

**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Interdisciplinarité du vivant

Présentée par

**M. Séga NDIAYE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Recherche des partenaires de l'amyloïde-bêta 1-42 par spectrométrie de masse.**

Soutenue le 07 Décembre 2011

Devant le jury composé de :

M. Nicolas SERGEANT et M. Jean-Michel CAMADRO, rapporteurs

Mme Delphine PFLIEGER et Mme Hélène SENECHAL, examinateurs

M<sup>elle</sup> Joëlle VINH, directrice de thèse



# Résumé

---

L'utilisation de la protéomique et de la spectrométrie de masse est devenue indispensable pour la compréhension au niveau moléculaire de nombreuses pathologies. Le peptide amyloïde bêta (A $\beta$ ) 1-42 tient un rôle central dans le développement de la maladie d'Alzheimer (MA). Cependant, les mécanismes de la toxicité induite par ce peptide sont toujours mal connus. Ce travail vise à identifier les partenaires protéiques de la forme fibrillaire du peptide A $\beta$ , afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires induits par ce peptide et d'identifier d'éventuels candidats comme cibles thérapeutiques de traitement contre la MA. Pour cela, nous avons mis en place une stratégie de co-précipitation des protéines en interaction avec le peptide A $\beta$  1-42 sous forme fibrillaire, en utilisant des protéines extraites de synaptosomes de rat. L'identification des protéines co-précipitées avec les fibrilles est réalisée en LC-MS/MS (Hesse et al. 2011) (ESI-LIT-FTICR). Les résultats obtenus sur six expériences indépendantes nous ont permis d'identifier 172 protéines spécifiquement co-précipitées à l'A $\beta$ . Parmi ces protéines, 11 sont identifiées dans l'ensemble des réplicats biologiques **Ras-related protein Ral-A, Cytochrome b-c1, amine oxidase B, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type 2, mitochondrial import TOM70, Dynamin-like 120 kDa protein, Succinate dehydrogenase, LETM1, EF-hand domain containing protein, Up-regulated during skeletal muscle growth protein et Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex**. Certaines de ces protéines sont associées dans la littérature au contrôle de l'homéostasie du calcium, ou l'organisation des microtubules, qui sont perturbées dans la MA. Afin de pouvoir compléter cette liste nous avons mis au point au laboratoire le couplage entre la chromatographie liquide et les spectromètres de masse équipés d'une source MALDI. Ce couplage nous offre des possibilités d'analyses supplémentaires (Chiappetta et al. 2010) ainsi qu'une complémentarité d'analyse comparé au montage classique (LC-ESI). Pour comprendre la complémentarité protéique et peptidique de ces deux approches (LC-MALDI et LC-ESI) nous avons étudié différents facteurs physico-chimiques pouvant induire une discrimination et une ionisation préférentielle.

Mots clés: Alzheimer, amyloïde-bêta 1-42, synaptosomes, protéomique, ESI, MALDI, complémentarité, spectrométrie de masse

The use of proteomics and mass spectrometry has become essential for understanding the molecular level of many diseases. The amyloid beta peptide (Abeta) 1-42 plays a central role in the development of Alzheimer's disease (AD). However, the mechanisms of toxicity induced by this peptide are still unknown. This work aims to identify different proteins partners of the fibrillar form of Abeta peptide in order to gain a better understanding of the molecular mechanisms induced by this peptide and to identify possible candidates as therapeutic targets for treatment against AD. For this we have implemented a strategy of co-precipitation of proteins interacting with the peptide Abeta 1-42 fibrillar form, using proteins extracted from rat synaptosomes. Identification of proteins co-precipitated with the fibrils is achieved by LC-MS/MS (Hesse et al. 2011) (ESI-LIT-FTICR). Using six independent experiments we have identified 172 proteins that specifically co-precipitated with A $\beta$ . Among these proteins, 11 were identified in all biological replicates **Ras-related protein Ral-A, Cytochrome b-c1, amine oxidase B, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type 2, TOM70 mitochondrial import, Dynamin-like 120 kDa protein, succinate dehydrogenase, LETM1, EF-hand domain containing protein, Up-regulated during skeletal muscle growth and protein-residue succinyltransferase component Dihydropyridyllysine of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex**. Some of these proteins are associated in the literature to control calcium homeostasis, or the organization of microtubules, which are disturbed in AD. In order to increase this list we have developed in the laboratory the coupling between liquid chromatography and mass spectrometers equipped with a MALDI source. This coupling gives to us additional analysis opportunities (Chiappetta et al. 2010) and a complementary analysis compared to conventional way (LC-ESI). To understand the protein and peptide complementarity of these two approaches (LC-MALDI and LC-ESI) we have studied various physico-chemical factors that can induce discrimination and preferential ionization.

Keywords: Alzheimer, amyloid-beta 1-42, synaptosomes, proteomic, ESI, MALDI, complementarity, mass spectrometry.



# Remerciements

---

Une thèse est une expérience enrichissante et formidable, elle comprend des périodes de stress, de doutes et de joies. L'ensemble constitue le meilleur apprentissage du métier de chercheur. Pour moi le hasard n'existe pas et chaque rencontre n'est qu'une suite logique, Joëlle Vinh fait partie de ces rencontres.

Je tiens tout d'abord à la remercier de m'avoir accueilli dans son équipe en Master puis en thèse. Ses précieux conseils, son encadrement de qualité, sa patience et sa gentillesse sont autant de qualités que je ne pourrai pas oublier.

Je remercie également les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mes travaux. En premier lieu Nicolas Sergeant, Jean-Michel Camadro, Delphine Pflieger et Hélène Sénéchal, vos remarques pertinentes et nos discussions me permettront d'améliorer les perspectives de ce travail de thèse.

Je suis très reconnaissant envers Botond Penke de l'université de chimie médicale de Szeged (Hongrie) qui m'a gracieusement fourni les peptides amyloïdes.

Je tiens à remercier très chaleureusement l'ensemble des membres de l'équipe de spectrométrie de masse USR 3149. A Yann Verdier pour ces précieux conseils en biologie, nos discussions sur la maladie d'Alzheimer mais également nos « débats » footballistique (On refait le match ! quand tu veux). A Iman Haddad pour son aide immense en informatique, bio-informatique, macros etc...

A Emmanuelle Demey pour son aide sur le MALDI TOF/TOF (désolé d'avoir saturer la base) et sa patience pour me former sur la technologie MALDI. Au fait je pense avoir un peu de retard sur les saisons de Babylon 5.

A ma « dream team » de thésards et post-docs en commençant par Anne-Marie Hesse, tu m'as grandement aidé dans mes manips en 2DLC et soutenu lors de nos soirées chromatographie.

A Giovanni Chiappetta, monsieur chimie, tes explications en chimie m'ont été très utiles. Nos discussions footballistiques furent souvent passionnées mais je tiens à te dire merci et Forza Napoli. A Sophie Liuu, merci pour ton aide à la fin de ma thèse, je te souhaite bon courage pour la suite de tes travaux. A Chiara Giangrande pour sa bonne humeur et ses délicieux cafés et Houda Bousselmi. Je salue également l'équipe des Masters et BTS en commençant par Emie Durighello, Marie Couzinié, Nicolas Quentin et Dekra Ben Yahia.

J'ai été heureux de partager ces années en vos compagnies j'ai trouvé en vous des collègues formidables mais plus encore des amis.

Un travail de thèse est avant tout un travail collaboratif, c'est pour cette raison que je tiens à remercier les différentes personnes qui ont participé à la réalisation, la finalisation et l'analyse des résultats :

Jean Rossier, directeur du laboratoire de Neurobiologie pour son accueil au sein du laboratoire de Neurobiologie et la liberté qu'il m'a donné pour utiliser l'ensemble du matériel, Sophie Pezet, Karine Thibault, Anne Simon pour leurs conseils en dissection. Je remercie Marcel Léopoldie pour s'être occupé de mes petits rats, sans toi la gestion de l'animalerie aurait été catastrophique.

Je tiens à remercier Isabelle Rivals pour son aide bio-informatique et le traitement statistique de mes données, je sais maintenant que MatLab est un outil formidable.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des thésards du 4<sup>ème</sup>, Alex, Eric, Anne, Karine, Séverine, Clémence, Jack, Julien L, Quentin, Anne-Lise, Delphine, Julien S pour le soutien moral et les discussions de couloirs. Je voudrais également remercier Sylvie Boulet pour sa profonde gentillesse et son soutien.

Un grand « Big Up » à ma fine équipe, mes amis d'enfance, Wajih, Toufik, Jean-Phillipe, Younes, Mathieu, Jérôme, Alpha. Je n'ai pas souvent été disponible les week-ends. Merci pour votre soutien et le nombre incalculables de fou rire.

Je tiens à te remercier Yasmine pour tout ce que tu as fait pour moi ces dernières années tous les mots du monde ne pourront définir ce que tu as fait.

Je voudrais remercier plus particulièrement mes parents pour leur soutien inconditionnel. Vous m'avez toujours aidé dans mes choix. Sans vous je ne serai probablement pas devenu ce que je suis aujourd'hui. Je remercie mes frères et sœurs de m'avoir supporté durant toutes ces années.

Enfin je voudrais remercier tout ce que je n'ai pas cité plus haut qui ont compté pour moi : Jean Pierre Rousset, Maïté Coppey, les amis, la famille.

Merci à vous...

