

Nouveaux outils miniaturisés pour l'analyse de biomolécules dans des fluides biologiques

L'analyse de protéines est principalement réalisée selon l'approche bottom-up qui consiste en une digestion enzymatique et l'analyse des peptides obtenus en chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. L'étape de digestion, réalisée en solution, est une procédure longue. L'utilisation de réacteurs à base d'enzymes immobilisées (IMER) ainsi que leur intégration en ligne avec la LC-MS/MS améliore la fiabilité et la sensibilité de la méthode globale. Le premier objectif de cette thèse a été d'évaluer le potentiel des IMER pour la caractérisation de la glycosylation. La complémentarité d'IMER de pepsine et de trypsine, développés en format classique par greffage sur support de Sepharose, a permis d'identifier les N-glycanes sur les 4 sites de glycosylation d'une hormone de grossesse contenue dans 2 médicaments. Le second objectif était la miniaturisation de ces outils. Des monolithes obtenus par voie sol-gel ou par polymérisation radicalaires ont été synthétisés in situ dans des capillaires de 100 μm de diamètre interne. La meilleure répétabilité de synthèse de la voie radicalaire a conduit à la sélection des supports obtenus par cette voie pour leur greffage par de la trypsine ou de la pepsine. Un montage miniaturisé pour l'analyse de digestats a été aussi réalisé. Cela permettra l'inclusion postérieure de l'IMER dans le dispositif analytique.