPK
Plastine-1	538,29145	1074,5829	42-51	SEQ ID N°9 : EASLPLPGYK
Plastine-1	535,81255	1069,6251	266-274	SEQ ID N°10 : LSPEELLR
Ezrin	553,2918	1104,5836	237-245	SEQ ID N°11 : IGFPWSEIR
Aminoacylase 1	446,2309	890,4618	277-284	SEQ ID N°12 : VAPDVDFK
Fatty acid-binding protein (L-FABP)	606,35205	1210,7041	21-31	SEQ ID N°13 : AIGLPEELIQK
Protéine Disulfide-isomérase	983,522	1965,044	231-247	SEQ ID N°14 : HNQLPLVIEFTEQTAPK
Protéine Disulfide-isomérase	761,87715	1521,7543	18-30	SEQ ID N°15 : DAPEEEDHVLVLR
Protéine Disulfide-isomérase	726,8506	1451,7012	327-338	SEQ ID N°16 : YKPESEELTAER
Protéine Disulfide-isomérase	541,8384	1081,6768	255-263	SEQ ID N°17 : THILLFLPK
Protéine Disulfide-	486,2678	970,5356	402-409	SEQ ID

Protéine	Masse m/z de l'ion précurseur M2H ⁺	Masse du peptide protéotypique	Position du peptide protéotypique au sein de la protéine	Séquence du peptide protéotypique
isomerase				N°18 : QLAPIWDK
Protéine Disulfide-isomerase	465,2625	928,525	437-444	SEQ ID N°19 : VHSFPTLK
Protéine Disulfide-isomerase	456,22085	910,4417	445-452	SEQ ID N°20 : FFPASADR
Protéine Disulfide-isomerase	432,23345	862,4669	58-65	SEQ ID N°21 : ALAPEYAK
Protéine Disulfide-isomerase	431,1965	803,3716	310-316	SEQ ID N°22 : EECPAVR
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	932,482	1846,9691	nov-28	SEQ ID N°23 : SLSSSLQAPVVSTVGMQR
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	658,8188	1315,6376	308-318	SEQ ID N°24 : ESLEHTLEETK
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	647,32965	1292,6593	29-42	SEQ ID N°25 : LGTTPSVYGGAGGR
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	583,2716	1164,5432	104-112	SEQ ID N°26 : QWYETNAPR
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	544,7891	1087,5782	179-187	SEQ ID N°27 : VFDDLTLHK
14-3-3 protéine sigma	528,2675	1054,535	161-169	SEQ ID N°28 : EMPPTNPIR
Protéine S100-A11 Calgizarin	510,7502	1019,5004	04-déc	SEQ ID N°29 : ISSPTETER
Protéine S100-A11 Calgizarin	386,69975	771,3995	56-62	SEQ ID N°30 : DPGVLR

Les protéines étudiées correspondent au numéro suivant dans la base Swiss Prot : Plastine-1 (Q14651), Ezrin (P15311), Aminoacylase 1 (Q03154), Protéine Disulfide-isomerase (P07237), Keratin, type 1 cytoskeletal 20 (P35900), 14-3-3 protéine sigma (P31947), Protéine S100-A11 Calgizarin (P31949).

La masse théorique du peptide protéotypique est déterminée à partir de sa séquence en acides aminés. De nombreux logiciels permettent ce calcul, tels que MRM Pilot (Applied Biosystems), Sequence Editor (Bruker Daltonik, Brême, Allemagne)... Le calcul donné **TABLEAU 1A** a été réalisé avec MRM Pilot. La masse théorique de l'ion précurseur 2 fois chargés (M2H⁺) est déterminée en ajoutant la masse de deux protons à la masse théorique du peptide protéotypique, et en divisant la somme obtenue par 2.

Le **TABLEAU 1B** donne, pour chaque protéine, en fonction de l'ion précurseur doublement chargé sélectionné, la position des prolines et histidines présentes et le nombre d'acides aminés présents (AA signifiant acide aminé).

5 **TABLEAU 1B**

Protéine	Séquence du peptide protéotypique	Position 1ère Proline	Position 2ème Proline	Nbre AA entre 1ère Proline et C-term	Position 1ère His	Nbre AA entre 1ère His et C-term	Nbre AA total
Plastine-1	SEQ ID N°8	5	13	9	-	-	14
Plastine-1	SEQ ID N°9	5	7	5	-	-	10
Plastine-1	SEQ ID N°10	3	-	6	-	-	9
Ezrin	SEQ ID N°11	4	-	5	-	-	9
Aminoacylase 1	SEQ ID N°12	3	-	5	-	-	8
Fatty acid-binding protéine (L-FABP)	SEQ ID N°13	5	-	6	-	-	11
Protéine Disulfide-Isomerase	SEQ ID N°14	5	16	12	1	16	17
Protéine Disulfide-Isomerase PDI A1	SEQ ID N°15	3	-	10	8	5	13
Protéine Disulfide-Isomerase	SEQ ID N°16	3	-	9	-	-	12
Protéine Disulfide-Isomerase	SEQ ID N°17	8	-	1	2	7	9
Protéine Disulfide-Isomerase	SEQ ID N°18	4	-	4	-	-	8
Protéine Disulfide-Isomerase	SEQ ID N°19	5	-	3	2	6	8
Protéine Disulfide-Isomerase	SEQ ID N°20	3	-	5	-	-	8
Protéine Disulfide-Isomerase	SEQ ID N°21	4	-	4	-	-	8
Protéine Disulfide-Isomerase	SEQ ID N°22	4	-	3	-	-	7
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	SEQ ID N°23	9	-	9	-	-	18

Protéine	Séquence du peptide protéotypique	Position 1ère Proline	Position 2ème Proline	Nbre AA entre 1ère Proline et C-term	Position 1ère His	Nbre AA entre 1ère His et C-term	Nbre AA total
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	SEQ ID N°24	-	-		5	6	11
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	SEQ ID N°25	5	-	9	-		14
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	SEQ ID N°26	8	-	1	-		9
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	SEQ ID N°27	-	-		8	1	9
14,3,3 protein sigma	SEQ ID N°28	3	4	6	-		9
Protéine S100-A11 Calgizarin	SEQ ID N°29	4	-	5	-		9
Protéine S100-A11 Calgizarin	SEQ ID N°30	2	-	5	-		7

Seul le peptide protéotypique HNQLPLVIEFTEQTAPK (**SEQ ID N°14**) comportant 17 acides aminés, dans le cas de la protéine Protéine Disulfide-Isomerase et le peptide SLSSSLQAPVVSTVGMQR (**SEQ ID N°23**) comportant 18 acides aminés, dans le cas de la protéine Keratin, type 1 cytoskeletal 20, ne conduisent à aucune détection de l'ion précurseur doublement chargé correspondant. Le **TABLEAU 1C** donne, pour chaque protéine, l'ion fragment de 1ère génération doublement chargé sélectionné, avec la position des prolines et histidines présentes.

TABLEAU 1C

	Séquence du peptide protéotypique	Fragment de première génération doublement chargé	Position de la première Proline	Position de la première Histidine
Plastine-1	SEQ ID N°8	SEQ ID N°31 : PADVVSGNPK	1	-
Plastine-1	SEQ ID N°9	SEQ ID N°32 : PLPGYK	1	-
Plastine-1	SEQ ID N°10	SEQ ID N°33 : PEELLLR	1	-
Ezrin	SEQ ID N°11	SEQ ID N°34 : PWSEIR	1	-
Aminoacylase 1	SEQ ID N°12	SEQ ID N°35 : PDVDFK	1	-
Fatty acid-binding protéine (L-FABP)	SEQ ID N°13	SEQ ID N°36 : PEELIQK	1	-
Protéine Disulfide-isomérase	SEQ ID N°14	-	-	-
Protéine Disulfide-isomérase	SEQ ID N°15	SEQ ID N°37 : PEEDHVLVLR	1	6
Protéine Disulfide-isomérase	SEQ ID N°16	SEQ ID N°38 : PESEELTAER	1	-
Protéine Disulfide-isomérase	SEQ ID N°17	SEQ ID N°39 : HILLFLPK	7	1
Protéine Disulfide-isomérase	SEQ ID N°18	SEQ ID N°40 : PIWDK	1	-
Protéine Disulfide-isomérase	SEQ ID N°19	SEQ ID N°41 : HSFPTLK	4	1
Protéine Disulfide-isomérase	SEQ ID N°20	SEQ ID N°42 : PASADR	1	-
Protéine Disulfide-isomérase	SEQ ID N°21	SEQ ID N°43 : PEYAK	1	-
Protéine Disulfide-isomérase	SEQ ID N°22	SEQ ID N°44 : PAVR	1	-
Kératine, type 1 cytoskeletal 20	SEQ ID N°23	-	-	-

TABLEAU 1C (suite 1)

	Séquence du peptide protéotypique	Fragment de première génération doublement chargé	Position de la première Proline	Position de la première Histidine
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	SEQ ID N°24	SEQ ID N°45 : HTLEETK	-	1
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	SEQ ID N°25	SEQ ID N°46 : PSVYGGAGGR	1	-
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	SEQ ID N°26	-	-	-
Keratin, type 1 cytoskeletal 20	SEQ ID N°27	-	-	-
14-3-3 protéine sigma	SEQ ID N°28	SEQ ID N°47 : PPTNPIR	1	-
Protéine S100-A11 Calgizarin	SEQ ID N°29	SEQ ID N°48 : PTETER	1	-
Protéine S100-A11 Calgizarin	SEQ ID N°30	SEQ ID N°49 : PGVLDR	1	-

Les exemples ci-après, en référence aux Figures annexées, n'ont aucun caractère limitatif et permettent d'illustrer l'invention.

5 La **Figure 1A** présente un exemple de signal obtenu, en fonction du temps sous forme d'un chromatogramme d'ions total.

La **Figure 1B** représente le spectre de masse des ions fragments de seconde génération élués entre 11,70 et 11,90 minutes sur la **Figure 1A**.

10 La **Figure 1C** montre la somme des chromatogrammes d'ions extraits correspondant aux masses des fragments de seconde génération y_5 , y_6 , y_7 - H_2O , y_7 et y_8 du peptide protéotypique LSEPAELTDAVK (**SEQ ID N°50**) du PSA, lissé sur trois points, de la **Figure 1A**.

La **Figure 1D** est un exemple de courbe de calibration.

15 La **Figure 2A** représente le chromatogramme obtenu pour le peptide LSEPAELTDAVK (**SEQ ID N°50**) natif (temps de rétention 11,78 min) et la **Figure 2B** celui du peptide LSEPAELTDAVK (**SEQ ID N°50**) lourd (temps de rétention 11,79 min).

Les **Figures 3, 4A** et **4B** sont d'autres exemples de courbe de calibration.

Les **Figures 5A, 5B et 5C** sont différents spectres de masse obtenus avec différentes énergies de collision, respectivement 40, 35 et 30 eV.

La **Figure 5D** représente l'évolution de l'intensité du courant induit, en fonction de l'énergie de collision (CE) utilisée pour la formation des ions fragments de première génération.

Les **Figures 6A, 6B et 6C** représentent les spectres de masse des ions fragments de seconde génération obtenus du peptide protéotypique SAPSPLYR (**SEQ ID N°53**) de la protéine Tp435 en choisissant, comme ion fragment de première génération, soit l'ion fragment monochargé le plus intense (**Figure 6A** - élution entre 0,098 et 0,300 min), soit l'ion fragment contenant une proline sous forme monochargé (**Figure 6B** - élution entre 0,101 et 0,306 min), soit ce même ion sous forme dichargé (**Figure 6C** - élution entre 0,102 et 0,298 min).