*A mes grands parents*

# Table des matières

---

Résumé.....	3
Remerciements.....	5
Table des matières .....	8
Publications.....	13
Abréviations et quelques définitions.....	15
Liste des Figures et Tableaux.....	18
<b>I Introduction générale.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>II Introduction.....</b>	<b>26</b>
<b>II.1 La maladie d'Alzheimer (MA) .....</b>	<b>26</b>
II.1.1 Un peu d'histoire.....	26
II.1.2 Aujourd'hui.....	27
<b>II.2 Les différents facteurs de risques de la MA.....</b>	<b>27</b>
II.2.1 Les facteurs environnementaux.....	28
II.2.2 Les facteurs vasculaires.....	29
II.2.3 Les facteurs nutritionnels.....	30
II.2.4 Facteurs génétiques.....	30
<b>II.3 Description macroscopique et microscopique des lésions dues à la MA.....</b>	<b>32</b>
II.3.1 Lésions macroscopiques.....	32
II.3.2 Lésions microscopiques.....	33
<b>II.4 Mécanismes moléculaires de la MA .....</b>	<b>34</b>
II.4.1 La protéine précurseur du peptide amyloïde APP.....	34
II.4.2 Protéolyse de l'APP.....	35
<b>II.5 Rôle physiologique du peptide amyloïde (peptide A<math>\beta</math>) .....</b>	<b>38</b>
II.5.1 Le peptide A $\beta$ et la toxicité.....	38
<b>II.6 Mécanismes moléculaires de la toxicité induite par l'A<math>\beta</math> .....</b>	<b>40</b>
<b>II.7 Objectifs de ce travail.....</b>	<b>42</b>
<b>III INTRODUCTION A LA PROTEOMIQUE.....</b>	<b>43</b>
<b>III.1 Introduction a la protéomique .....</b>	<b>43</b>
III.1.1 Avant-propos.....	43
III.1.2 Le protéome.....	43
III.1.3 L'analyse protéomique .....	44
III.1.4 L'analyse protéomique et la stratégie bottom-up.....	44
<b>III.2 Les outils de l'analyse protéomique.....</b>	<b>45</b>
III.2.1 Le gel d'électrophorèse mono et bidimensionnelle.....	46
III.2.2 La chromatographie en phase liquide (HPLC).....	46
<b>III.3 La spectrométrie de masse.....</b>	<b>49</b>
III.3.1 Définition.....	49
III.3.2 Les sources d'ionisations.....	50
III.3.3 Les analyseurs.....	53

<b>III.4 Les couplages LC-MS.....</b>	<b>63</b>
III.4.1 Couplage LC-ESI MS.....	64
III.4.2 Montage monodimensionnel .....	65
III.4.3 Montage bidimensionnel.....	66
III.4.4 La LC-MALDI MS .....	67
<b>III.5 Les configurations de spectrométrie de masse tandem.....</b>	<b>72</b>
III.5.1 MALDI TOF/TOF .....	72
III.5.2 Les hybrides LIT-FTMS .....	77
<b>III.6 La fragmentation induite par collision CID .....</b>	<b>80</b>
III.6.1 Différents types de collision.....	82
III.6.2 La fragmentation peptidique .....	83
III.6.3 Identification des peptides et des protéines.....	83
<b>IV MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>87</b>
<b>IV.1 Test de copréciptation .....</b>	<b>87</b>
IV.1.1 Matériel chimique.....	87
IV.1.2 Matériel biologique .....	87
<b>IV.2 Identification des protéines .....</b>	<b>89</b>
IV.2.1 Réduction et alkylation.....	89
IV.2.2 Digestion enzymatique.....	89
<b>IV.3 Les différents types d'échantillons utilisés lors de nos études. ....</b>	<b>90</b>
IV.3.1 Échantillon Alzheimer .....	90
IV.3.2 Échantillon Standard .....	90
IV.3.3 Comparaison LC MALDI versus LC ESI .....	90
IV.3.4 Mise au point du MALDI Orbitrap. ....	91
IV.3.5 Comparaison LC MALDI TOF/TOF versus LC MALDI LIT-Orbitrap.....	91
<b>IV.4 Chromatographie liquide mono dimensionnelle à polarité de phase inversée.....</b>	<b>91</b>
IV.4.1 Chromatographie Liquide par phase inverse couplée au système nanoESI-LIT-FTICR....	91
IV.4.2 Chromatographie Liquide par phase inverse couplée au système Probot MALDI-TOF/TOF.....	92
IV.4.3 Chromatographie Liquide bidimensionnelle off line .....	92
<b>IV.5 Collecte de l'éluât chromatographique sur plaque MALDI TOF/TOF .....</b>	<b>93</b>
IV.5.1 Collecte de l'éluât chromatographique sur plaque MALDI LIT-Orbitrap.....	93
<b>IV.6 Spectrométrie de masse .....</b>	<b>93</b>
IV.6.1 Spectromètre de masse nanoESI-LIT-FTICR.....	93
IV.6.2 Spectromètre de masse nano ESI-QqTOF .....	94
IV.6.3 Spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF .....	94
IV.6.4 Spectromètre de masse MALDI Orbitrap .....	94
<b>IV.7 Recherche dans les banques de données.....</b>	<b>95</b>
IV.7.1 Paramétrage des recherches .....	95
IV.7.2 Validation des protéines.....	97
<b>IV.8 Recherche des partenaires du peptide A<math>\beta</math> par LC-MS/MS .....</b>	<b>97</b>
IV.8.1 Stratégie expérimentale .....	97
IV.8.2 Analyse LC-MS/MS .....	100
IV.8.3 Identification des protéines .....	103
IV.8.4 Protéines déjà décrites comme pouvant interagir avec l'A $\beta$ .....	108
IV.8.5 Classification des protéines identifiées .....	109
IV.8.6 Conclusion .....	120

<b>IV.9</b>	<b>Optimisation du système LC-MALDI TOF/TOF</b> .....	<b>121</b>
IV.9.1	Spécificité du couplage LC-MALDI .....	121
IV.9.2	Marquage au dansyle et amélioration du signal en LC-MALDI .....	135
IV.9.3	Conclusion .....	139
<b>IV.10</b>	<b>La configuration MALDI LTQ Orbitrap</b> .....	<b>140</b>
IV.10.1	Le MALDI-Orbitrap et la cartographie peptidique .....	140
IV.10.2	Le MALDI-Orbitrap et la MS/MS .....	142
IV.10.3	LC-MALDI-Orbitrap .....	144
IV.10.4	LC MALDI-Orbitrap versus LC-MALDI-TOF/TOF .....	150
IV.10.5	Conclusion .....	155
<b>IV.11</b>	<b>Etude de la complémentarité des modes d'ionisation ESI et MALDI</b> .....	<b>156</b>
IV.11.1	Comparaison MALDI-TOF/TOF, l'ESI-FTICR, l'ESI-Orbitrap et MALDI Orbitrap ..	157
IV.11.2	Comparaison LC- MALDI-TOF/TOF <i>vs.</i> LC-ESI-FTICR d'un échantillon de protéines d' <i>Escherichia coli</i> .....	159
IV.11.3	Comparaison LC- MALDI-TOF/TOF <i>vs.</i> LC-ESI-FTICR de polygones de souris .....	163
IV.11.4	Comparaison 2D-LC-MALDI TOF/TOF <i>vs.</i> 2D-LC-ESI-FTICR .....	167
IV.11.5	Analyses des caractères physico-chimiques dans le cadre de la comparaison ESI/MALDI 168	
<b>V</b>	<b>Discussion</b> .....	<b>176</b>
<b>VI</b>	<b>Conclusions &amp; Perspectives</b> .....	<b>187</b>
VI.1	D'un point de vue technologique .....	187
VI.1.1	Perspectives en MALDI MS/MS .....	187
VI.2	L'interactome de l'A $\beta$ fibrillaire .....	190
<b>VII</b>	<b>Conclusion générale</b> .....	<b>193</b>
<b>VIII</b>	<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>197</b>
<b>IX</b>	<b>Annexes</b> .....	<b>210</b>
Annexe 1.	Proteome Screens for Cys Residues Oxidation: The Redoxome; Chiappetta G, Ndiaye S, Igarria A, Kumar C, Vinh J, Toledano MB. <i>Methods Enzymol.</i> 2010; 473:199-216. Review. PMID: 20513479 .....	210
Annexe 2.	Dansyl-peptides matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric (MALDI-MS) and tandem mass spectrometric (MS/MS) features improve the liquid chromatography/MALDI-MS/MS analysis of the proteome. Chiappetta G, Ndiaye S, Demey E, Haddad I, Marino G, Amoresano A, Vinh J. <i>Rapid Commun Mass Spectrom.</i> 2010 Oct 30; 24(20):3021-32. PMID: 20872635 .....	230
Annexe 3.	Reversed-phase HPLC and hyphenated analytical strategies for peptidomics. Hesse AM, Ndiaye S, Vinh J. <i>Methods Mol Biol.</i> 2011;789:203-21. PMID: 21922410 .....	244
Annexe 4.	Tableaux Identification des protéines en présence d'amyloïde bêta après une séparation chromatographique d'une heure. ....	263
Annexe 5.	Tableaux Identification des protéines en présence d'amyloïde bêta après une séparation chromatographique de quatre heures .....	272
Annexe 6.	Etude du mélange standard MALDI-TOF/TOF versus ESI-LIT-FTICR. Peptides communs aux deux modes d'ionisations. ....	314
Annexe 7.	Etude du mélange standard LC-MALDI-TOF/TOF versus LC-ESI-LIT- FTICR. Peptides uniques ESI et peptides uniques MALDI .....	316
Annexe 8.	Etude d'un extrait d' <i>Escherichia Coli</i> . Protéines identifiées pour chaque mode d'ionisation. 317	

Annexe 9.	Etude d'un extrait d'Escherichia Coli. Protéines identifiées pour chaque mode d'ionisation.	318
Annexe 10.	Etude d'un extrait d'Escherichia Coli. Analyse différentielle des peptides en fonction du mode d'ionisation. ....	319
Annexe 11.	Etude de polygones de souris. Protéines identifiées en fonction du mode d'ionisation. (LC-MALDI-TOF/TOF versus LC-ESI-FTICR) .....	323
Annexe 12.	Etude de polygones de souris. Analyse différentielles des peptides identifiés en fonction du mode d'ionisation. ....	324
Annexe 13.	Etude du stratum corneum plantaire en LC2D. Protéines identifiés en fonction du mode d'ionisation.....	329
Annexe 14.	Etude du stratum corneum plantaire en LC2D. Analyse différentielles des peptides identifiés en fonction du mode d'ionisation.....	330



# Publications

---

## 1. *Articles scientifiques dans une revue internationale*

1. Hesse AM, **Ndiaye S**, Vinh J. Reversed-phase HPLC and hyphenated analytical strategies for peptidomics. *Methods Mol Biol.* 2011;789:203-21. PubMed PMID: 21922410.
2. Chiappetta G, **Ndiaye S**, Demey E, Haddad I, Marino G, Amoresano A, Vinh J. Dansyl-peptides matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric (MALDI-MS) and tandem mass spectrometric (MS/MS) features improve the liquid chromatography/MALDI-MS/MS analysis of the proteome. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010 Oct 30;24(20):3021-32. PubMed PMID: 20872635.
3. Chiappetta G, **Ndiaye S**, Igbaria A, Kumar C, Vinh J, Toledano MB. Proteome screens for Cys residues oxidation: the redoxome. *Methods Enzymol.* 2010;473:199-216. Review. PubMed PMID: 20513479.
4. Hesse A.M., **Ndiaye S.**, Marcelo P., Rossier J., Vinh J., Optimized two-dimensional nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry protocols for proteomics applications: *on-line* or *off-line* coupling?, en cours de rédaction.
5. **Ndiaye S.** Verdier Y., Demey E., Haddad I., Vinh J, Proteomic analysis of beta partners of amyloid beta. En cours de rédaction

## 2. *Conférences orales*

1. **Ndiaye S.**, Hesse A.M., Haddad I., Rossier J., Vinh J., Study of complex samples using multiple analytical dimensions: optimization of nanoLC-MALDI orbitrap and evaluation of complementary configurations, 25<sup>ème</sup> congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique, Tours, France, 2008.
2. **Ndiaye S.**, Hesse A.M., Rossier J., Vinh J., Improved knowledge of complex samples by multiplying dimensions of analyses: complementarity of 2D-LC-MALDI and 2D-LC-ESI, 25<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, Grenoble, France, 2008.

## 3. *Posters*

1. Demey E., Durighello E., Couzinie M., **Ndiaye S.**, Vinh J., Micro-ondes, ultrasons et plastiques : un mariage délicat. Congrès Annuel SFEAP Marseille 2010
2. Verdier Y., Fukuyama H., **Ndiaye S.**, Haddad I., Rossier J., Hoffmann J., Vinh J., Purification de protéines par streptavidine-biotine : et après ? Congrès Annuel SFEAP Marseille 2010
3. **Ndiaye S.**, Demey E., Haddad I., Vinh J., Méthodologie analytique par LC-MALDI-Orbitrap 27<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Spectrométrie de Masse Clermont Ferrand 2010
4. Chiappetta G., **Ndiaye S.**, Demey E., Haddad., Amoresano M., Vinh J., G. Chiappetta, S. Ndiaye, E. Demey, I. Haddad, M. Amoresano, J. Vinh. Evaluation of dansyl peptide MALDI MS and MS/MS features to enhance the LC MALDI MS/MS analysis. American Society of Mass Spectrometry. Philadelphia (USA). 2009
5. **Ndiaye S.**, Hesse A.M., Rossier J., Vinh J., Improved knowledge of complex samples by multiplying dimensions of analyses: Complementarity of 2D-LC-MALDI and 2D-LC-ESI, 25<sup>ème</sup> congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique, Tours, France, 2008.
6. **Ndiaye S.**, Hesse A.M., Rossier J., Vinh J., Complementarities of MALDI and ESI for 2DLC MS/MS: Expanding proteome coverage of complex samples with multiple dimensions of analysis, 56<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry, Denver, CO, USA, 2008.

7. Vinh J., Haddad I., **Ndiaye S.**, Hesse A.M., Rossier J., NanoLC-MALDI Orbitrap coupling evaluation: an attempt to optimized the acquisition strategy, 56<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry, Denver, CO, USA, 2008.
8. **Ndiaye S.**, Hesse A.M., Rossier J., Vinh J., Complementarities of MALDI and ESI for 2DLC MS/MS: Expanding proteome coverage of complex samples with multiple dimensions of analysis, 32<sup>nd</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Baltimore, MD, USA, 2008.

# Abréviations et quelques définitions

---

**a.a:** acide aminé  
**A $\beta$ :** Amyloïde Bêta  
**ACN:** acétonitrile  
**ADAM:** Métalloprotéase avec domaine désintégrine  
**ADDL:** *amyloid-beta-derived diffusible ligands*  
**AF:** acide formique  
**AICD:** APP intracellular Domain (Domaine intracellulaire de l'APP)  
**APOE:** Apolipoprotéine  
**APP:** Amyloid Precursor Protein (Protéine précurseur de l'amyloïde)  
**ATP:** Adénosine Tri Phosphate  
**BACE1:** Beta-site APP Cleaving Enzyme 1 (Enzyme clivant l'APP)  
 **$\beta$ C:** Bêta Cristalline  
**BP:** *Base Peak* (pic de base)  
**C83 ou C99:** fragment C-terminal d'APP de 83 ou 99 acides aminés  
**CHCA:** acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy cinnamique  
**cICAT:** *Cleavable Isotope Coded Affinity Tag*  
**CID:** dissociation induite par collision  
**cps:** coups (mesure de l'intensité en masse)  
**d.i:** diamètre interne d'une colonne, d'un capillaire, *etc.*  
**DTT:** dithiothreitol  
**ECD:** dissociation par capture d'électron  
***E.coli:*** *Escherichia coli*  
**EDTA:** acide éthylène-diamine-tétraacétique  
**ESI:** ionisation électrospray  
**FTICR MS:** Spectrométrie de masse par Transformée de Fourier à Résonance Cyclotronique d'Ions  
**g:** force relative de centrifugation.  
**HPLC:** Chromatographie Liquide à Haute Pression  
**ICAT:** *Isotope Coded Affinity Tag*  
**IPr:** isopropanol  
**KEGG pathway** (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)  
**LIT:** trappe d'ions linéaire  
**iTRAQ:** *isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification* (Quantification absolue et relative par étiquette isobarique)  
**L:** longueur d'une colonne chromatographique ou d'un capillaire  
**LC:** chromatographie en phase liquide  
**LC-ESI:** couplage entre chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse équipé d'une source ESI  
**LC-MALDI:** couplage entre chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse équipé d'une source MALDI  
**LC-MS/MS:** couplage entre chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse en tandem  
**LC1D:** chromatographie en phase liquide monodimensionnelle  
**LC2D ou 2DLC:** chromatographie en phase liquide bidimensionnelle  
**MA:** Maladie d'Alzheimer

**MALDI** : désorption-ionisation laser assistée par matrice  
**MALDI-TOF/TOF** : spectrométrie de masse en tandem de type MALDI couplé avec une analyse en temps de vol  
**MALDI-Orbitrap** : spectrométrie de masse en tandem de type MALDI couplé avec une analyse en Orbitrap  
**MeOH** : méthanol  
**MW** : masse moléculaire d'une protéine ou d'un peptide  
**MPT** : modification post-traductionnelle  
**MS** : spectrométrie de masse  
**Mode MS** : mode d'analyse par spectrométrie de masse dans lequel le rapport masse sur charge des analytes ionisés est déterminé  
**Mode MS/MS** : mode d'analyse par spectrométrie de masse dans lequel un ion donné est sélectionné pour être fragmenté. Les ions fragments générés sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge et détectés.  
**MudPiT** : Multi-Dimensional Protein Identification Technology  
**m/z** : rapport masse sur charge, où m est la masse en Dalton (Da) et z le nombre de charges de l'ion

**N** : nombre de plateaux théoriques caractérisant une séparation.  $N = 16 \left( \frac{t_R}{\omega} \right)^2$  (voir figure

associée à la définition de  $R_s$  pour la description de  $t_R$  et  $\omega$ )

**NaCl** : chlorure de sodium

**NanoESI ou nESI** : ionisation nanoélectrospray

**NanoLC ou nLC** : chromatographie en phase liquide utilisant des débits de l'ordre de quelques centaines-dizaines de nL/min

**Nd-YAG** : neodymium-doped yttrium aluminium garnet (grenat d'yttrium-aluminium) cristal utilisé comme amplificateur des lasers.

**peptides protéotypiques** : Les peptides générés à partir de la protéolyse d'une séquence protéique qui sont toujours détectés en MS sont appelés protéotypiques.