15 Exemple 1 : Principe de dosage quantitatif par MRM³ avec calibration externe d'un marqueur tumoral : l'antigène spécifique de la prostate (PSA)

Le PSA (selon l'acronyme anglais pour Prostate Specific Antigen, fourni par la société anglaise Scipac) est implémenté aux concentrations décrites ci-dessous dans du sérum de femme (Etablissement Français du Sang) pour constituer les points de la gamme d'étalonnage :

- 35 µl de PSA à 1,14mg/ml dans 165µl de sérum de femme pour obtenir un point à 200µg/ml
- 50 µl du point à 200µg/ml dans 150µl de sérum de femme pour obtenir un point à 50µg/ml
- 25 -40 µl du point à 50µg/ml dans 160µl de sérum de femme pour obtenir un point à 10µg/ml
- 20µl du point à 10µg/ml dans 180µl d'H₂O pour avoir un point à 1µg/ml
- 20µl du point à 1µg/ml dans 180µl d'H₂O pour avoir un point à 100ng/ml
- 20µl du point à 100ng/ml dans 180µl d'H₂O pour avoir un point à 10ng/ml
- 30 -20µl du point à 10ng/ml dans 180µl d'H₂O pour avoir un point à 1ng/ml
- 20µl du point à 50µg/ml dans 180µl d'H₂O pour avoir un point à 5µg/ml
- 20µl du point à 5µg/ml dans 180µl d'H₂O pour avoir un point à 500ng/ml

- 20µl du point à 500ng/ml dans 180µl d'H₂O pour avoir un point à 50ng/ml
200µl de sérum de femme sont utilisés pour obtenir un point à 0ng/ml.
Les points de gamme et les échantillons sériques à doser, échantillons
prélevés chez des patients atteints d'un cancer de la prostate ou d'une
5 hyperplasie bénigne de la prostate, sont ensuite digérés selon le protocole
suivant :
- Dilution d'un volume de 100µl de sérum dans 3ml de bicarbonate
50mM, pH=8,0
 - Ajout du dithiothréitol (DTT) pour obtenir une concentration finale de
10 15mM
 - Réduction à 60°C pendant 40minutes
 - Refroidissement des tubes à température ambiante
 - Ajout d'iodoacétamide pour obtenir une concentration finale de 25 mM
 - Alkylation pendant 40minutes à température ambiante et à l'obscurité
 - 15 -Ajout de trypsine avec un ratio de 1/30
 - Digestion à 37°C pendant 4 heures
 - Ajout du DTT pour obtenir une concentration finale de 10mM
 - Réduction à 60°C pendant 40 minutes
 - Refroidissement des tubes à température ambiante
 - 20 -Ajout d'iodoacétamide pour obtenir une concentration finale de 15mM
et permettre une alkylation des fonctions thiol à température ambiante et à
l'obscurité pendant 40 minutes
 - Ajout de trypsine avec un ratio massique de 1/30
 - Digestion à 37°C pendant toute la nuit
 - 25 Le sérum est ensuite dessalé et concentré selon le protocole suivant :
Acidification des échantillons avec de l'acide formique (soit 0,1% final)
Equilibrage des colonnes HLB Oasis Waters avec 1ml de méthanol puis
1 ml H₂O/acide formique 0,1%
 - Dépôt de l'échantillon qui s'écoule par gravité
 - 30 Lavage avec 1 ml H₂O/acide formique 0,1%
 - Elution avec 1ml de méthanol 80% dans un mélange H₂O/acide
formique 0,1%

La fraction éluée est ensuite diluée dans 3ml de tampon acétate d'ammonium 200mM à pH 3,00.

L'échantillon est fractionné sur une cartouche SPE Waters MCX Oasis selon le protocole suivant :

- 5 - La cartouche est conditionnée par 1ml de méthanol puis 1ml de tampon acétate d'ammonium 200mM à pH 3,00.
- Le sérum dilué dans le tampon acétate d'ammonium 200mM à pH 3,00 est déposé en totalité sur la cartouche MCX, puis laissé couler par gravité.
- 10 - La cartouche est lavée par 1ml de tampon acétate d'ammonium 200mM à pH 3,00 puis par 1 ml de méthanol 80%, tampon acétate pH 3,00 20%.
- L'élution est réalisée par 1 ml d'un tampon acétate d'ammonium 200mM pH 5,5 /méthanol (50/50).
- 15 - L'éluat est évaporé avec un évaporateur de type SpeedVac® SPD2010 (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis d'Amérique), durant 2 heures, afin d'obtenir un volume d'environ 100µl.
- L'éluat est ensuite repris dans un mélange 10% d'acétonitrile (ACN)/90% H₂O 0,5% acide formique quantité suffisante pour (QSP) 200µl
- 20 Un volume de 100µl de l'échantillon obtenu est injecté et analysé selon les conditions suivantes :
- Chaîne chromatographique Ultimate 3000 de la société Dionex (Sunnyvale, Californie, Etats Unis d'Amérique)
- Colonne Waters Symmetry C18, 2,1mm de diamètre interne, 100mm
- 25 de long, taille de particule de 3,5µm
- Solvant A : H₂O + 0,1% acide formique
- Solvant B : ACN + 0,1% acide formique
- Gradient HPLC défini au **TABLEAU 2** ci-après :

TABLEAU 2

Temps	Débit (μ l)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	300	95	5
3	300	95	5
15	300	78	22
16	300	0	100
24	300	0	100
24,1	300	95	5
32	300	95	5

L'éluat en sortie de colonne chromatographique est directement injecté dans la source d'ionisation du spectromètre de masse de type QTRAP® 5500 de la société Applied Biosystems (Foster City, Etats Unis d'Amérique).

Les paramètres machine utilisés sont les suivants :

	Type de balayage:	MS/MS/MS (MS3)
	Polarité:	Positive
	Mode de balayage:	Profile
10	Source d'ionisation:	Turbo V™ (Applied BioSystems)
	Précurseur:	636,80 Da
	Ion 1 ^{ère} génération:	472,30 Da
	Réglage Q1:	Filtrage avec résolution unitaire
	Réglage Q3:	Trappe ionique linéaire
15	Vitesse de balayage:	10000 Da/s
	Piégeage en Q0:	Oui
	Temps de remplissage de la trappe ionique linéaire en Q3 :	200,00 ms
	Tension en entrée de Q3:	8,00 V
	Fragmentation:	Oui
20	Temps d'excitation:	25,00 ms
	Incrément de balayage de la trappe ionique en Q3 :	0,12 Da
	Masse en début du Balayage (Da) :	500,00 Da
	Masse en fin de Balayage (Da) :	850,00 Da
	temps (s) :	0,0350 s

	amplitude des radios fréquences de piégeage début :	4,30
	amplitude des radios fréquences de piégeage fin :	4,48
	Tension de sortie de la trappe à ion (début)	-136,24 V
	Tension de sortie de la trappe à ion (fin)	-125,09 V
5	Gaz rideau:	50,00 psi
	Tension de cône:	5500,00 V
	Température de source:	500,00 °C
	Gaz de nébulisation:	50,00 psi
	Gaz chauffant:	40,00 psi
10	Remplissage de la cellule de collision:	élevé
	Potentiel d'orifice ou en anglais declustering potentiel :	50,00 V
	Potentiel d'entrée avant Q0:	3,00 V
	Energie de collision :	28,00 eV
	Energie d'excitation (AF2):	0,07

15 Le signal obtenu est représenté en fonction du temps sous forme d'un chromatogramme d'ion total (**Figure 1A**).

A chaque instant t , les masses d'ion de seconde génération sont observables sous forme d'un spectre de masse. Un spectre de masse mesure donc les masses des différentes espèces éluées de la colonne et injectées
 20 simultanément dans le spectromètre de masse. C'est ainsi que les masses d'ion fragment de seconde génération élués entre 11,70 et 11,90 minutes sont présentées sur la **Figure 1B**. Certaines de ces masses correspondent aux masses de fragments de seconde génération du peptide protéotypique
 25 LSEPAELTDAVK (**SEQ ID N°50**) du PSA. C'est ainsi que les masses 533,0, 646,2, 757,6, 775,4 et 846,6 correspondent respectivement aux fragments y_5 , y_6 , y_7-H_2O , y_7 et y_8 . Comme bien connu dans l'état de la technique, par convention, le fragment « y_5 » est un fragment ayant pour séquence les 5 derniers acides aminés de la séquence du peptide protéotypique, le fragment « y_6 » les six derniers, etc.

30 Le logiciel Analyst 1.5 (Applied Biosystems) permet d'extraire le courant ionique correspondant à des fenêtres de masse en fonction du temps. Il permet donc d'obtenir un chromatogramme pour des fenêtres, par exemple

d'une unité de masse, correspondant à chaque fragment de seconde génération d'intérêt. Ce chromatogramme est appelé chromatogramme d'ions extraits. Le logiciel Analyst 1.5 permet également de sommer plusieurs chromatogrammes d'ions extraits. Il permet également d'effectuer un lissage du signal selon l'algorithme de Stavitzky et Golay (A. Savitzky and M. Golay (1964). *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. Analytical Chemistry, 36: 1627–1639). C'est ainsi que la **Figure 1c** montre la somme des chromatogrammes d'ions extraits correspondants aux masses des fragments de seconde génération y5, y6, y7-H₂O, y7 et y8 du peptide protéotypique LSEPAELTDAVK (**SEQ ID N°50**) du PSA, lissé sur trois points.

Le logiciel Analyst 1.5 permet ensuite d'intégrer l'aire sous les pics observés sur les chromatogrammes d'ions extraits. C'est ainsi que la mesure du signal de la somme des ions y5, y6, y7-H₂O, y7 et y8 du peptide LSEPAELTDAVK (**SEQ ID N°50**), pour les points de gammes ayant une dose de PSA entre 0 et 1000 ng/ml, a permis d'obtenir le **TABLEAU 3** ci-après :

TABLEAU 3

Aire sous les pics	concentration en PSA (ng/ml)
1,25e+005	0
4,99e+005	1
1,50e+006	5
1,62e+006	10
9,42e+006	50
1,90e+007	100
9,73e+007	500
1,90e+008	1000

Ces résultats permettent d'établir la courbe d'étalonnage représentée **Figure 1D**. Cette courbe est modélisée à l'aide d'une régression linéaire sous forme d'une équation ($y=1,9 \cdot 10^5 X + 2,76 \cdot 10^5$) permettant de calculer la

concentration en PSA pour tout échantillon de sérum humain présentant une dose inconnue de PSA.

A titre d'exemple les sérums des patients suivants sont dosés et permettent d'obtenir les doses suivantes présentées **TABLEAU 4** :

5 **TABLEAU 4**

Patients	Aire sous le pic	concentration calculé (ng/ml)
B2004	1,81E+06	8,07
D4003	8,48E+05	3,01
D4004	1,37E+06	5,77

Exemple 2 : Principe de dosage quantitatif par MRM³ avec calibration interne d'un marqueur tumoral : l'antigène spécifique de la prostate (PSA)

10 Un standard de calibration interne est synthétisé en utilisant des acides aminés comportant des isotopes lourds pour certains atomes selon le protocole décrit dans T. Tortin et all (MCP, 2008 E-pub).

C'est ainsi que le peptide organotypique du PSA LSEPAELTDAVK (**SEQ ID N°50**) est synthétisé chimiquement avec 2 alanines comportant chacune 3 carbones 13 (¹³C) à la place des carbones 12 (¹²C). La synthèse est réalisée avec un synthétiseur ABI433A (Applied Biosystems, Foster City, Etats Unis d'Amérique) et de la L-(¹³C₃)Alanine-N-FMOC (Euriso-Top, Saint-Aubin, France). En fin de synthèse, le peptide lourd est reparti en 30 flacons en verre brun de 4 ml, puis lyophilisé.

20 La pureté du peptide lourd de synthèse est contrôlée par chromatographie couplée avec un analyseur de masse (Trappe ionique LCQ, ThermoFisher Scientific, Waltham, *Massachusetts*, Etats-Unis d'Amérique). Elle est établie comme supérieure à 95%. La quantité de peptide lourd contenu dans les flacons de verre brun est ensuite établie, à partir d'un
25 échantillon de 3 flacons, avec un analyseur d'acides aminés modèle 1100 de

la société Agilent Technologies (Massy, France). Il est ainsi déterminé que les flacons contiennent 790 µg de peptide lourd pur à plus de 95%.

Un flacon de 790µg de peptide lourd est repris par 1 ml d'eau additionné de 0,5% d'acide formique. On obtient une solution mère de peptide lourd à une concentration de $6,2 \cdot 10^{-10}$ mol/µl .

La solution mère du peptide lourd est diluée par 10 dans un mélange acétonitrile/eau (50/50) plus 1% acide formique pour obtenir une solution à $6,2 \cdot 10^{-11}$ mol/µl

La solution à $6,2 \cdot 10^{-11}$ mol/µl est diluée par 10 dans un mélange acétonitrile/eau (50/50) plus 1% acide formique pour obtenir une solution à $6,2 \cdot 10^{-12}$ mol/µl

La solution à $6,2 \cdot 10^{-12}$ mol/µl est diluée par 20 dans un mélange acétonitrile/eau (50/50) plus 1% acide formique pour obtenir une solution à $3,1 \cdot 10^{-13}$ mol/µl

La solution à $3,1 \cdot 10^{-13}$ mol/µl est diluée par 10 dans un mélange acétonitrile/eau (50/50) plus 1% acide formique pour obtenir une solution à $3,1 \cdot 10^{-14}$ mol/µl

La solution à $3,1 \cdot 10^{-14}$ mol/µl est diluée par 10 dans un mélange acétonitrile/eau (50/50) plus 1% acide formique pour obtenir une solution à $3,1 \cdot 10^{-15}$ mol/µl

Les échantillons de sérums de patient et les points de gamme sont traités selon le protocole décrit à l'exemple 1 avec ajout d'un volume de 50 µl de la solution de peptide lourd à $3,1 \cdot 10^{-15}$ mol/µl entre l'étape de digestion enzymatique et l'étape de dessalage sur colonne HLB Oasis Waters.