**pI** : point isoélectrique

**PMF** : Peptide Mass Fingerprint (Cartographie peptidique de masse)

**ppm** : partie par million

**PS1** : Préséniline 1

**PS2** : Préséniline 2

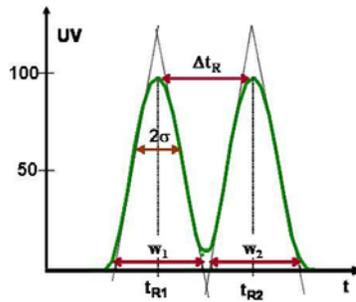
**PS-DVB** : poly-(styrène-divinylbenzène)

**Q** : quadripôle

**$R_s$**  : résolution d'une technique séparative. La résolution  $R_s$  entre deux pics chromatographiques est donnée par :

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{\omega_2 + \omega_1}, \text{ où } t_{R1} \text{ et } t_{R2} \text{ désignent les temps de rétention des deux analytes entre lesquels la}$$

résolution est calculée, et  $\omega_2$  et  $\omega_1$  désignent la largeur de leur pic chromatographique.  $\sigma$  désigne l'écart type mesuré à 60,6% de la hauteur du pic. Généralement, on prend  $4\sigma$  comme définition de  $\omega$ .



**RPLC** : chromatographie en phase liquide à polarité de phases inversée

**SA** : acide sinapinique

**sAPP $\alpha$**  : Soluble APP $\alpha$  fragment de la protéine précurseur de l'amyloïde obtenu par le clivage par la  $\alpha$ -sécrétase

**sAPP $\beta$**  : Soluble APP $\beta$  fragment de la protéine précurseur de l'amyloïde obtenu par le clivage par la  $\beta$ -sécrétase

**SCX-LC** : Chromatographie d'échange de cations forts

**SEC-LC** : chromatographie d'exclusion stérique

**S/B** : rapport signal sur bruit

**SRM**: *Selected Reaction Monitoring*

**TFA**: acide trifluoroacétique

**Th** : Thompson, unité des rapports m/z

**TIM** : Translocase Inner Membrane (Translocase de la membrane interne mitochondriale)

**TMT** : Tandem Mass Tag

**TOF** : analyseur à temps de vol

**TOM** : Translocase Outer Membrane (Translocase de la membrane externe mitochondriale)

**tpm** : tour par minute

**$t_R$**  : temps de rétention chromatographique

**Tris** : 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

**UHPLC** : Chromatographie Liquide à Ultra Haute Pression

**$\mu$ l**: microlitre

**$\mu$ s** : microscan

**v/v** : volume/volume

**Tampon, solvant, phase mobile** : ces trois termes sont employés pour désigner les phases mobiles utilisées en chromatographie en phase liquide. Le mot tampon est utilisé de façon détournée, dans la mesure où la phase mobile aqueuse employée n'est pas un tampon de pH. Le pH est imposé par l'acide organique introduit dans la phase mobile (acide formique dans nos analyses), mais sa valeur n'a pas été ajustée pour que la solution soit au pKa de l'acide faible. Le terme solvant est employé en général par analogie aux publications en anglais (*solvent*).

# Liste des Figures et Tableaux

---

## Table des Figures

Figure 1: Observation des coupes histologiques après imprégnation argentiques (Alzheimer et al. 1906) Section du cerveau montrant les plaques amyloïdes (a et b) et les dégénérescences neurofibrillaires (c)....	27
Figure 2: Représentation schématique d'une coupe transversale de cerveau sain (à gauche) et l'atrophie massive d'un cerveau à un stade avancé d'Alzheimer (à droite). Source National Institute on Aging, National Institutes of Health .....	33
Figure 3 : Immuno-histochimie du peptide A $\beta$ coloration brune du peptide amyloïde responsable des plaques séniles .....	33
Figure 4 : Immuno-histochimie de la protéine Tau anormalement phosphorylée coloration brune représenté par les flèches. ....	34
Figure 5 : Métabolisme de la protéine APP après action des trois sécrétases (Zhang et al. 2009).....	35
Figure 6 : Séquence peptidique du peptide A $\beta$ 42, N- vers C-terminal. La partie rouge représente les acides aminés participants à la chélation d'ions métalliques. En gras les acides aminés du domaine transmembranaire et en bleu les acides aminés 41 et 42 du peptide A $\beta$ 1-42 (Clippindale et al. 2001). ....	38
Figure 7 : Microscopie à force atomique révélant les ADDL de 5nm de diamètre (Chromy et al. 2003) ...	39
Figure 8 : Représentation fibrillaire du peptide 1-42. Chaque couleur représente un peptide en interaction avec ses voisins immédiats. (Luhrs et al.2005) .....	40
Figure 9: Représentation schématique d'un spectromètre de masse avec chaque compartiment nécessaire à son fonctionnement. ....	50
Figure 10: Principe général de l'ionisation Electrospray (Vinh 1999).....	51
Figure 11: Principe général de l'ionisation MALDI.....	52
Figure 12 : Principe de l'extraction retardée dans l'analyseur temps de vol .....	54
Figure 13: Principe du temps vol avec l'extraction retardée et le réflectron .....	55
Figure 14: Principe de quadripôle avec le mouvement des ions au sein des quatre barres métalliques.....	56
Figure 15: La trappe ionique linéaire avec les trois sections représentées (à gauche) (Schwartz and Senko 2002), modèle d'éjection axiale et radiale des ions avec la présence des deux détecteurs (à droite) (Thermo Fisher Scientific) .....	57
Figure 16: Les différentes trajectoires d'un ion dans un champ électromagnétique, $v_r$ fréquence d'oscillation axiale, $v_m$ fréquence d'oscillation magnétron, $v_c$ fréquence d'oscillation cyclotron (Marshall et al. 1998) .....	59
Figure 17: Illustration de la force de Lorentz ( $F = qv \wedge B$ ). Différence de rotation en fonction de la charge positive ou négative de l'ion dans un champ magnétique B (Marshall et al. 1998).....	60
Figure 18: Trajectoires des ions au sein de l'analyseur cyclotron au moment de l'excitation. Le rayon de la trajectoire des ions augmente pour se rapprocher des électrodes de détection (Marshall et al. 1998) .....	61
Figure 19 : Géométrie de l'Orbitrap (Makarov et al. 2000) .....	62
Figure 20: Photo du nanospray en mode Jet (Nemes, P, I Marginean, and A Vertes, Spraying Mode Effect on Droplet Formation and Ion Chemistry in Electrosprays. Analytical Chemistry, 2007. 79(8): p. 3105-3116.).....	65
Figure 21: Schéma de principe du montage de LC MS monodimensionnelle (Annexe 3) .....	65
Figure 22: Schéma de principe du montage chromatographique bidimensionnel (Annexe 3).....	66

Figure 23: Schéma de couplage "off-line" illustrant l'ajout de liquide supplémentaire, et le mécanisme de dépôt.....	71
Figure 24: MALDI TOF/TOF (hors échelle). .....	74
Figure 25: Schéma de principe du spectromètre MALDI TOF/TOF utilisé dans cette étude.....	75
Figure 26: Comparaison des configurations avec impact laser non axial (à gauche) et axial (à droite) .....	75
Figure 27: Schéma de principe du sélecteur de précurseur (Time Ion Selector TIS) d'après (Medzihradzky, Anal chem 2000 72 :552). .....	76
Figure 28 : Représentation du système LTQ avec les 3 guides d'ions et la trappe ionique linéaire (Thermo Fisher Scientific) .....	78
Figure 29: Système hybride LIT-FTICR (Thermo Fisher Scientific) .....	79
Figure 30: Configuration commerciale du système LIT-Orbitrap avec une source électrospray (Thermo Fisher Scientific) .....	80
Figure 31 Configuration commerciale du système LIT-Orbitrap avec une source MALDI (Thermo Fisher Scientific) .....	80
Figure 32 : Nomenclature de la fragmentation peptidique en haute et basse énergie .....	83
Figure 33 : Stratégie expérimentale suivie pour les 6 campagnes.....	99
Figure 34 : Nombre de protéines identifiées en fonction de la durée de gradient d'acétonitrile utilisé. Le diagramme de Venn montre que 85% des protéines sont identifiées exclusivement en gradient long, 4% sont uniquement identifiées en gradient court. ....	102
Figure 35 : Ensemble des protéines identifiées en association avec A $\beta$ et $\beta$ -cristalline au cours de cette étude.....	104
Figure 36 : Représentation matricielle des protéines identifiées en associées à A $\beta$ et /ou à la $\beta$ -cristalline en fonction du nombre de rats dans lesquels elles sont identifiées.....	107
Figure 37 : Protéines identifiées après filtrage et présentes dans au moins 2 réplicatas sur 3.....	107
Figure 38 : Représentation subcellulaire des protéines identifiées dans la voie métabolique de la maladie d'Alzheimer.....	111
Figure 39 Système LC-MALDI utilisé au laboratoire comprenant la chaîne HPLC (modèle marque) et le système de collection de fraction Probot (marque).....	121
Figure 40 : Chromatogramme d'un échantillon standard de 20 fmol.....	123
Figure 41 Largeur de pic à mi hauteur pour la masse 1249,68 Da identifiée en LC-MALDI-TOF/TOF	123
Figure 42 Photo d'une plaque MALDI-TOF/TOF avec 12 runs LC déposés. ....	125
Figure 43 : Représentation des deux plans de plaque <i>utilisés au laboratoire</i> .....	125
Figure 44: Score Mascot des différentes protéines du mélange standard en fonction du nombre de précurseurs par spot.....	126
Figure 45: Nombre de peptides uniques identifiés pour chacune des protéines présentes dans le mélange standard LCP.....	128
Figure 46: Pourcentage de couverture de séquence pour chacune des protéines présentes dans le mélange standard LCP.....	128
Figure 47: Nombre de peptides uniques identifiés par Mascot pour les différentes concentrations du mélange standard LCP déposé sur la plaque MALDI .....	130
Figure 48: Variation de la précision de masse au cours du temps. ....	132
Figure 49 : Stratégie de l'analyse multiple. L'échantillon est séparé par LC et collecté sur une plaque MALDI. Puis il est analysé successivement quatre fois. Chaque analyse est traitée en parallèle en effectuant les recherches dans les banques avec Mascot pour identification des protéines.....	133
Figure 50 : Analyse des peptides identifiés après 4 passages successifs.....	134

Figure 51 : Comparaison entre le nombre de peptides identifiés pour le 1er passage (série 1) contre les 4 passages combinés (série 2).....	135
Figure 52 : Comparaison du spectre MS/MS du peptide DAFLGSFLYEYSR. (A) spectre du peptide dansylé avec augmentation des fragments B. (B) spectre du peptide non dansylé.....	138
Figure 53 : Bilan de l'identification des 79 protéines en utilisant la dansylation afin d'augmenter la couverture du protéome. ....	139
Figure 54: Spectre MALDI Orbitrap d'un échantillon de sérum albumine bovine pour une analyse en cartographie peptidique.....	140
Figure 55 : Peptide identifiés et erreur de masse pour chaque peptide.....	141
Figure 56 : Spectre MS de l'échantillon de colza pour la recherche de la cruciférine en cartographie peptidique.....	142
Figure 57 : Identification des différents peptides de la cruciférine avec l'erreur de masse associée à chaque peptide. ....	142
Figure 58 : Spectre MS et sélection du précurseur pour l'analyse MS/SMS.....	143
Figure 59 : Analyse MS/MS en Orbitrap de l'ion 2557 Da.....	143
Figure 60 : Résultats Mascot après analyses des MS et MS/MS en Orbitrap.....	144
Figure 61 : Identification peptidique en fonction du nombre de microscans utilisés pour la MS/MS à partir de 20fmol de LCP standard. ....	145
Figure 62 : Peptides identifiés sans seuil de validation par Mascot en fonction du nombre de microscans utilisé .....	146
Figure 63 : Analyse multiple d'un même échantillon et analyse du nombre de peptides identifiés après 4 passages successifs. ....	147
Figure 64 : Comparaison entre le premier passage et la combinaison des 4 passages en LC-MALDI-Orbitrap .....	148
Figure 65 : Variabilité du pourcentage de couverture inter échantillons.....	148
Figure 66 : Evaluation inter LC du nombre de MS/MS correspondante .....	149
Figure 67 : Comparaison du nombre de spectres MS/MS identifiés pour chacune des protéines en fonction du spectromètre utilisé.....	150
Figure 68 : Identification Mascot du premier candidat, la Sérotransferrine avec le nombre de peptides identifiés le score et la tolérance de masse.....	151
Figure 69: Comparaison des fragments obtenus en MS/MS pour chaque spectromètre de masse.....	152
Figure 70: Comparaison des scores de plusieurs peptides en fonction du nombre de fragments proposés à l'algorithme de recherche. Le diagramme est réalisé pour les peptides protéolytiques des différentes protéines du mélange standard.....	153
Figure 71: Protéines identifiées avec notre seuil de validation. En rouge le MALDI TOF/TOF et en bleu le MALDI-Orbitrap .....	154
Figure 72: Stratégie de l'étude comparative des échantillons et analyse en ESI ou en MALDI.....	156
Figure 73 : Répartition des peptides standards identifiés lors d'une analyse en triplicata selon le spectromètre de masse utilisé (MALDI= MALDI-TOF/TOF, ESI = ESI-LIT-FITICR) .....	157
Figure 74 : Comparaison des séquences peptidiques ESI et MALDI pour les quatre spectromètres de masse. ....	158
Figure 75 : Nombre de protéines identifiées pour chaque ionisation utilisée dans le cas de l'analyse d'un mélange de protéine soluble <i>E. Coli</i> . ....	159
Figure 76 : Nombre de peptides identifiés pour chaque mode d'ionisation utilisée dans le cas de l'analyse d'un mélange de protéine soluble <i>E. Coli</i> . ....	160

Figure 77 : Comparaison des couvertures de séquence protéique en fonction du mode d'ionisation illustrant la reproductibilité des résultats .....	161
Figure 78 : Comparaison des couvertures de séquence protéique (enolase) en fonction du mode d'ionisation illustrant la reproductibilité des résultats. ....	161
Figure 79 : Comparaison des couvertures de séquence protéique (50S ribosomal protein L2) en fonction du mode d'ionisation illustrant la reproductibilité des résultats. ....	162
Figure 80 : Comparaison des couvertures de séquence protéique (50S ribosomal protein L2) en fonction du mode d'ionisation illustrant la reproductibilité des résultats. ....	163
Figure 81 Identification du nombre de protéines des polygones de cerveau de souris après analyse LC-MALDI-TOF.TOF <i>vs.</i> LC-ESI-LIT-FTICR .....	164
Figure 82 Identification du nombre de peptides des polygones de cerveau de souris après analyse LC-MALDI-TOF.TOF <i>vs.</i> LC-ESI-LIT-FTICR .....	164
Figure 83 : Comparaison des couvertures de séquence protéique (Collagène-alpha-2 VI) en fonction du mode d'ionisation illustrant la reproductibilité des résultats.....	165
Figure 84 : Comparaison des couvertures de séquence protéique (Collagène-alpha-1 VI) en fonction du mode d'ionisation illustrant la reproductibilité des résultats.....	166
Figure 85 : Distribution des protéines identifiées en 2DLC MS/MS (MALDI = MALDI-TOF/TOF, ESI = ESI-LIT-FTICR).....	168
Figure 86: Distribution des peptides identifiés en 2DLC MS/MS (MALDI = MALDI-TOF/TOF, ESI = ESI-LIT-FTICR) .....	168
Figure 87: Distribution du nombre de peptides identifiés en fonction de la longueur de séquence de chaque peptide selon le mode d'ionisation. (Peptides issus du mélange <i>E.coli</i> en LC1D, MALDI = MALDI-TOF/TOF, ESI = ESI-LIT-FTICR) .....	169
Figure 88 : Distribution du nombre de peptides identifiés en fonction de la longueur de séquence de chaque peptide selon le mode d'ionisation. (Peptides issus du mélange de <i>Stratum corneum</i> en LC2D, MALDI = MALDI-TOF/TOF, ESI = ESI-LIT-FTICR) .....	169
Figure 89 Pourcentage de peptides possédant une lysine ou d'arginine en position C-terminale en fonction du type d'ionisation (Combinaison de l'ensemble des peptides présentés lors des analyses précédentes <i>E.coli</i> , <i>Stratum corneum</i> et souris) .....	170
Figure 90 : Pourcentage de peptides ESI et MALDI en fonction du point isoélectrique calculé de l'ensemble des échantillons analysés. ....	171
Figure 91:Pourcentage de peptides ESI et MALDI en fonction de la masse des peptides en Da.....	172
Figure 92:Pourcentage de peptides ESI et MALDI en fonction du nombre d'éléments basique des peptides.(Etude des peptides d' <i>E.coli</i> ) .....	173
Figure 93:Pourcentage de peptides ESI et MALDI en fonction de la charge nette positive. ....	173
Figure 94:Pourcentage de peptides ESI et MALDI en fonction de la charge nette négative.....	174
Figure 95:Pourcentage de peptides ESI et MALDI en fonction de l'accessibilité aux solvants > 30Å.....	174

## Table des Tableaux

Tableau 1 : Prévalence de la MA en France en fonction de l'âge et du sexe (étude PAQUID Personnes âgées Quid, Ramaroson et al. 2003).....	28
Tableau 2 : Tableau de tolérance de masse pour les différents spectromètres de masse utilisés au laboratoire .....	95
Tableau 3 : Liste des 40 protéines identifiées uniquement en présence d'A $\beta$ d'après (Verdier et al. 2005) .....	105
Tableau 4: Pathologies ou métabolismes identifiées avec l'ensemble des protéines identifiées .....	109
Tableau 5 Protéines présentes dans la voie métabolique de la maladie d'Alzheimer (KEGG Pathway). Les croix représentent le type d'échantillon dans lequel la protéine est identifiée dans notre étude.....	110
Tableau 6 : Métabolisme ou pathologie présenté en fonction des protéines soumises à DAVID.....	112
Tableau 7 Protéines identifiées en présence d'amyloïde $\beta$ et présentes dans la voie métabolique de la maladie d'Alzheimer d'après le KEGG Pathway intégré à DAVID. ....	112
Tableau 8 : Protéines mitochondriales identifiées exclusivement en présence du peptide amyloïde. ....	113
Tableau 9: Différentes protéines de la phosphorylation oxydative et partenaires du peptide amyloïde ...	116
Tableau 10: Protéines des complexes d'importation des protéines mitochondriales .....	116
Tableau 11: Protéines de fusion mitochondriale .....	116
Tableau 12 Protéines dégradant la valine, la leucine et l'isoleucine .....	117
Tableau 13 : Protéines liant le calcium .....	118
Tableau 14 : Protéines du métabolisme médicamenteux .....	118
Tableau 15 Autres protéines mitochondriales également identifiées en présence d'A $\beta$ .....	118
Tableau 16 : Protéine du réticulum endoplasmique identifiée en présence d'amyloïde.....	118
Tableau 17 : Protéines du cytoplasme identifiées en présence d'amyloïde.....	119
Tableau 18 : Protéines de la membrane plasmique identifiée en présence d'amyloïde.....	119
Tableau 19:: Les différentes conditions de collecte et de préparation des dépôts MALDI .....	123
Tableau 20: Caractéristiques du plan de plaque comprenant 480 spots.....	124
Tableau 21: Caractéristiques du plan de plaque comprenant 2880 spots.....	124
Tableau 22: Nombre de MS/MS réalisée pour chacune des concentrations de LCP déposées sur la plaque MALDI.....	129
Tableau 23: Nombre de protéines identifiées après validation pour chacune des quantités déposées.....	131
Tableau 24 : Comparaison des identifications peptidiques de la BSA contrôle et BSA dansylée en MS/MS. Les peptides sans score représentent les peptides fragmentés manuellement. ....	136
Tableau 25: Peptides identifiés selon le spectromètre et le type d'ionisation à partir de 20 fmol du mélange des 6 protéines standard. ....	157
Tableau 26: Séquence en acides aminés de chaque peptide identifié de façon reproductible selon le mode d'ionisation (enolase).....	162
Tableau 27: Séquence en acides aminés de chaque peptide identifié de façon reproductible selon le mode d'ionisation (protéine ribosomale 50S L2).....	162
Tableau 28: Séquence en acides aminés de chaque peptide identifié de façon reproductible selon le mode d'ionisation (protéine chaperone dnaK).....	163
Tableau 29: Séquence en acides aminés de chaque peptide identifié de façon reproductible selon le mode d'ionisation (Collagène-alpha-2 VI) .....	165