Les échantillons de sérums de patient et les points de gamme sont ensuite analysés selon le protocole décrit à l'exemple 1, avec ajout du suivi des ions correspondant au peptide lourd à savoir :

Précurseur:	639,80 Da
Ion 1 ^{ère} génération:	475,30 Da

30

Le peptide lourd LSEPAELTDAVK (**SEQ ID N°50**) a les mêmes propriétés physico-chimiques que le peptide natif, et par conséquent le

même temps de rétention en chromatographie. Les deux peptides sont donc injectés simultanément dans le spectromètre de masse. C'est ce qu'il est possible d'observer sur le chromatogramme du peptide LSEPAELTDAVK (**SEQ ID N°50**) natif **Figure 2A** (temps de rétention 11,78 min) et du peptide
5 LSEPAELTDAVK (**SEQ ID N°50**) lourd **Figure 2B** (temps de rétention 11,79 min).

En revanche ce peptide lourd comporte 6 unités de masse de plus que le peptide PSA natif. Il a une masse de 1271,66 g/mol contre 1277,66 g/mol pour le peptide natif.

10 La quantité de peptide lourd est connue ($1,55 \cdot 10^{-13}$ mol) et est identique dans tous les points de la gamme, le signal reconstitué doit donc être constant tout au long de la gamme. Cependant, une variation du signal peut être observée sur le peptide lourd, ce qui signifie que cette même variation a impacté le signal du peptide natif. Il est donc possible d'utiliser le
15 signal du peptide lourd pour corriger le signal du peptide léger. Pour ce faire, un ratio entre les aires des pics chromatographiques, des ions spécifiques natif et lourd de deuxième génération extraits et sommés, est réalisé avec le logiciel Analyst 1.5.

C'est ainsi que la mesure des signaux des sommes des ions y_5 , y_6 , y_7 -
20 H_2O , y_7 et y_8 des peptides LSEPAELTDAVK (**SEQ ID N°50**) natif et lourd, pour les points de gammes ayant une dose de PSA entre 0 et 1000 ng/ml, permet d'obtenir le **TABLEAU 5** ci-après:

TABLEAU 5

concentration en PSA (ng/ml)	aire sous le pic du peptide natif	aire sous le pic du peptide lourd
0	1,25E+05	8,11E+06
1	4,99E+05	9,42E+06
5	1,50E+06	8,96E+06
10	1,62E+06	9,11E+06
50	9,42E+06	9,80E+06
100	1,90E+07	7,48E+06
500	9,73E+07	8,89E+06
1000	1,90E+08	9,55E+06

Ces résultats permettent d'établir la courbe d'étalonnage représentée **Figure 3**. Cette courbe est modélisée à l'aide d'une régression linéaire sous forme d'une équation ($y=0,0208(X_{\text{natif}}/X_{\text{lourd}})+0,0154$) permettant de calculer la concentration en PSA pour tout échantillon de sérum humain présentant une dose inconnue de PSA.

A titre d'exemple, les sérums des patients suivants sont dosés et conduisent aux doses présentées **TABLEAU 6** :

10

TABLEAU 6

patients	aire sous le pic du peptide natif	aire sous le pic du peptide lourd	concentration calculée (ng/ml)
B2004	1,81E+06	8,74E+06	9,24
D4003	8,48E+05	9,42E+06	3,6
D4004	1,37E+06	8,26E+06	7,27

Exemple 3 : Comparaison des dosages quantitatifs du PSA sérique obtenu par MRM³ avec calibration externe ou interne ou par ELISA

15

Les sérums de patients, dont le dosage par MRM³ avec calibration externe ou interne a été exposé respectivement dans les exemples 1 et 2,

sont dosés par ELISA, d'une part à l'aide de la trousse Vidas® TPSA (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et de l'automate Vidas®, et d'autre part, à l'aide de la trousse total PSA et de l'automate Modular Analytics E170 de la société Roche Diagnostics (Mannheim, Allemagne). Dans les deux cas, le

5 protocole décrit par le fournisseur est mis en œuvre. Ces sérums correspondent à des patients atteints d'un cancer de la prostate (PCa) ou d'une hypertrophie bénigne de la prostate (BPH). La comparaison des doses obtenues selon ces 3 méthodes de dosage s'établit comme présentée

TABLEAU 7 :10 **TABLEAU 7**

Patients	Pathologie	Concentration établie en MRM ³ avec calibration externe (ng/ml)	Concentration établie en MRM ³ avec calibration interne (ng/ml)	Concentration 1 établie en ELISA avec la trousse Vidas® TPSA (ng/ml)	Concentration 2 établie en ELISA avec la trousse Total PSA Roche (ng/ml)
B2004	BPH	8,07	9,24	7,89	7,03
D4003	PCa	3,01	3,6	5,72	5,2
D4004	BPH	5,77	7,27	8,23	7,3

Les doses, déterminées à l'aide des méthodes MRM³ avec calibration externe ou interne, conduisent donc à des concentrations en PSA extrêmement proches de celles établies par les méthodes ELISA

15 traditionnelles.

Il faut noter à ce propos que les tests ELISA ne dosent pas toutes les molécules de PSA présentes dans la circulation sanguine. En effet, le PSA forme des complexes avec certaines anti-protéases sanguines comme l'alpha-1 anti-chymotrypsine (ACT) et l'alpha-2 macroglobuline (A2M). Le PSA

20 lié à l'A2M n'est pas détectable par ELISA, alors qu'il est dosable par spectrométrie de masse comme cela a été établi par T. Fortin et al. (MCP, 2008 E-pub). Le complexe PSA-A2M compte pour environ 10% du PSA total, mais cette dose peut être modulée selon la pathologie du patient. Cette

propriété particulière du PSA explique une part des écarts de doses observées entre techniques ELISA et MRM³.

Exemple 4 : Dosage quantitatif de protéines recombinantes de *Treponema pallidum* diluées dans un sérum humain.

5 Cet exemple est réalisé avec 2 protéines de *Treponema pallidum*, agent infectieux de la syphilis, exprimées de façon recombinante (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Pour faciliter l'expression in vitro et la purification des protéines recombinantes, la séquence native des protéines de *Treponema*
10 *pallidum* a été modifiée par le fournisseur. Les séquences exactes des 2 protéines utilisées sont fournies ci-dessous :

SEQUENCE TP435 SYPHILIS

SEQ ID N°51 :

MRGSACVSCTTVCPHAGKAKAEKVECALKGGIFRGTLPAADCPGIDTTVTF
15 NADGTAQKVELALEKKSAPSPLTYRGTWMVREDGIVELSLVSSEQSKAPHE
KELYELIDSNSVRYMGAPGAGKPSKEMAPFYVLKKTCKGSSKYKYHHHHH

SEQUENCE TP574 SYPHILIS

SEQ ID N°52 :

20 MRGSAHHETHYGYATLSYADYWAGELGQSRDVLLAGNAEADRAGDL DAGMFD AVS
RATHGHGAFRQQFQYAVEVLGEKVL SKQETEDSRGRKKWEYETDPSVT KMVRASAS
FQDLGEDGEIKFEAVEGAVALADRASSFMVDSEEYKITNVKVHGMKFVPVAVPHELK
GIAKEKFHFVEDSRVTENTNGLK TMLTEDSFSARKVSSMESPHDLVVDTVGTGYHSR
FGSDAEASVMLK RADGSEL SHREFIDYVMNFNTVRYDYYGDDASYTNLMASYGTKH
25 SADSWWKTGRVPRISCGINYGDFRFGSGPGYYRLTLIANGYRDVVADV RFLPKYEG
NIDIGLKGKVL TIGGADAETLMDAAVDVFADGQPKLVSDQAVSLGQNVLSADFTP GT
EYTVVEVRFKEFGSVRAKVVAQSSKYKTHHHHHH

30 La quantité de protéine recombinante est établie pour Tp435 et Tp574 par dosage de protéine selon la méthode de Bradford (Bradford, M. M. (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) à l'aide du réactif « Protein Assay » de la société Bio-Rad (Hercules, Californie, Etats-Unis d'Amérique).

Le lot de protéine Tp435 a ainsi une dose de 0,97 mg/ml. Le lot de protéine Tp574 a ainsi une dose de 1,4 mg/ml.

5 Les protéines recombinantes TP435 et TP574 sont digérées de la façon suivante :

- Une quantité de 80µg de chaque protéine est prélevée et additionnée de tampon bicarbonate d'ammonium 50mM, pH=8,0 pour obtenir un volume final de 400 µl.

10 - Ajout de 100µl de DTT 150mM.

- Incubation à 95°C pendant 20 minutes.

- Incubation à 60°C pendant 20minutes.

- Refroidissement à température ambiante des échantillons

- Ajout de 100µl d'iodoacétamide 150mM

15 - Incubation pendant 40 minutes à température ambiante à l'obscurité.

- Ajout de 4 µg de trypsine

- Incubation pendant 4 heures à 37°C

- En fin de digestion, la concentration de chaque digest de protéine est de 133,3 µg/ml.

20 Huit volumes de 100 µl de sérum de patients réputés « sains » (Etablissement Français du Sang) sont digérés en parallèle selon le protocole suivant :

-Chaque volume de 100µl de sérum est dilué dans 3ml de bicarbonate d'ammonium 50mM, pH=8,0.

25 -Ajout du DTT pour obtenir une concentration finale de 15mM.

-Réduction à 60°C pendant 40minutes.

-Refroidissement des tubes à température ambiante.

-Ajout d'iodoacétamide pour obtenir une concentration finale de 25 mM.

30 -Alkylation pendant 40minutes à température ambiante et à l'obscurité.

-Ajout de trypsine avec un ratio massique de 1/30.

-Digestion à 37°C pendant 4 heures.

- Ajout de nouveau du DTT pour obtenir une concentration finale de 10mM.
- Réduction à 60°C pendant 40minutes.
- Refroidissement des tubes à température ambiante.
- 5 -Ajout de nouveau de l'iodoacétamide pour obtenir une concentration finale de 15mM.
- Alkylation à température ambiante et à l'obscurité.
- Ajout de nouveau de la trypsine avec un ratio de 1/30.
- Digestion à 37°C pendant toute la nuit.
- 10 -Acidification des échantillons avec de l'acide formique (soit 0,1% final)
- Equilibrage des colonnes HLB Oasis Waters avec 1ml de méthanol, puis 1 ml d'eau « ultrapure »/acide formique 0,1%
- Dépôt de l'échantillon qui est laissé couler par gravité
- Lavage avec 1 ml d'un mélange eau/acide formique 0,1%
- 15 -Elution avec 1ml de méthanol 80% dans un mélange eau/acide formique 0,1%
- Séchage des tubes à l'évaporateur de type sSpeedVac® SPD2010 (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis d'Amérique) pendant 1 heure jusqu'à l'obtention d'un volume de 500 µl environ.
- 20 -Mélange des 8 tubes de sérums traités pour obtenir un pool de sérum digéré homogène.
- Réalisation des gammes d'étalonnage :
- 50µl de protéine Tp574 à 133,3 µg/ml est ajouté à 50µl de protéine
- 25 Tp435 à 133,3 µg/ml. Le tout est ajouté à 400 µl d'eau additionnée de 0,1% d'acide formique pour former une solution mère avec une concentration de 26,6µg/ml pour chacune des protéines Tp574 et Tp435 (solution mère). Un volume de 75µl de la solution mère est ensuite dilué dans 125µl d'eau additionnée de 0,1% d'acide formique pour avoir une solution à 10000ng/ml
- 30 par protéine.
- 37,5µl de la solution mère sont dilués dans 162,5µl d'eau additionnée de 0,1% d'acide formique pour obtenir une solution à 5000ng/ml

- 20µl de la solution à 10µg/ml sont dilués dans 180µl d'eau pour avoir une solution à 1000 ng/ml
- 20µl de la solution à 1µg/ml sont dilués dans 180µl d'eau pour avoir une solution à 100ng/ml
- 5 - 20µl de la solution à 100ng/ml dans 180µl d'eau pour avoir une solution à 10ng/ml
- 20µl de la solution à 5µg/ml sont dilués dans 180µl d'eau pour avoir une solution à 500ng/ml
- 20µl de la solution à 500ng/ml sont dilués dans 180µl d'eau pour
- 10 avoir une solution à 50ng/ml
- 7 fractions de sérum digéré, correspondant chacune à 100 µl de sérum avant digestion, sont supplémentées avec respectivement 10 µl de chacune des solutions entre 10000 et 50 ng/ml pour obtenir une gamme étalon avec des points à 1, 5, 10, 50, 100, 500 et 1000ng/ml.
- 15 - La dernière fraction de sérum est supplémentée avec 10µl d'eau, afin d'obtenir un point de gamme à 0 ng/ml.
- Les échantillons et les points de gamme sont analysés avec les paramètres chromatographiques suivants et avec 2 périodes présentant un réglage différent du spectromètre de masse.
- 20 -Chaîne chromatographique Ultimate 3000 de la société Dionex (Sunnyvale, Californie, Etats Unis d'Amérique)
- Colonne Waters Symmetry C18, 2,1mm de diamètre interne, 100mm de long, taille de particule de 3,5µm
- Solvant A : H₂O + 0,1% acide formique
- 25 -Solvant B : ACN + 0,1% acide formique
- Gradient HPLC défini au **TABLEAU 8** ci-après :

TABLEAU 8

Temps	Débit (μ l)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	300	95	5
3	300	95	5
28	300	60	40
30	300	0	100
38	300	0	100
38,1	300	95	5
48	300	95	5

La période 1 correspond au suivi du peptide protéotypique SAPSPLTYR (**SEQ ID N° 53**) de la protéine Tp435. La période 2 correspond au suivi du peptide protéotypique FVPVAVPHELK (**SEQ ID N° 54**) de la protéine Tp574.