Tableau 30: Séquence en acides aminés de chaque peptide identifié de façon reproductible selon le mode d'ionisation (Collagène-alpha-2 VI) .....166

# I Introduction générale

---

Le cerveau est l'organe le plus complexe, son étude a toujours été délicate. Plusieurs pathologies altèrent l'intégrité de cet organe essentiel. Parmi ces pathologies on retrouve les pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (MA). Cette maladie touchant un nombre croissant de personnes est devenue en quelques années un problème de santé publique majeur.

La compréhension des processus moléculaires de cette maladie est une nécessité pour vaincre la maladie. Ces différents processus mettent en jeu des variations chimiques, biochimiques et physiologiques.

L'utilisation d'outils interdisciplinaires est devenue indispensable pour réaliser l'étude des biomolécules responsables de la maladie d'Alzheimer. La protéomique est un domaine faisant intervenir différentes disciplines complémentaires de chimie, biochimie et de physique, ce qui en fait une technique de choix pour la caractérisation et la quantification des protéines.

Afin de comprendre les mécanismes de la maladie d'Alzheimer nous avons décidé de concentrer nos efforts sur le peptide amyloïde bêta ( $A\beta$ ). Une des caractéristiques principales de la MA est l'accumulation du peptide  $A\beta$  autour des neurones formant des plaques séniles. Cette accumulation de ce peptide endommage de manière irréversible les neurones.

Le peptide  $A\beta$  provient de la protéolyse de l'APP (Amyloid Protein Precursor) qui est clivée par une enzyme (la  $\beta$ -sécrétase) du côté N-terminal suivi de l'action d'une autre protéase (la  $\gamma$ -sécrétase). L'action de cette dernière engendre deux formes d' $A\beta$  l'une physiologique de 40 acides aminés ( $A\beta$  1-40) et une autre toxique de 42 acides aminés ( $A\beta$  1-42). Dans notre étude nous nous sommes intéressés à cette forme toxique.

Les propriétés physico-chimiques du peptide  $A\beta$  1-42 ainsi que sa structure entraînent la liaison de celle-ci avec de nombreuses molécules telles que lipides et protéines. La conversion de ce peptide sous une forme fibrillaire permet d'augmenter cette capacité de liaison. Plusieurs études préliminaires ont été réalisées avec des protéines déjà impliquées dans la MA. Cependant l'étude de protéines non impliquées directement dans la maladie a trop souvent été négligée.

Afin de comprendre les mécanismes d'action du peptide amyloïde 1-42 nous avons mis en place une collaboration avec le laboratoire de chimie médicale de Szeged (Hongrie) avec pour objectif de développer une nouvelle approche permettant l'identification des différents partenaires de l'A $\beta$  par spectrométrie de masse. L'utilisation de la LIT-FT MS semble être le choix idéal en termes d'exactitude de masse (<2ppm), de sensibilité, de résolution (>100000) et de gamme dynamique. L'utilisation de la chromatographie liquide bidimensionnelle à haute performance (LC-2D) en amont du spectromètre de masse permet le balayage d'un éventail de protéines plus large. L'utilisation combinée de ces deux outils nous permet de réaliser une identification protéique beaucoup plus fine.

### **Travail réalisé dans cette thèse**

Cette thèse rentre dans le cadre de l'analyse protéomique avec les différentes étapes qu'elle implique. Afin d'identifier de nouveaux partenaires de l'A $\beta$  1-42, nous avons mis en place une technique de co-précipitation entre les protéines synaptosomales et les fibrilles d'A $\beta$  1-42. L'utilisation de synaptosomes permet l'identification d'interactions biologiquement significatives. Le peptide A $\beta$  1-42 a été décrit comme une protéine synaptotoxique (Selkoe et al. 2002). L'utilisation du rat comme modèle biologique rend possible la validation de notre travail avec les résultats des travaux précédents (Verdier *et al*, 2005). L'analyse de co-précipitation permet d'isoler les protéines directement liées à l'A $\beta$  ainsi que l'isolement des protéines liées de façon indirecte. A l'issue de cette identification un réseau de protéines pourra être reconstitué afin de comprendre quelles sont les différentes interactions caractéristiques de l'A $\beta$ .

La deuxième partie de notre travail consiste au développement méthodologique capable d'augmenter la couverture du protéome. En effet une identification plus poussée du protéome est une étape nécessaire pour parvenir à l'identification de certaines modifications post-traductionnelles ou de séquences peptidiques d'intérêt jouant un rôle dans les différents processus biologiques.

Les travaux d'A.M Hesse (Hesse 2009) ont montré l'intérêt de la multiplication des approches chromatographiques pour augmenter sensiblement le nombre de peptides et protéines identifiés. Dans cette même logique nous avons développé le couplage LC-MALDI afin d'obtenir au laboratoire une stratégie d'analyse différente et complémentaire du couplage classique LC-ESI. Le développement de cette méthode sur des appareils tels que le MALDI-TOF/TOF et le MALDI-Orbitrap nous a permis de réaliser une comparaison directe des deux méthodes afin d'identifier une probable complémentarité des deux approches ainsi que la détermination des éléments physico-chimiques jouant un rôle dans l'ionisation des peptides.

# II Introduction

---

## II.1 La maladie d'Alzheimer (MA)

### II.1.1 Un peu d'histoire

Pendant très longtemps la perte de mémoire et la perte de facultés cognitives étaient considérées comme normales et liées à l'âge. Cependant, en 1901, le psychiatre Aloïs Alzheimer suit une patiente âgée de 51 ans (Auguste D.) présentant de nombreux troubles mentaux et comportementaux tels que des difficultés de mémoire, des troubles de l'orientation, des hallucinations et des difficultés de compréhension. Pour illustrer ces difficultés Aloïs Alzheimer rapporte l'entretien suivant :

*Extrait du 26 Novembre 1901*

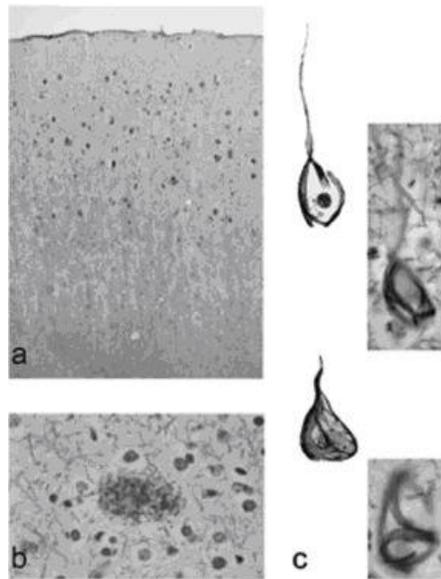
*« Elle s'assoit sur son lit, l'air hébété. Quel est votre nom? Auguste. Votre nom de famille? Auguste. Quel est le nom de votre mari? Auguste, je crois. Votre mari? Ah, mon mari. Elle semble ne pas comprendre la question. Êtes-vous mariée? A Auguste. Madame D.? Oui, Oui, Auguste D. Quand on lui demande d'écrire, elle tient le livre de telle façon qu'on a l'impression qu'elle a perdu une partie du champ visuel droit. Désordre de l'écriture d'origine amnésique. Dans la soirée, son discours spontané est plein de détails paraphrastiques et de persévérations »*

*A midi, on servit à Auguste D. du chou-fleur et de la viande de porc.*

*« Qu'est-ce que vous êtes en train de manger ? Des épinards. (Elle mastique sa viande). Et à présent, qu'est-ce que vous mangez ? J'ai d'abord mangé des pommes de terre et puis du raifort. Le docteur Alzheimer lui désigne divers objets. Très vite, elle ne sait plus ce qu'on vient de lui montrer et ne cesse de parler de jumeaux ». (Konrad et al. 1997)*

Suite au décès de Mme Auguste D. le 8 Avril 1906 d'une septicémie, Aloïs Alzheimer réalisa une étude histologique du cerveau de son ancienne patiente. Il observa de nombreuses lésions cérébrales formées par des plaques séniles semblables à celles retrouvées généralement chez les personnes âgées, mais également des lésions inconnues caractérisées par de nombreux amas de fibrilles dans les neurones (Figure 1).

Il présenta ses observations le 3 Novembre 1906 à Tübingen lors de la 37<sup>ème</sup> rencontre de la psychiatrie Allemande.



**Fig.1** Tissue sections from Auguste D.'s brain show amyloid plaques (a, b) and neurofibrillary tangles (c) in the cerebral cortex (Bielschowsky silver impregnation). The drawings depicted in c were taken from Alzheimer's own work (1911). Primary magnification:  $\times 5$  (a),  $\times 100$  (b, c)

Figure 1: Observation des coupes histologiques après imprégnation argentiques (Alzheimer et al. 1906) Section du cerveau montrant les plaques amyloïdes (a et b) et les dégénérescences neurofibrillaires (c)

Suite à des observations similaires chez différents patients, décrites par Alzheimer et d'autres psychiatres (Fischer et al.1907 ; Bonfiglio et al. 1908 ; Alzheimer et al. 1911) Emil Kraepelin lui-même psychiatre décida de l'éponyme « maladie d'Alzheimer. »

### II.1.2 Aujourd'hui

La MA affecte un octogénaire sur cinq. En France 860 000 personnes sont touchées, ce chiffre pourrait d'ailleurs doubler et atteindre les deux millions de personnes d'ici 2040 (Ramaroson et al. 2003), ce qui en fait la première cause de troubles démentiels en France. Entre 65 et 74 ans, la MA est responsable de 36% des causes de démences, 64% entre 75 et 84 ans et 96% pour les personnes âgées de plus de 85 ans.

La MA constitue un problème de santé publique majeur : avec l'augmentation de l'espérance de vie et le vieillissement de la population, près de 25 millions de personnes sont touchées actuellement dans le monde (Gallez, 2005).

## II.2 Les différents facteurs de risques de la MA

La forme sporadique sans antécédents familiaux représente plus de 95% des cas de la MA (Rocchi et al. 2003). Comme de nombreuses maladies, certains facteurs jouent un rôle dans la survenue de la MA. Ces risques peuvent être classés en différents groupes :

- Les facteurs environnementaux
- Les facteurs vasculaires

- Les facteurs nutritionnels
- Les facteurs génétiques

## II.2.1 Les facteurs environnementaux

### II.2.1.1 L'âge

L'âge représente le facteur de risque majeur de la MA (Tableau 1), la majorité des cas après 65 ans présente une prévalence de 6.4% en Europe (Lobo et al. 2000). Toutes les études ont montré une augmentation de la probabilité de développer la maladie avec l'âge. (Evans et al. 1989)

Tableau 1 : Prévalence de la MA en France en fonction de l'âge et du sexe (étude PAQUID Personnes âgées Quid, Ramarosan et al. 2003)

%	Hommes		Femmes		Ensemble	
	Démence	Alzheimer	Démence	Alzheimer	Démence	Alzheimer
75-79	7,7	4,6	5,7	3,7	6,5	4,1
80-84	12,5	9,6	16,6	15,3	15,1	13,2
85-89	22,9	15,2	29,9	23,8	27,6	21,0
90 et plus	27,0	21,6	52,8	46,5	47,0	40,9

Cette étude montre l'importance de l'âge et son implication dans la démence et plus précisément de la MA, qui représente plus de la moitié des cas de démence passé 75 ans.

### II.2.1.2 Le sexe

Selon le PAQUID (Personnes Âgées Quid) la prévalence de la MA est plus importante chez les femmes. Cette tendance semble être bien établie puisque d'autres études l'ont démontré dans des populations rurales chinoises (Letenneur et al. 1999 ; Zhou et al. 2006). Une étude réalisée sur des femmes ménopausées montre que les concentrations en œstrogènes étaient associées au déclin cognitif (Fillit et al. 2002). Cette étude pourrait être une piste pour expliquer cette tendance.

### II.2.1.3 Le niveau d'éducation

Le niveau d'éducation et la stimulation intellectuelle tout au long de la vie semblent jouer un rôle important. Les personnes n'ayant pas suivi de longues études ont plus de risques d'être affectées par la MA (Sulkava et al. 1985 ; Sharp et al. 2011).

### II.2.1.4 Les traumatismes crâniens

Les chocs importants à la tête durant la jeunesse contribueraient à augmenter le risque de développer la MA. Des études réalisées chez des boxeurs professionnels américains ont montré des changements moléculaires similaires à la MA, dont une accumulation de la protéine Tau (Meheroz et al. 2001, Slemmer

et al. 2002). D'autres études ont également montré le lien de cause à effets d'un ou plusieurs traumatismes (Szczygielski et al. 2005).

#### **II.2.1.5 Exposition professionnelle**

Différents domaines d'activité professionnelle entraînent une exposition plus ou moins forte à de nombreux agents chimiques ou physiques tels que les ondes magnétiques, les pesticides, les métaux lourds et les solvants. Ainsi plusieurs études ont mis en évidence que l'exposition aux pesticides augmente le risque de développer la MA (Hayden et al. 2010 ; Jones et al. 2010). L'influence des ondes électromagnétiques est encore débattue malgré les récentes études suggérant un rôle protecteur des ondes électromagnétiques contre le déclin cognitif (Arendash et al. 2010).

#### **II.2.1.6 L'alcool et le tabac**

Le rôle nocif de l'alcool et du tabac dans la MA a donné lieu à de nombreuses études (Juan et al. 2004 ; Garcia et al. 2010 ; Graves et al. 1991 ; Letenneur et al. 2004). Deux études récentes ont montré des rôles protecteurs et bénéfiques. La première étude réalisée en Allemagne en 2011 vient de montrer qu'une consommation modérée d'alcool réduirait de près de 40 % le risque de contracter la MA (Weyerer et al. 2011). La deuxième étude traite de la cotinine qui n'est autre que de la nicotine transformée par l'organisme. Sa présence inhiberait l'agrégation de l'amyloïde-bêta ( $A\beta$ ) qui est en partie responsable de la MA (nous reviendrons sur son rôle dans les prochains chapitres) et possède un effet protecteur de la mémoire chez la souris (Echeverria et al. 2011).

### **II.2.2 Les facteurs vasculaires**

#### **II.2.2.1 L'hypertension**

L'hypertension est un facteur de risque de la MA. Une pression artérielle diastolique élevée augmente la dégénérescence neurofibrillaire au niveau de l'hippocampe qui est une des premières structures atteintes dans la MA (Petrovich et al. 2000 ; Kivipelto et al. 2001). Plusieurs études ont montré des liens de cause à effet entre l'hypertension et la survenue de démences. Les études de Launer et Guo ont montré que les patients hypertendus traités contre l'hypertension présentaient moins de risques de démence que les patients hypertendus non traités. (Guo et al 1999 ; Launer et al. 2000). En revanche un bas niveau de pression artérielle serait même prédicteur de démence après 80 ans (Qiu et al. 2003; Verghese et al. 2003).

#### **II.2.2.2 Le cholestérol**

Le cholestérol qui est un élément important du cerveau est également décrit comme étant un facteur de risque de la MA (Kivipelto et al. 2001 ; Sambamurti et al. 2004). En effet des études ont montré chez la souris une augmentation d' $A\beta$  dans le cerveau à la suite de l'administration d'un régime riche en cholestérol, ce qui entraîne une formation des plaques amyloïdes beaucoup plus rapide que chez des souris

présentant un taux plus faible de cholestérol. (Refolo et al. 2000 ; Anstey et al. 2008). Cependant les patients traités contre l'hypercholestérolémie semblent avoir moins de risques de démence que les patients non traités.

### **II.2.2.3 Le diabète**

L'insuline tient un rôle très important dans le cerveau, son niveau affecte le système de la dopamine qui est un neurotransmetteur essentiel à de nombreuses fonctions dont la mémoire et la concentration (Watson et al. 2003). Malgré ce rôle, le lien entre l'insuline et la MA n'a été évoqué qu'en 2001 (Boyle et al. 2001). Depuis plusieurs études ont montré une corrélation entre le diabète et la MA plus précisément entre le diabète de type 2 (diabète non insulino-dépendant) et la MA (Luchsinger et al. 2010).

## **II.2.3 Les facteurs nutritionnels**

### **II.2.3.1 L'alimentation**

Les apports en nutriments sont des éléments déterminants pour l'organisme et pour son bon fonctionnement. Il a été montré que des faibles concentrations en Oméga3, ainsi que des carences en vitamine D constituent un facteur de risque (Taghizadeh et al. 2011). L'Oméga 3 est connue pour diminuer le taux de cholestérol lui-même facteur de risque de la MA. La vitamine D apparaît comme un neuroprotecteur et semble réguler l'inflammation dans le cerveau (Lehmann et al. 2011).

### **II.2.3.2 L'obésité**

L'obésité est également citée comme étant un facteur pouvant augmenter le risque de contracter la MA (Gustafson et al. 2003). L'hypothèse d'une source de cytokine et d'interleukines issues du tissu adipeux qui soient responsables d'inflammation et de déclin cognitif a été évoquée. (Gunstad et al. 2006).

## **II.2.4 Facteurs génétiques**

D'un point de vue génétique, la MA peut se traduire sous deux formes : la forme sporadique et la forme familiale. L'étude génétique de la MA a permis d'identifier quatre gènes responsables de la maladie. Sur ces quatre gènes, trois d'entre eux sont situés sur les chromosomes 1, 14 et 21 et sont responsables des formes à caractère héréditaire de la MA, le dernier situé sur le chromosome 19 est impliqué dans la forme sporadique de la maladie.

### **II.2.4.1 Les facteurs génétiques des formes familiales de la MA**

Plusieurs études génétiques ont montré que trois gènes étaient responsables de la majorité des cas de la MA précoce (survenant avant l'âge de 65 ans). Des mutations génétiques au sein de ces trois gènes entraînent un caractère précoce et inévitable de la MA. Ces trois gènes sont les suivants :

#### **II.2.4.1.1 Le gène de l'APP (Protéine Précurseur de l'Amyloïde)**

Ce gène code pour une protéine transmembranaire composé de 695 à 770 acides aminés qui est le précurseur de l'A $\beta$ . Brièvement cette protéine clivée par deux protéases nommées PS1 et PS2 entraîne la libération du peptide amyloïde bêta (A $\beta$ ) associé à la MA.