Pour chaque peptide protéotypique, des fragments de première génération doublement chargés et comportant une proline en position 1 sont sélectionnés et fragmentés, selon les paramètres machines suivants :

Période 1 pour la protéine Tp435:

10 Les paramètres machine sont les mêmes que pour l'exemple 1, à l'exception des paramètres suivants :

Précurseur: 496,50 Da

Ion 1^{ère} génération: 417,50 Da

Barrière d'entrée en Q3: 4,00 V

15 Masse en début du Balayage (Da) : 430,00 Da

Masse en fin de Balayage (Da) : 750,00 Da

temps (s) : 0,0320 s

amplitude des radios fréquences de piégeage début : 2,88

amplitude des radios fréquences de piégeage fin : 4,10

20 Tension de sortie de la trappe à ion (début) -142,07 V

Tension de sortie de la trappe à ion (fin) -129,13 V

Température de source: 450,00 °C

Gaz chauffant: 50,00 psi

Potentiel d'orifice (ou en anglais declustering potentiel) : 80,00 V
 Energie de collision : 18,00 eV
 Energie d'excitation (AF2): 0,12

Période 2 la protéine Tp574:

- 5 Les paramètres machine sont les mêmes que pour la période 1, à l'exception des paramètres suivants :

Précurseur: 618,40 Da

Ion 1^{ère} génération: 495,50 Da

Masse en début du Balayage (Da) : 500,00 Da

- 10 Masse en fin de Balayage (Da) : 850,00 Da

temps (s) : 0,0350 s

amplitude des radios fréquences de piégeage début : 3,15

amplitude des radios fréquences de piégeage fin : 4,48

Tension de sortie de la trappe à ion (début) -139,24 V

- 15 Tension de sortie de la trappe à ion (fin) -125,09 V

Potentiel d'orifice (ou en anglais declustering potentiel) : 90,00 V

Energie de collision : 25,00 eV

Energie d'excitation (AF2): 0,09

- 20 La mesure du signal de la somme des ions y_3 et y_5 (m/z 649.4 et 439.4) du peptide protéotypique SAPSPLTYR (**SEQ ID N°53**) de la protéine TP435, pour les points de gammes ayant une dose entre 5 et 50 ng/ml, a permis d'obtenir le **TABLEAU 9** ci-après :

TABLEAU 9

concentration (ng/ml)	aire du pic	Signal sur bruit	limite de quantification (ng/ml)
5	1,82E+05	1	28,4
10	1,55E+05	1	
50	2,05E+06	17,6	

- 25 La mesure du signal de la somme des ions y_5 et y_7 (m/z 623.4 et 793.4) du peptide protéotypique FVPVAVPHELK (**SEQ ID N°54**) de la

protéine TP 574, pour les points de gammes ayant une dose entre 5 et 50 ng/ml, a permis d'obtenir le **TABLEAU 10** ci-après :

TABLEAU 10

concentration (ng/ml)	aire du pic	Signal sur bruit	limite de quantification (ng/ml)
5	6,14E+05	6,3	8,7
10	2,58E+06	11,5	
50	1,92E+07	61,9	

5 Ces résultats permettent d'établir les courbes d'étalonnage pour les protéines Tp435 et Tp574 respectivement représentées sur les **Figures 4A et 4B**.

Ces courbes sont modélisées à l'aide de régression linéaire sous forme d'équations permettant de calculer la concentration en Tp435 et Tp574 pour
10 tout échantillon de sérum humain présentant une dose inconnue de Tp435 ou de Tp574.

La concentration de Tp435 se calcule grâce à l'équation : $y = 4,14 \cdot 10^5 X - 1,5 \cdot 10^6$

La concentration de Tp574 se calcule grâce à l'équation : $y = 4,38 \cdot 10^4 X - 1,5 \cdot 10^5$
15

Exemple 5 : Amélioration des performances des dosages quantitatifs avec la méthode MRM³ utilisant des ions dichargés comme fragment de première génération

20 Les performances analytiques obtenues à l'exemple 4 sont comparées, dans les mêmes conditions de traitement de l'échantillon, aux performances obtenues avec un dosage MRM traditionnel ou avec un dosage MRM³ n'utilisant pas de fragment de première génération dichargé. Pour chaque protéine, le même peptide protéotypique est dosé par les trois méthodes, à
25 savoir le peptide LSEPAELTDAVK (**SEQ ID N°50**) pour le PSA, le peptide SAPSPLTYR (**SEQ ID N°53**) pour la protéine Tp435 et le peptide FVPVAVPHELK (**SEQ ID N°54**) pour la protéine Tp574.

L'analyse est réalisée avec des échantillons préparés selon le protocole de l'exemple 4 avec une solution mère comportant 50µl de protéine Tp574 à 133,3 µg/ml, plus 50µl de protéine Tp435 à 133,3 µg/ml, plus 50 µl de protéine PSA à 133,3 µg/ml, plus 350 µl d'eau additionnée de 0,1% d'acide
5 formique.

L'analyse en MRM³ avec des fragments de première génération dichargés est réalisée avec la méthode de chromatographie et de spectrométrie de masse décrite à l'exemple 4 pour les trois protéines. Les réglages du spectromètre de masse sont établis sur 3 périodes
10 correspondant aux réglages adaptées à chaque peptide protéotypique. Ce dosage est appelé procédé 1 pour cet exemple.

L'analyse en MRM³ avec des fragments de première génération monochargé est réalisée avec les ions y₉ (943,5m/z) pour le peptide protéotypique du PSA de m/z 636,8, (y₅, 649,2m/z) pour le peptide
15 protéotypique de Tp435 de m/z 496,8 et (y₅, 623,3m/z) pour le peptide protéotypique de Tp574 de m/z 618,8. Le pic chromatographique est obtenu en sommant le signal des fragments de deuxième génération de m/z 609+627+646+698 pour le peptide protéotypique du PSA, 631,2+457,4+475,4 pour le peptide protéotypique de Tp435 et
20 477,5+364,2+605,4 pour le peptide protéotypique de Tp574. Ce dosage est appelé procédé 2 pour cet exemple.

Pour le procédé 2 le fonctionnement du spectromètre de masse est divisé en 3 périodes.

Période 1 pour le PSA:

25 Les paramètres machine sont les mêmes que pour l'exemple 1, à l'exception des paramètres suivants :

Précurseur:	636,80 Da
Ion 1 ^{ère} génération:	943,50 Da
Masse en début du Balayage (Da) :	600,00 Da
30 Masse en fin de Balayage (Da) :	800,00 Da
temps (s) :	0,0200 s
amplitude des radios fréquences de piégeage début :	3,53

- | | | |
|----|--|-----------|
| | amplitude des radios fréquences de piégeage fin : | 4,29 |
| | Tension de sortie de la trappe à ion (début) | -135,20 V |
| | Tension de sortie de la trappe à ion (fin) | -127,11 V |
| | Température de source: | 450,00 °C |
| 5 | Gaz chauffant: | 50,00 psi |
| | Potentiel d'orifice (ou en anglais declustering potentiel) : | 120,00 V |
| | Potentiel d'entrée avant Q0: | 4,00 V |
| | Energie de collision : | 23,00 eV |
| | Energie d'excitation (AF2): | 0,12 |
| 10 | Période 2 pour la protéine TP435 : | |
| | Les paramètres machine sont les mêmes que pour la période 1, à l'exception des paramètres suivants : | |
| | Précurseur: | 496,50 Da |
| | Ion 1 ^{ère} génération : | 649,20 Da |
| 15 | Barrière d'entrée en Q3: | 4,00 V |
| | Masse en début du Balayage (Da) : | 430,00 Da |
| | Masse en fin de Balayage (Da) : | 640,00 Da |
| | temps (s) : | 0,0210 s |
| | amplitude des radios fréquences de piégeage début : | 2,88 |
| 20 | amplitude des radios fréquences de piégeage fin : | 3,68 |
| | Tension de sortie de la trappe à ion (début) | -142,07 V |
| | Tension de sortie de la trappe à ion (fin) | -133,58 V |
| | Potentiel d'orifice (ou en anglais « declustering potentiel ») : | 80,00 V |
| | Energie de collision : | 23,00 eV |
| 25 | Energie d'excitation (AF2): | 0,12 |
| | Période 3 pour la protéine Tp574: | |
| | Les paramètres machine sont les mêmes que pour la période 1, à l'exception des paramètres suivants : | |
| | Précurseur: | 618,40 Da |
| 30 | Ion 1 ^{ère} génération: | 623,30 Da |
| | Barrière d'entrée en Q3: | 4,00 V |
| | Masse en début du Balayage (Da) : | 350,00 Da |

	Masse en fin de Balayage (Da) :	620,00 Da
	temps (s) :	0,0270 s
	amplitude des radios fréquences de piégeage début :	2,58
	amplitude des radios fréquences de piégeage fin :	3,60
5	Tension de sortie de la trappe à ion (début)	-145,30 V
	Tension de sortie de la trappe à ion (fin)	-134,39 V
	Energie de collision :	35,00 eV
	Energie d'excitation (AF2):	0,10

10 L'analyse en MRM est réalisée avec les ions y9 (943,5m/z) pour le peptide protéotypique du PSA de m/z 636,8, (y5, 649,2m/z) pour le peptide protéotypique de Tp435 de m/z 496,8 et (y5, 623,3m/z) pour le peptide protéotypique de Tp574 de m/z 618,8. Ce dosage est appelé procédé 3 pour cet exemple.

15 Pour le procédé 3 les paramètres du spectromètre de masse sont les suivant :

	Type de balayage:	MRM (MRM)
	Polarité:	Positive
	Source d'ionisation:	Turbo V™ (Applied BioSystems)
	Réglage Q1:	Filtrage avec résolution unitaire
20	Réglage Q3:	Filtrage avec résolution unitaire
	Pause entre deux balayages:	5,007ms
	Q1 Mass (Da)	496,20
	Q3 Mass (Da)	649,30
	Temps de balayage	30,00
25	Potentiel d'orifice	110V
	Energie de collision	25 e-V
	Potentiel de sortie de cellule de collision	10 V
	Q1 Mass (Da)	636,8
30	Q3 Mass (Da)	943,5
	Temps de balayage	35,00
	Potentiel d'orifice	115V

	Energie de collision	23 e-V
	Potentiel de sortie de cellule de collision	22 V
	Q1 Mass (Da)	618,4
5	Q3 Mass (Da)	623,4
	Temps de balayage	35,00
	Potentiel d'orifice	120V
	Energie de collision	29 e-V
	Potentiel de sortie de cellule de collision	10 V
10		
	Gaz rideau:	50,00 psi
	Tension de cône:	5500,00 V
	Température de source:	500,00 °C
	Gaz de nébulisation:	50,00 psi
15	Gaz chauffant:	40,00 psi
	Remplissage de la cellule de collision	9,00 (unité arbitraire)
	Epotentiel d'entrée avant Q0	5,00 V

La limite de quantification des 3 protéines est déterminée en calculant la dose de protéine pour laquelle un ratio du signal divisé par le bruit de fond de 10 est obtenu, comme présenté **TABLEAU 11**.

TABLEAU 11

Protéines	procédé 1		procédé 2		procédé 3	
	Signal sur bruit du pic à 50ng/ml	limite de quantification (en ng/ml) sur ion première génération dichargé	Signal sur bruit du pic à 50ng/ml	limite de quantification (en ng/ml) sur ion première génération monochargé	Signal sur bruit du pic à 50ng/ml	limite de quantification (en ng/ml) en MRM
TP574	57,5	8,7	6,4	78,1	3,2	156,3
TP435	17,6	28,4	4,3	116,3	11,9	42,0
PSA	34,8	14,4	16,1	31,1	19,4	25,8

Les limites de quantifications obtenues avec le procédé décrit dans la présente invention sont nettement plus basses que celles obtenues avec les procédés 2 et 3. La présente invention conduit donc à un dosage quantitatif plus sensible que les autres procédés.

5

Exemple 6 : Optimisation de l'énergie de collision

Le choix de l'ion précurseur et du fragment de première génération pour réaliser la MRM³ est primordial. Il ne faut pas nécessairement choisir le fragment de première génération le plus intense. Dans le cadre de
10 l'invention, il a été mis en évidence que les ions dichargés ayant une proline ou une histidine présentent une fragmentation plus spécifique et génèrent moins de fragmentations secondaires en MS³ et qu'ils sont beaucoup plus adaptés pour obtenir le dosage quantitatif le plus performant.

A titre d'exemple, l'énergie de collision du peptide protéotypique
15 SAPSPLTYR (**SEQ ID N°53**) de la protéine Tp435 a été optimisée.

Un volume de 50 µl de la protéine Tp435 est digéré, dessalé sur HLB Oasis Waters et ajouté à 300µl d'un mélange ACN/eau 50/50 plus 0,1% d'acide formique. Le mélange est ensuite infusé dans le spectromètre de masse avec un débit de 10µl/minute.

20 Les paramètres machines sont les suivants :

Type de balayage:	Magnification des ions produits (ou en anglais Enhanced Product Ion ou EPI)
Polarité:	Positive
Mode de balayage:	Profile
25 Source d'ionisation:	Turbo V (Applied Biosystems)
Précuseur:	496,20 Da
Resolution en Q1:	Unitaire
Vitesse de balayage:	10000 Da/s
Piégeage en Q0:	Non
30 Temps de remplissage de la trappe ionique linéaire en Q3 :	1,00 ms
Remplissage dynamique:	Actif
TIC Target	EMS Scan: 10,00 .10 ⁷ coups.

- Cible de courant total (en anglais TIC Target) : $10,00 \cdot 10^7$ coups.
- Temps maximum de remplissage: 250,000 ms
- Temps minimum de remplissage 0,050 ms
- Temps de remplissage par défaut : 1,000 ms
- 5 Tension en entrée de Q3: 8,00 V
- Incrément de balayage de la trappe ionique en Q3: 0,12 Da
- Masse en Début du Balayage (Da) : 200,00 Da
- Masse en fin de Balayage (Da) : 667,01 Da
- temps (s) : 0,0467 s
- 10 amplitude des radios fréquences de piégeage début : 2,19
- amplitude des radios fréquences de piégeage fin : 3,82
- Tension de sortie de la trappe à ion (début) : -149,35 V
- Tension de sortie de la trappe à ion (fin) : -125,68 V
- Masse en Début du Balayage (Da) : 667,01 Da
- 15 Masse en fin de Balayage (Da) : 1000 Da
- temps (s) : 0,0333 s
- amplitude des radios fréquences de piégeage début : 3,82
- amplitude des radios fréquences de piégeage fin : 4,99
- Tension de sortie de la trappe à ion (début) : -125,68 V
- 20 Tension de sortie de la trappe à ion (fin) : -108,80 V
- Gaz rideau: 30,00 psi
- Tension de cône: 5500,00 V
- Température de source: température ambiante
- Gaz de nébulisation : 18,00 psi
- 25 Gaz chauffant: température ambiante
- Remplissage de la cellule de collision: élevé
- Potentiel d'orifice : 100,00 V
- Potentiel d'entrée avant Q0: 10,00 V
- Energie de collision : entre 5 et 60 eV
- 30 En paramétrant l'énergie de collision à 40 eV (**Figure 5A**), on observe que le fragment 417,2, correspondant au fragment de première génération dichargé contenant une proline en N terminale, est peu intense comparé à

une fragmentation avec une énergie de collision de 35 ou de 30 eV (respectivement **Figures 5B** et **5C**). Lorsque l'intensité du fragment de première génération 417,2 diminue, l'intensité des autres fragments augmente. Il est donc tentant d'utiliser une énergie de collision de 40 eV en choisissant le fragment de première génération le plus intense, c'est à dire celui de 649,5 Da correspondant à un fragment de première génération monochargé. Ce choix n'est cependant pas optimum comme le montre l'optimisation de l'énergie de collision visible **Figure 5D**.

L'optimisation de l'énergie de collision est effectuée en infusion à 10 µl/min et en faisant varier uniquement l'énergie de collision de 5 à 60eV. La seule différence par rapport aux paramètres précédents est l'utilisation d'un mode de balayage de type MRM avec une sélection de la masse 496,5 Da en Q1 et des masses 417,8 ou 649,5 en Q3 avec un temps de cycle de 100s, ainsi que l'ajustement suivant des paramètres :

15	Gaz de nébulisation :	35,00
	Potentiel d'orifice :	80,00
	Potentiel d'entrée avant Q0:	3,00

L'optimisation de l'énergie de collision des transitions 496,3/417,8, correspondant au fragment dichargé contenant une proline en N terminale, et 496,3/649,5, correspondant au fragment monochargé le plus intense montre sur la **Figure 5D** que l'énergie de collision permet d'obtenir un gain en signal significatif avec la transition 496,3/417,8, selon un dosage correspondant à l'exemple 4.

Ce gain en signal se traduit par un dosage quantitatif présentant de meilleures performances analytiques, caractérisées par une limite de quantification plus basse, comme le montre le **TABLEAU 12**.

TABLEAU 12

Protéine	limite de quantification (ng/ml) avec l'ion de première génération monochargé	limite de quantification (ng/ml) avec l'ion de première génération dichargé
TP574	78,1	8,7

Après optimisation des paramètres de spectrométrie de masse, la limite de quantification obtenue avec l'ion de première génération dichargé, selon le procédé décrit dans la présente invention, est nettement plus basse que celle obtenue avec l'ion de première génération monochargé. La méthode utilisant l'ion de première génération dichargé permet donc d'obtenir une méthode de quantification plus sensible.

10 Exemple 7 : Amélioration des performances des dosages quantitatifs avec la méthode MRM³ utilisant des ions dichargés comme fragment de première génération

La fragmentation du peptide protéotypique SAPSPLTYR (**SEQ ID N°53**) de la protéine Tp435, qui présente deux prolines dont une en position 2, a été comparée en choisissant comme ion de première génération, soit l'ion fragment le plus intense, soit l'ion fragment contenant une proline sous forme monochargée, soit ce même ion sous forme dichargée.

L'ion de première génération monochargé le plus intense est l'ion y5 de m/z 649,2. L'ion fragment de première génération contenant une proline sous forme monochargée ou dichargée est l'ion y7, respectivement de m/z 833,4 pour la forme monochargée et de m/z 417,5 pour la forme dichargée.

Un volume de 50 µl de la protéine Tp435 est digéré, dessalé sur HLB Oasis Waters et ajouté à 300µl d'un mélange ACN/eau 50/50 plus 0,1% d'acide formique. Le mélange est ensuite infusé dans le spectromètre de masse avec un débit de 10µl/minute.

Les paramètres machines sont les suivants :

Pour la MS³ de l'ion de première génération monochargé le plus intense :

	Type de balayage:	MS ³
	Polarité:	Positive
	Mode de balayage:	Profile
	Source d'ionisation:	Turbo V (Applied Biosystems)
5	Précurseur:	496,30 Da
	Ion 1 ^{ère} génération :	649,30 Da
	Résolution en Q1:	Unitaire
	Vitesse de balayage:	10000 Da/s
	Piégeage en Q0:	Oui
10	Temps de remplissage de la trappe ionique linéaire en Q3 :	150,00 ms
	Remplissage dynamique:	Non
	Fragmentation:	Oui
	Temps d'excitation :	25,00 ms
15	Tension en entrée de Q3:	8,00 V
	Incrément de balayage de la trappe ionique en Q3:	0,12 Da
	Masse en Début du Balayage (Da) :	250,00 Da
	Masse en fin de Balayage (Da) :	640,00 Da
20	Amplitude des radios fréquences de piégeage début :	3,08
	Amplitude des radios fréquences de piégeage fin :	4,36
	Tension de sortie de la trappe à ion (début) :	-144,99 V
25	Tension de sortie de la trappe à ion (fin) :	-122,19 V
	Gaz rideau:	20,00 psi
	Tension de cône:	5500,00 V
	Température de source:	température ambiante
	Gaz de nébulisation :	35,00 psi
30	Gaz chauffant:	température ambiante
	Remplissage de la cellule de collision:	élevé
	Potentiel d'orifice :	110,00 V

	Potentiel d'entrée avant Q0:	10,00 V
	Energie de collision :	24 eV
	Energie d'excitation :	0,11 eV
5	Pour la MS ³ de l'ion de première génération monochargé y7 :	
	Type de balayage:	MS ³
	Polarité:	Positive
	Mode de balayage:	Profile
	Source d'ionisation:	Turbo V (Applied Biosystems)
10	Précurseur:	496,30 Da
	Ion 1 ^{ère} génération :	833,40 Da
	Résolution en Q1:	Unitaire
	Vitesse de balayage:	10000 Da/s
	Piégeage en Q0:	Oui
15	Temps de remplissage de la trappe ionique linéaire en Q3 :	150,00 ms
	Remplissage dynamique:	Non
	Fragmentation:	Oui
	Temps d'excitation :	25,00 ms
20	Tension en entrée de Q3:	8,00 V
	Incrément de balayage de la trappe ionique en Q3: 0,12 Da	
	Masse en Début du Balayage (Da) :	300,00 Da
	Masse en fin de Balayage (Da) :	820,00 Da
	Amplitude des radios fréquences de piégeage début :	3,24
25	Amplitude des radios fréquences de piégeage fin :	4,95
	Tension de sortie de la trappe à ion (début) :	-142,06 V
	Tension de sortie de la trappe à ion (fin) :	-111,66 V
	Gaz rideau:	20,00 psi
	Tension de cône:	5500,00 V
30	Température de source:	température ambiante
	Gaz de nébulisation :	35,00 psi
	Gaz chauffant:	température ambiante

	Remplissage de la cellule de collision:	élevé
	Potentiel d'orifice :	110,00 V
	Potentiel d'entrée avant Q0:	10,00 V
	Energie de collision :	24 eV
5	Energie d'excitation :	0,14 eV
Pour la MS ³ de l'ion de première génération dichargé y7 :		
	Type de balayage:	MS ³
	Polarité:	Positive
10	Mode de balayage:	Profile
	Source d'ionisation:	Turbo V (Applied Biosystems)
	Précurseur:	496,30 Da
	Ion 1 ^{ère} génération :	417,50 Da
	Résolution en Q1:	Unitaire
15	Vitesse de balayage:	10000 Da/s
	Piégeage en Q0:	Oui
	Temps de remplissage de la trappe ionique linéaire en Q3 :	150,00 ms
	Remplissage dynamique:	Non
20	Fragmentation:	Oui
	Temps d'excitation :	25,00 ms
	Tension en entrée de Q3:	8,00 V
	Incrément de balayage de la trappe ionique en Q3:	0,12 Da
	Masse en Début du Balayage (Da) :	300,00 Da
25	Masse en fin de Balayage (Da) :	850,00 Da
	Amplitude des radios fréquences de piégeage début :	3,24
	Amplitude des radios fréquences de piégeage fin :	5,05
	Tension de sortie de la trappe à ion (début) :	-142,06 V
	Tension de sortie de la trappe à ion (fin) :	-109,91 V
30	Gaz rideau:	20,00 psi
	Tension de cône:	5500,00 V
	Température de source:	température ambiante

Gaz de nébulisation :	35,00 psi
Gaz chauffant:	température ambiante
Remplissage de la cellule de collision:	élevé
Potentiel d'orifice :	110,00 V
5 Potentiel d'entrée avant Q0:	10,00 V
Energie de collision :	25 eV
Energie d'excitation :	0,12 eV

10 Pour l'ion fragment monochargé de première génération le plus intense, de m/z égale à 649,2, la fragmentation obtenue en MS^3 est, comme dans le cas précédent, très complexe, divisant le signal entre tous les pics de fragmentation secondaire, comme montré sur la **Figure 6A**. Le pic le plus intense du spectre de MS^3 correspond à $3,2 \cdot 10^5$ coups.

15 Pour l'ion fragment de première génération monochargé $\gamma 7$, de m/z égale à 833,4, le spectre de fragmentation observé est très complexe, contenant beaucoup de pics de fragmentation secondaire, comme montré sur la **Figure 6B**. Le pic le plus intense du spectre de MS^3 correspond à $3,8 \cdot 10^5$ coups.

20 Pour l'ion de première génération dichargé $\gamma 7$, de m/z égale à 417,5, la fragmentation obtenue est beaucoup plus simple et le signal est concentré sur 5 pics majoritaires, comme montré sur la **Figure 6C**. Le signal du pic majoritaire est de $7,3 \cdot 10^6$ coups.

25 Ceci montre que le choix du peptide selon la présente invention conduit à un dosage plus sensible et explique le gain en sensibilité observé dans l'exemple 5.

30 Le choix du fragment de première génération pour réaliser la MRM^3 est primordial. Comme montré dans cet exemple, il ne faut pas nécessairement choisir le fragment de première génération le plus intense. Le choix de l'ion précurseur est également important. Dans le cadre de l'invention, il a été mis en évidence que les ions précurseurs doublement chargés ayant deux prolines ou une proline et une histidine présentent une fragmentation plus spécifique et génèrent encore moins de fragmentations secondaires en MS^3

et qu'ils sont beaucoup plus adaptés pour obtenir le dosage quantitatif le plus performant.

REVENDEICATIONS

1 - Procédé pour détecter, de manière quantitative, une protéine cible dans un échantillon comprenant les étapes suivantes :

- 5 a) le traitement de l'échantillon pour générer des peptides,
b) le dosage quantitatif d'au moins un peptide protéotypique généré à partir de la protéine cible, par une technique de spectrométrie de masse dans laquelle :
- 10 i) le peptide protéotypique est ionisé en ions précurseurs, qui sont filtrés en fonction de leur masse m/z , et un ion précurseur de masse $(m/z)_1$ donné est sélectionné en fonction de la protéine cible recherchée,
- ii) l'ion précurseur sélectionné est fragmenté en ions fragments de première génération,
- 15 iii) les ions fragments de première génération générés sont filtrés en fonction de leur masse m/z et un ion fragment de première génération de masse $(m/z)_2$ donné est sélectionné en fonction de la protéine cible recherchée,
- iv) l'ion fragment de première génération sélectionné est fragmenté en ions fragments de deuxième génération,
- 20 v) au moins une partie des ions fragments de seconde génération sont détectés pour donner une série de mesures quantitatives,
- vi) au moins une mesure quantitative associée à un ion de
- 25 seconde génération est sélectionnée est corrélée à la quantité du peptide protéotypique généré et à la quantité de protéine cible présente dans l'échantillon,
- caractérisé en ce que l'ion fragment de première génération de masse $(m/z)_2$ sélectionné est un peptide doublement chargé qui présente une proline et/ou
- 30 une histidine en position 1.

2 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'ion précurseur de masse $(m/z)_1$ sélectionné est un peptide doublement chargé qui contient

un nombre n de 6 à 15 acides aminés, et qui présente au moins une proline au niveau des positions 2 à n-2 et/ou une histidine au niveau des positions 1 à n-2.

3 - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'ion précurseur de masse $(m/z)_1$ sélectionné comprend au moins 2 prolines ou une proline et une histidine.

4 - Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le dosage quantitatif des peptides générés par spectrométrie de masse est précédée d'une séparation par chromatographie ou électrophorèse des peptides générés à l'étape a).

5 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que la séparation par chromatographie utilise une séparation par chromatographie en phase inverse.

6 - Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le dosage quantitatif des peptides générés par spectrométrie de masse est effectuée avec un spectromètre de masse comprenant un triple quadripôle.

7 - Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le dosage quantitatif des peptides générés par spectrométrie de masse est effectuée avec un spectromètre de masse comprenant une trappe ionique.

8 - Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le traitement de l'échantillon est réalisé par digestion avec une enzyme protéase, par exemple la trypsine.

9 - Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'à l'étape v) l'intensité du courant induit par au moins une partie des ions fragments de deuxième génération est détectée en fonction du temps, et le signal obtenu sur une période donnée est décomposé en un spectre de masse des différents ions présents en fonction de leur masse m/z , de manière à obtenir un pic de masse associé à chacun des ions de seconde génération détectés présents sur la période donnée, et le signal correspondant au courant d'au moins un ion de deuxième génération

sélectionné est recomposé, et l'intensité du courant correspondant mesurée est la mesure quantitative sélectionné à l'étape vi).

10 - Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'à l'étape vi), on sélectionne la mesure quantitative associée à l'ion fragment de deuxième
5 génération, présentant le pic m/z le plus intense sur la période donnée.

11 - Procédé selon la revendication 9 ou 10 caractérisé en ce qu'à l'étape vi), la corrélation est effectuée à partir de la somme d'au moins deux
10 mesures quantitatives, chacune étant associée aux ions fragments de deuxième génération présentant les pics m/z les plus intenses sur la période donnée.

12 - Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisés en ce que la corrélation réalisée à l'étape vi) est effectuée grâce à une courbe de calibration.

13 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce que
15 la corrélation réalisée à l'étape vi) est effectuée par calibrage interne avec un peptide lourd.

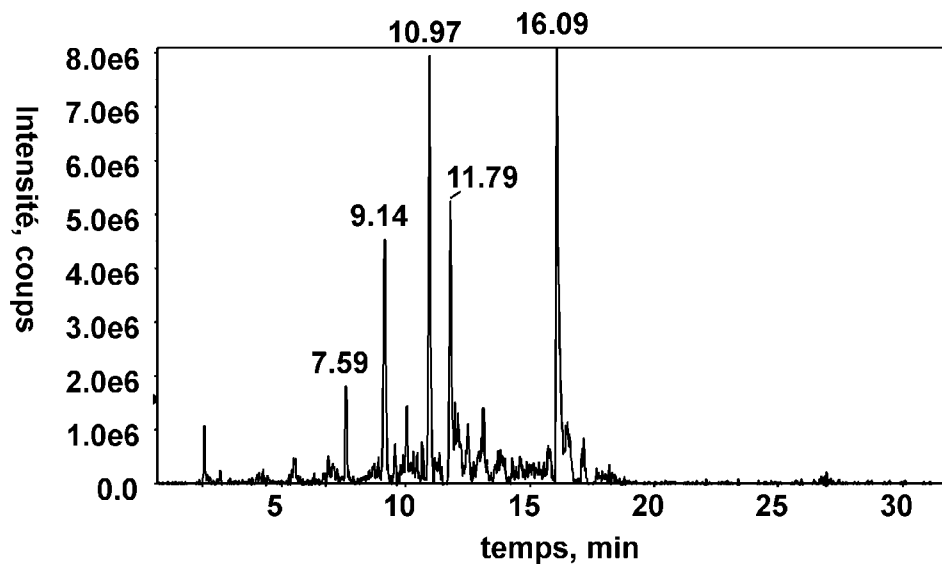


FIG.1A

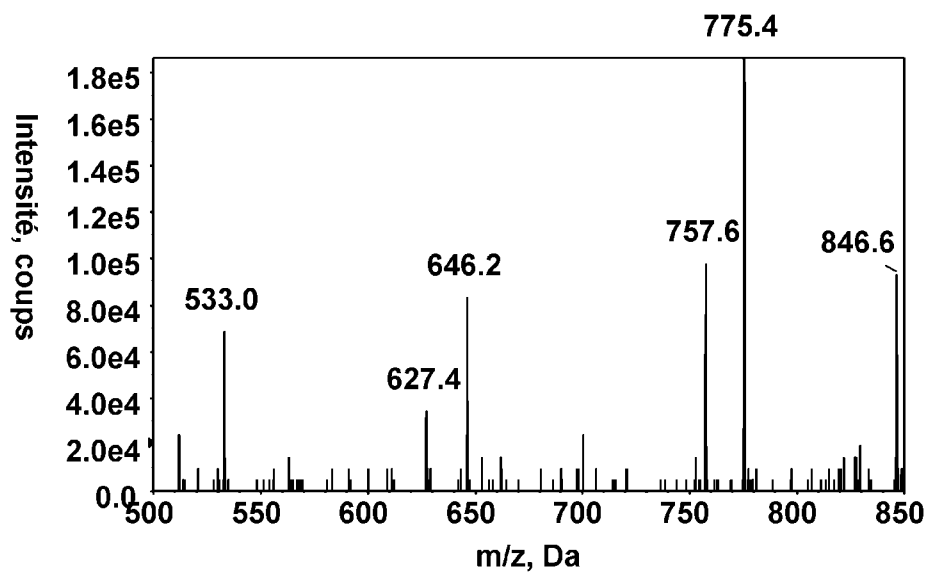


FIG.1B

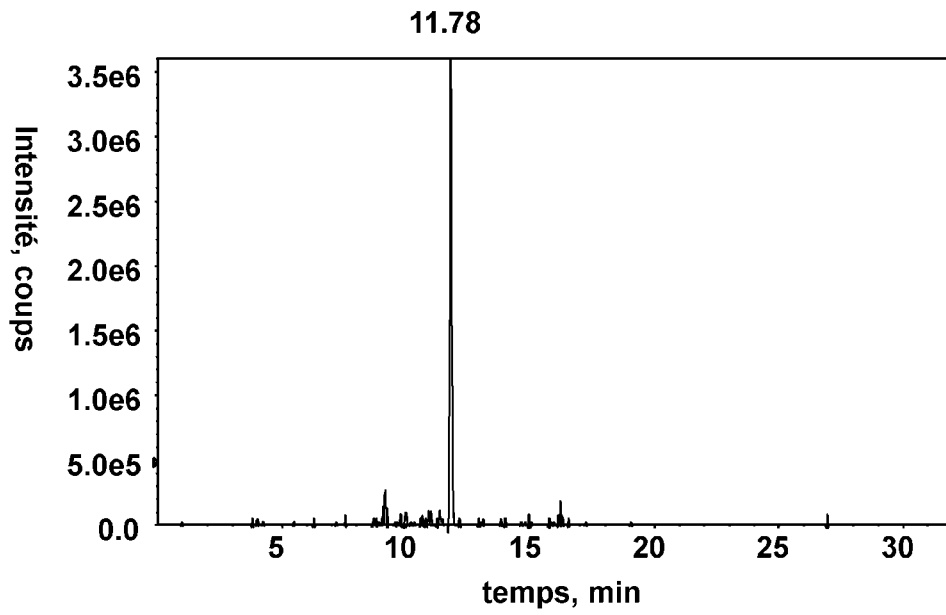


FIG.1C

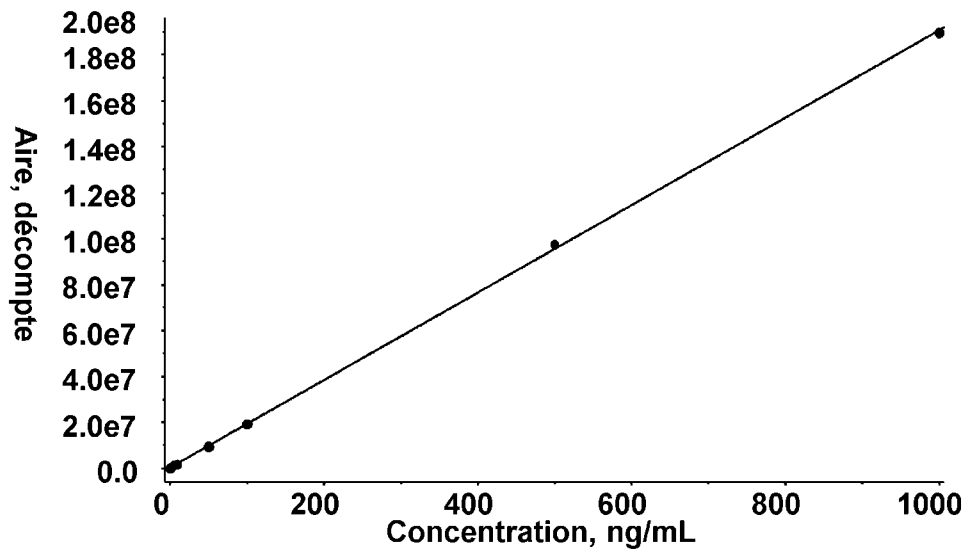


FIG.1D

3/9

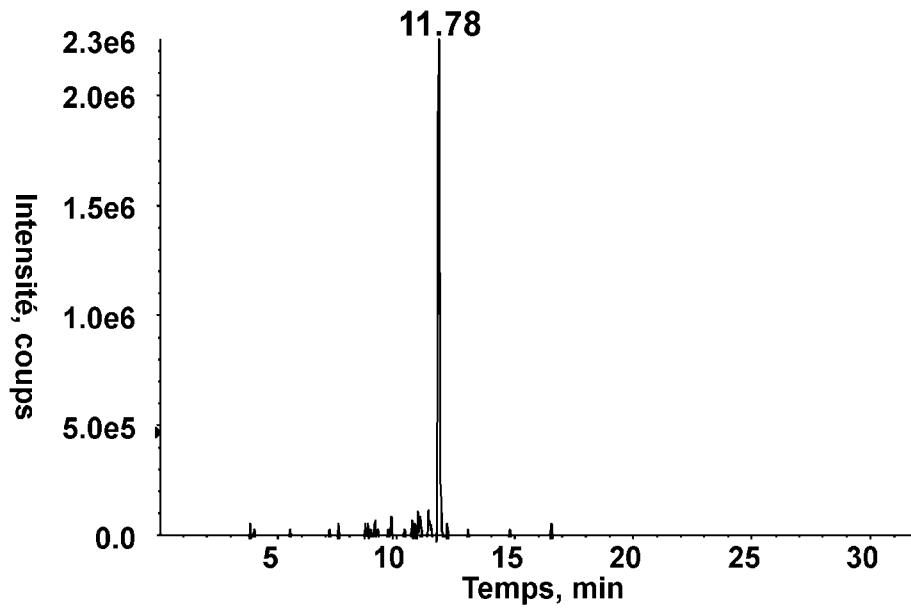


FIG.2A

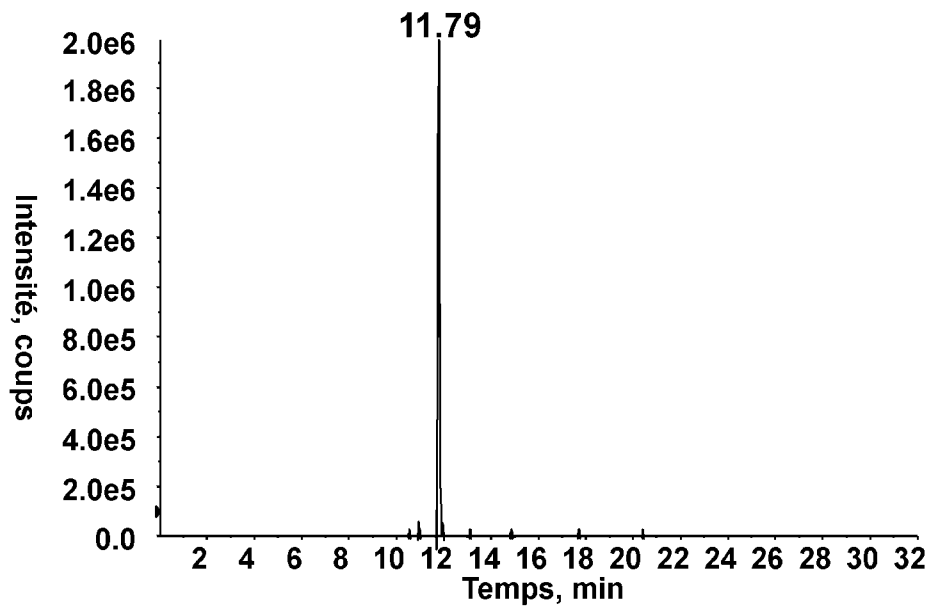


FIG.2B

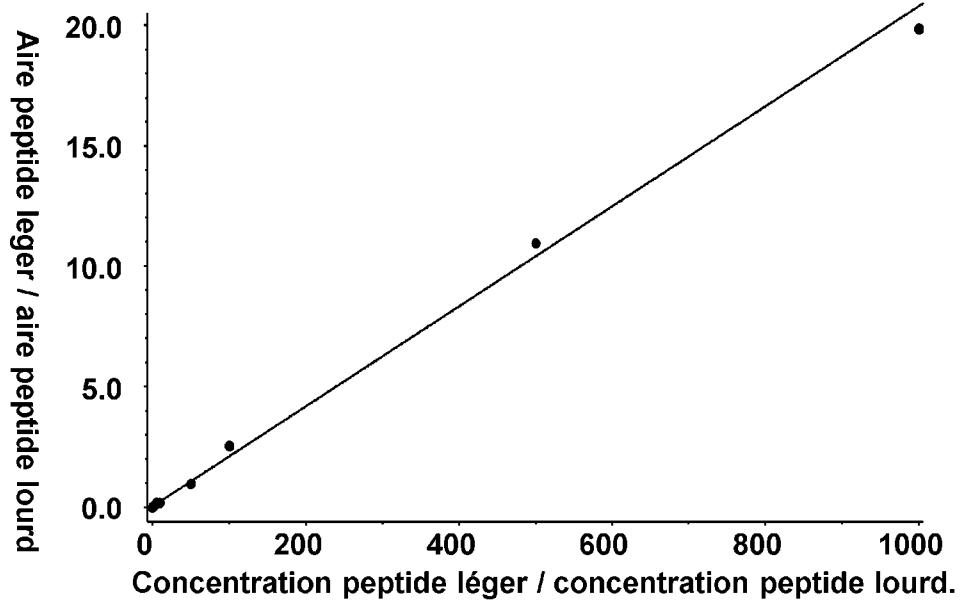


FIG.3

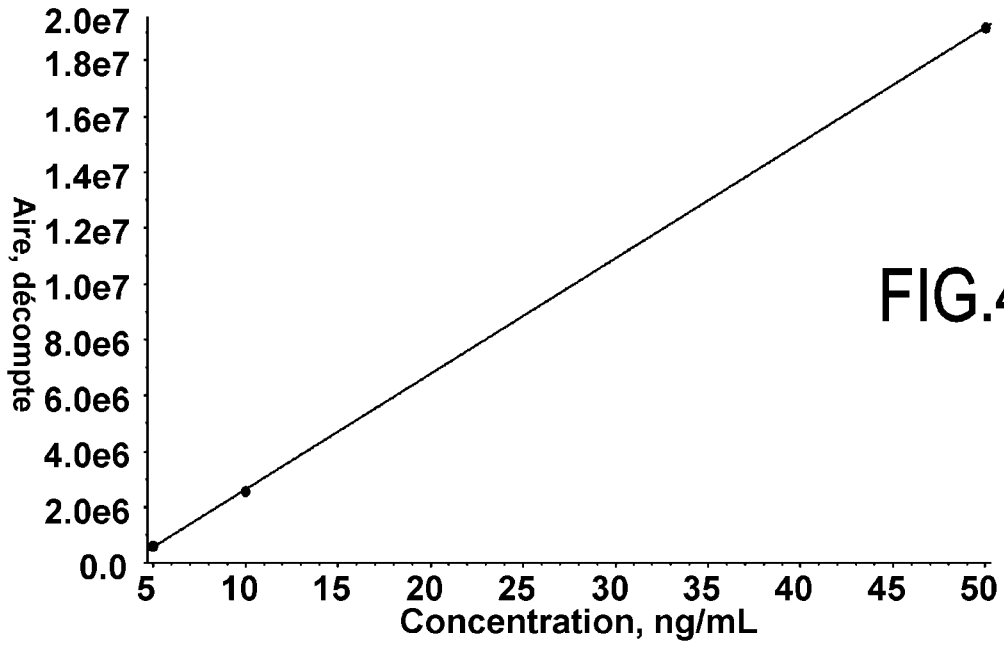


FIG.4A

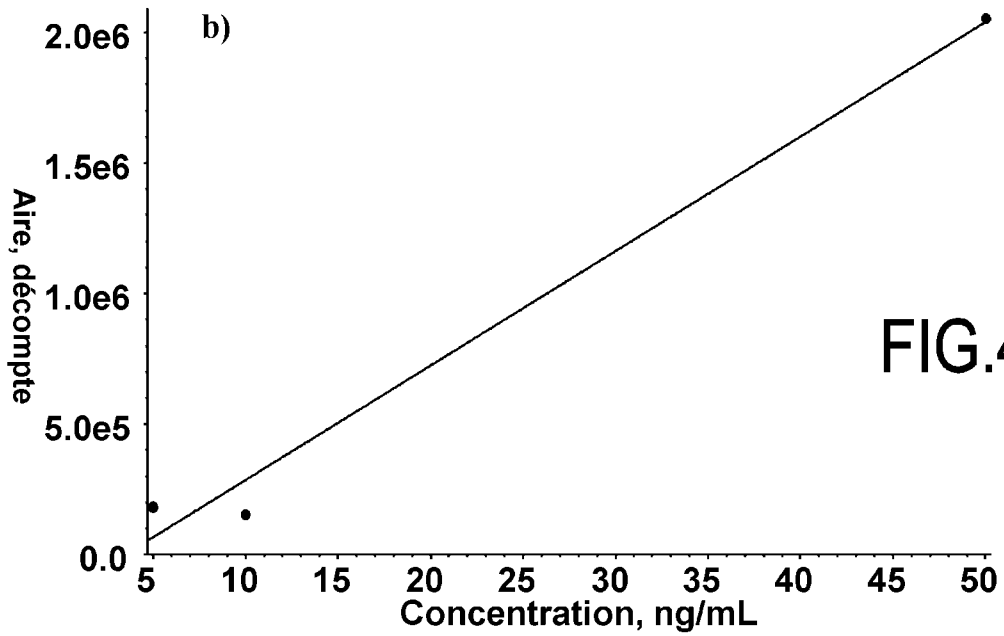


FIG.4B

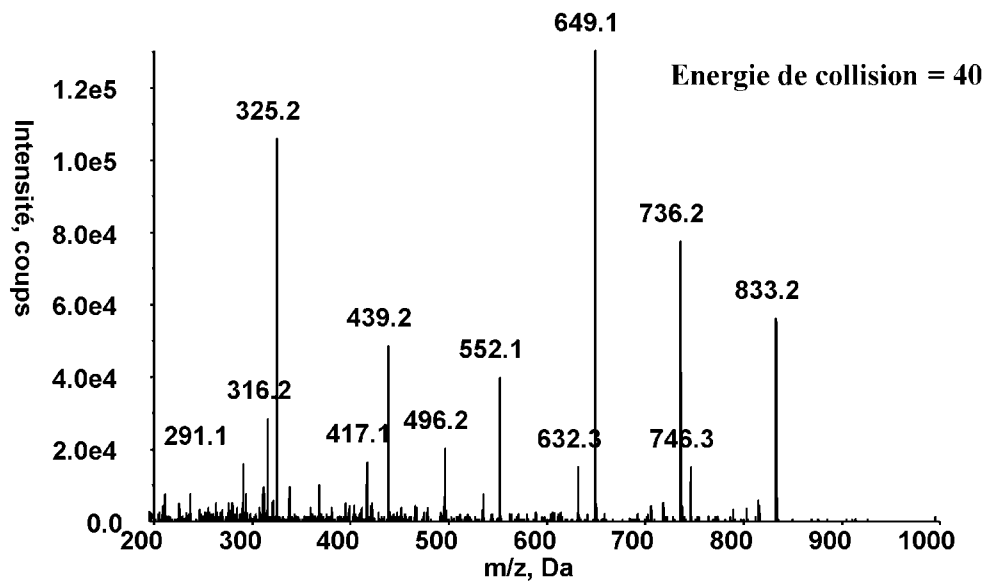


FIG.5A

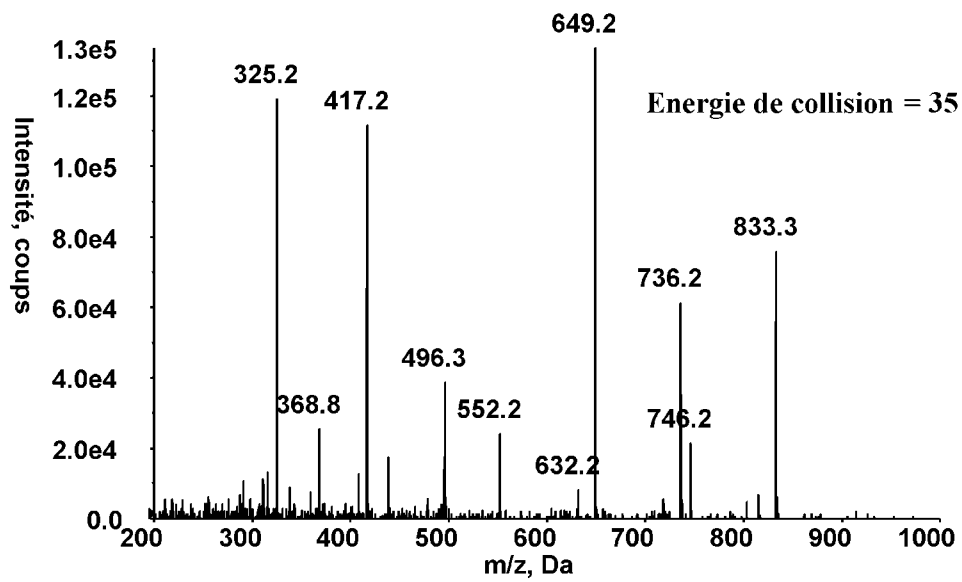


FIG.5B

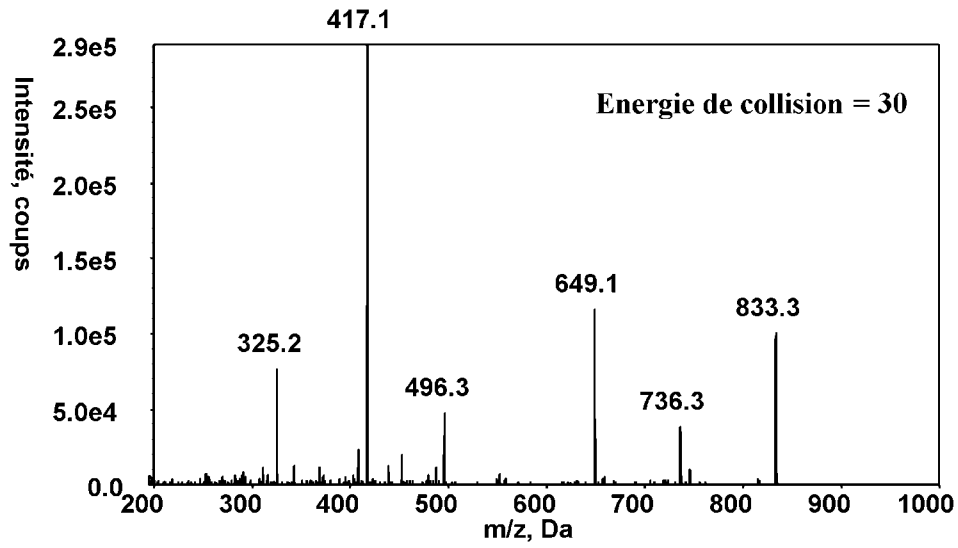


FIG.5C

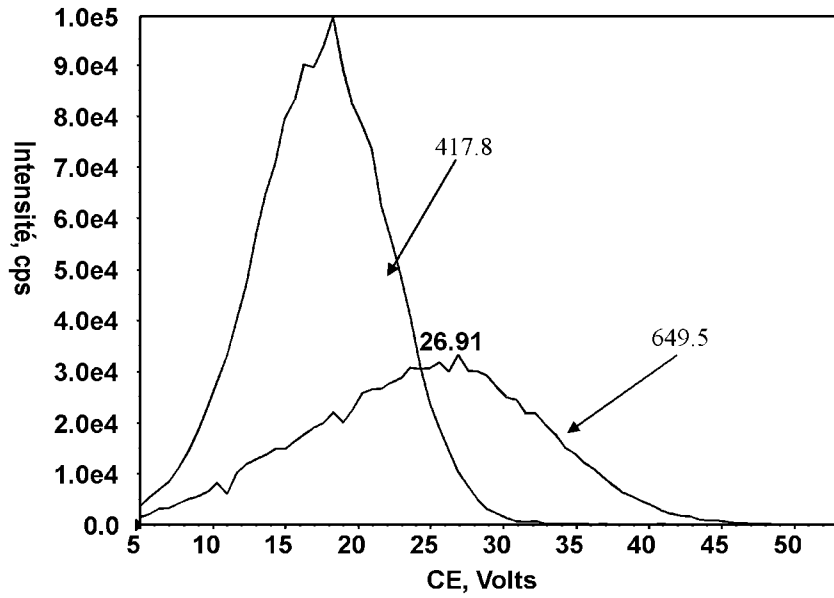


FIG.5D

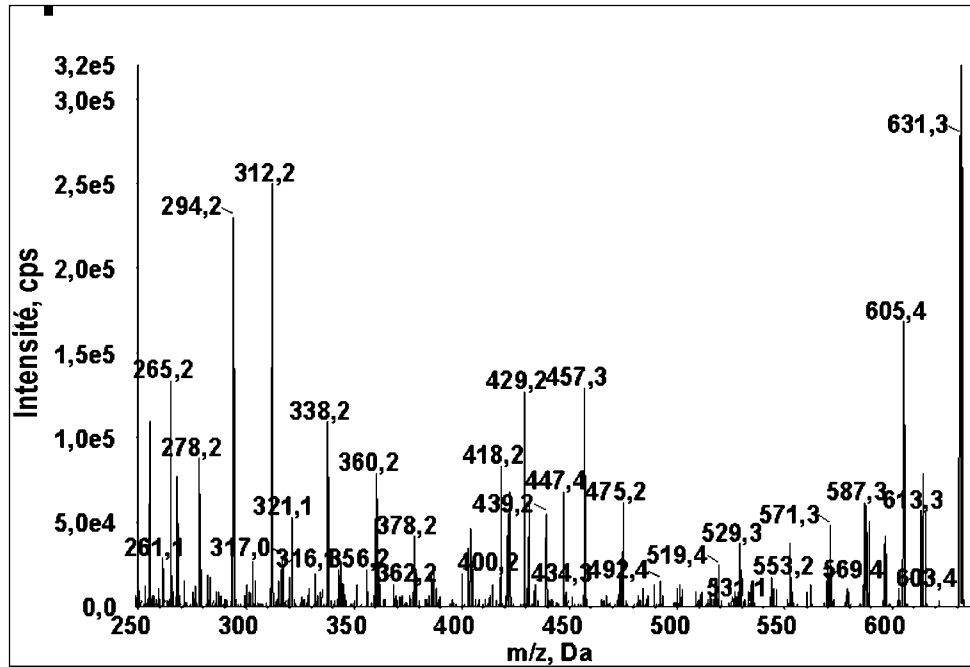


FIG.6A

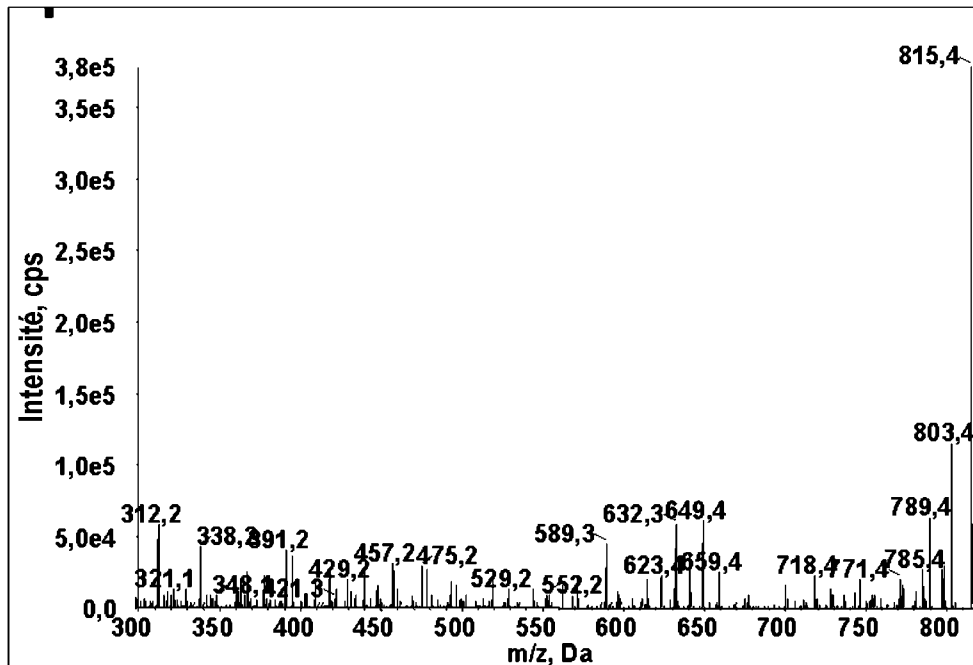


FIG.6B

9/9

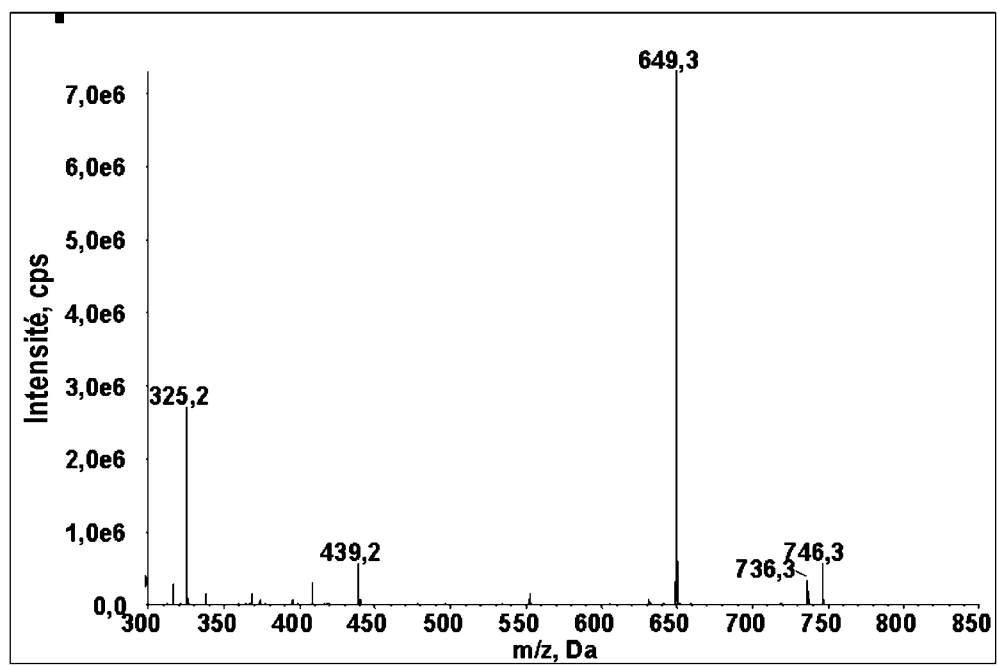


FIG.6C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2010/050991

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAN BOMIE ET AL: "Proteomics: from hypothesis to quantitative assay on a single platform. Guidelines for developing MRM assays using ion trap mass spectrometers" BRIEFINGS IN FUNCTIONAL GENOMICS & PROTEOMICS, vol. 7, no. 5, September 2008 (2008-09), pages 340-354, XP009128978 ISSN: 1473-9550 the whole document ----- -/--	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
23 September 2010	01/10/2010	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Lüdemann, Susanna	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2010/050991

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>IZRAEL-TOMASEVIC ANITA ET AL: "Targeting Interferon Alpha Subtypes in Serum: A Comparison of Analytical Approaches to the Detection and Quantitation of Proteins in Complex Biological Matrices" JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 8, no. 6, June 2009 (2009-06), pages 3132-3140, XP002566819 ISSN: 1535-3893 le document entier, particulièrement abstrait et p. 3133, col. droite, dernier paragraphe - p. 3134, col. gauche, premier paragraphe.et fig. 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
X,P	<p>WO 2009/141310 A1 (ELECTROPHORETICS LTD [GB]; BAUMANN CHRISTIAN [GB]; BYERS HELEN [GB]; S) 26 November 2009 (2009-11-26) the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
T	<p>FORTIN T ET AL: "Multiple reaction monitoring cubed for protein quantification at the low nanogram/milliliter level in nondepleted human serum." ANALYTICAL CHEMISTRY 15 NOV 2009, vol. 81, no. 22, 15 November 2009 (2009-11-15), pages 9343-9352, XP002566821 ISSN: 1520-6882 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2010/050991

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009141310	A1	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2010/050991

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. GOIN33/68 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) GOIN		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HAN BOMIE ET AL: "Proteomics: from hypothesis to quantitative assay on a single platform. Guidelines for developing MRM assays using ion trap mass spectrometers" BRIEFINGS IN FUNCTIONAL GENOMICS & PROTEOMICS, vol. 7, no. 5, septembre 2008 (2008-09), pages 340-354, XP009128978 ISSN: 1473-9550 le document en entier ----- -/--	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 23 septembre 2010		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 01/10/2010
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Lüdemann, Susanna

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	<p>IZRAEL-TOMASEVIC ANITA ET AL: "Targeting Interferon Alpha Subtypes in Serum: A Comparison of Analytical Approaches to the Detection and Quantitation of Proteins in Complex Biological Matrices" JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 8, no. 6, juin 2009 (2009-06), pages 3132-3140, XP002566819 ISSN: 1535-3893 le document entier, particulièrement abstrait et p. 3133, col. droite, dernier paragraphe - p. 3134, col. gauche, premier paragraphe.et fig. 1 -----</p>	1-13
X,P	<p>WO 2009/141310 A1 (ELECTROPHORETICS LTD [GB]; BAUMANN CHRISTIAN [GB]; BYERS HELEN [GB]; S) 26 novembre 2009 (2009-11-26) le document en entier -----</p>	1-13
T	<p>FORTIN T ET AL: "Multiple reaction monitoring cubed for protein quantification at the low nanogram/milliliter level in nondepleted human serum." ANALYTICAL CHEMISTRY 15 NOV 2009, vol. 81, no. 22, 15 novembre 2009 (2009-11-15), pages 9343-9352, XP002566821 ISSN: 1520-6882 le document en entier -----</p>	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2010/050991

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2009141310 ³ A1 ⁵	26-11-2009	AUCUN	