Plusieurs mutations génétiques ont été retrouvées sur ce gène situé sur le chromosome 21 (Kang et al. 1987 ; Tanzi et al. 1987), en particulier :

- sur le codon 717 (Mutation London) qui se situe en aval de la partie codant pour le peptide A $\beta$
- sur les codons 670 et 671 (mutation suédoise) situés en amont de la partie codant pour l'A $\beta$ ,
- sur les codons 716 (mutation Florida) et 715 (mutation Rouen) qui entraînent une modification du site de clivage de la  $\gamma$ -sécrétase (Hardy et al. 1997), comme cela sera décrit au paragraphe II.4.2 p.35

Ces différentes mutations entraînent une surexpression du peptide A $\beta$  1-42, conduisant à une agrégation plus importante autour des neurones. De nouvelles mutations ont récemment été découvertes et un lien direct a été établi dans le développement précoce de la MA comme par exemple la mutation A673V (Di Fédé et al. 2009) et E682K (Zhou et al. 2011)

#### **II.2.4.1.2 Les gènes préséniline 1 (PS1) et préséniline 2 (PS2)**

Les gènes *PS1* et *PS2* codent pour une protéine transmembranaire issue du complexe protéique nommé la  $\gamma$ -sécrétase. Cette protéine est impliquée dans le clivage de l'APP.

Le gène *PS1* situé sur le chromosome 14 est un gène possédant des mutations qui entraînent une forme très précoce de la MA, touchant des patients d'une trentaine d'années. A l'heure actuelle sont dénombrées près de 130 mutations sur ce gène (Duering et al. 2005) La plupart de ces mutations sont décrites comme étant des substitutions simples d'acides aminés (Campion et al. 1995).

Malgré une homologie d'environ 60% avec le gène *PS1*, le gène *PS2* situé sur le chromosome 1 est moins impliqué dans le développement de la MA, notamment parce que le nombre de mutations identifiées sur ce gène (9 au total) est faible (Sherrington et al. 1995). L'ensemble des mutations retrouvées sur ces gènes perturbe l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase en favorisant le clivage de l'APP au niveau du codon 713. Ce clivage entraîne la formation majoritaire du peptide A $\beta$  1-42 (Scheuner et al. 1996).

## II.2.4.2 Les facteurs génétiques des formes sporadiques de la MA

### II.2.4.2.1 Le gène *ApoE*

A l'heure actuelle le principal facteur de risque génétique associé aux formes sporadiques de la MA est le gène codant pour l'apolipoprotéine E (ApoE), retrouvé sur le chromosome 19.

L'ApoE joue un rôle fondamental dans l'activité cérébrale, en effet il tient le rôle de transporteur et de distributeur des lipides et du cholestérol. L'ApoE intervient également dans la croissance neuritique.

Parmi les trois allèles décrits du gène de l'ApoE ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ) l'allèle  $\epsilon 4$  est celui présentant une implication directe dans la MA. Une étude de 1993 montrait une forte expression de l'allèle  $\epsilon 4$  chez les patients atteints des formes tardives de la maladie (Strittmatter et al. 1993). A la suite de cette étude d'autres recherches sur cet allèle ont été réalisées et ont confirmé ce résultat. L'étude de 1997 (Farrer et al. 1997) présente notamment un lien direct entre le nombre de copies de l'allèle  $\epsilon 4$  et le risque de développer la maladie : il a été démontré que l'allèle  $\epsilon 2$ , contrairement à l'allèle  $\epsilon 4$  possédait un rôle protecteur et se retrouve présent en grande quantité chez les centenaires (Blanche et al. 2001).

Nous venons de présenter les différents facteurs de risque directs et indirects pouvant être impliqués dans le cadre de la MA. Nous allons présenter dans une deuxième partie les lésions présentes d'un point de vue macroscopique et microscopique.

## II.3 Description macroscopique et microscopique des lésions dues à la MA

Les différentes avancées d'imagerie médicale ainsi que les dosages de biomarqueurs permettent de réaliser un pré-diagnostic de la MA. Cependant, le seul diagnostic permettant d'identifier la MA de façon fiable reste le diagnostic post-mortem avec un examen neuropathologique.

L'étude cérébrale de sujets atteints de la MA présente des caractéristiques communes et rapidement identifiables.

### II.3.1 Lésions macroscopiques

Le cerveau de patients atteints de la MA présente principalement une atrophie cérébrale beaucoup plus importante que celui de personnes du même âge non atteintes de la MA. Différentes zones se retrouvent particulièrement touchées comme l'hippocampe, le lobe temporal et l'amygdale temporale (Duyckaerts et al. 1985). On remarque également une dilatation des ventricules et une atrophie des noyaux amygdaliens, à tout ceci s'ajoute une diminution importante du poids pouvant aller jusqu'à 50% (Figure 2).

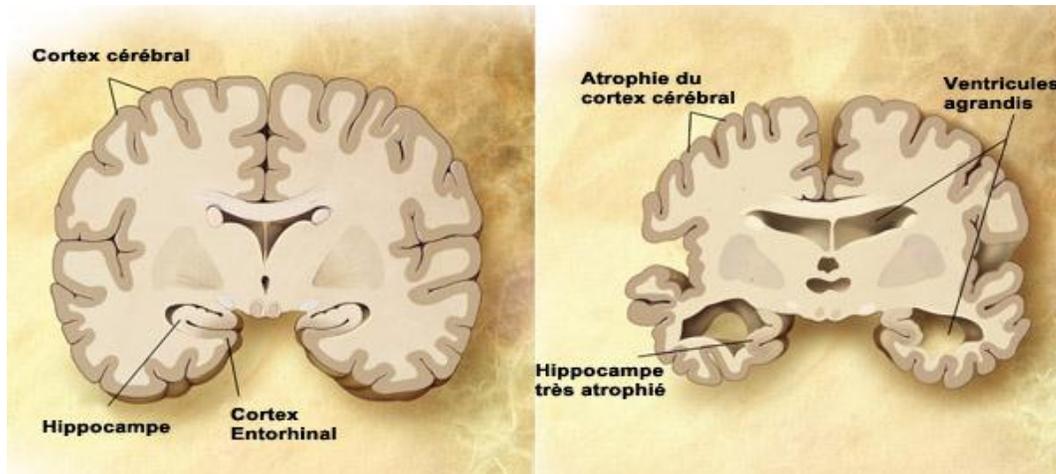


Figure 2: Représentation schématique d'une coupe transversale de cerveau sain (à gauche) et d'atrophie massive d'un cerveau à un stade avancé d'Alzheimer (à droite). Source National Institute on Aging, National Institutes of Health

### II.3.2 Lésions microscopiques

Aux différentes lésions macroscopiques s'ajoutent des lésions microscopiques caractéristiques de la MA. Deux types de lésions ont été décrites par Aloïs Alzheimer, la dégénérescence neurofibrillaire et la présence de plaques séniles extracellulaires. Chaque phénomène à lui seul n'est pas spécifique de la MA, mais il s'agit de l'association de ces deux phénomènes qui caractérise la MA. Les plaques séniles (Figure 3) sont la résultante de l'accumulation massive de protéines dégradées ou dénaturées composées essentiellement de peptide A $\beta$  (Masters et al.1985), la localisation de ces plaques semble être relativement diffuse, elles sont retrouvées dans le cortex cérébral.

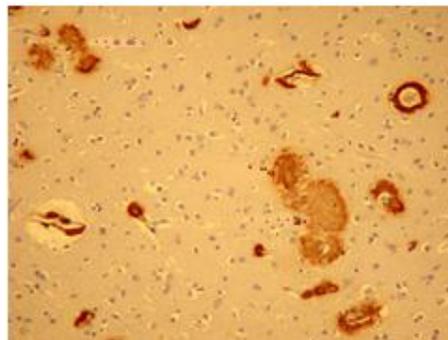


Figure 3 : Immuno-histochimie du peptide A $\beta$  coloration brune du peptide amyloïde responsable des plaques séniles  
 Les dégénérescences neurofibrillaires (Figure 4) sont dues à une accumulation intra neuronale de fibrilles formées par des paires de filaments appariés en hélices. Ces filaments sont principalement constitués de protéines Tau (Brion et al. 1985).

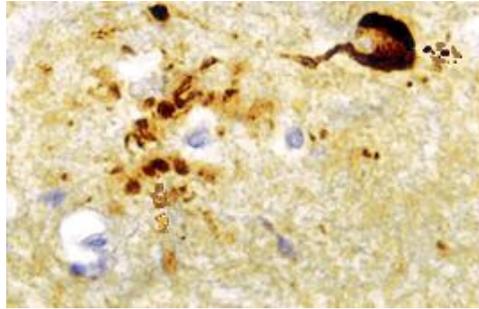


Figure 4 : Immuno-histochimie de la protéine Tau anormalement phosphorylée coloration brune représenté par les flèches.

Nous venons de décrire les caractéristiques macroscopiques et microscopiques de la MA. Intéressons nous maintenant à ses caractéristiques moléculaires.

## II.4 Mécanismes moléculaires de la MA

Les études génétiques précédemment citées ainsi que les différentes observations de la composition des plaques séniles, composées majoritairement du peptide  $A\beta$ , ont orienté les recherches vers celui-ci mais également vers son précurseur, la protéine APP.

### II.4.1 La protéine précurseur du peptide amyloïde APP

L'APP (numéro d'accèsion P05067) est une glycoprotéine transmembranaire de type I codée par le gène APP localisé sur le chromosome 21, les différents ARNm issus de l'épissage alternatif du gène APP fournissent différentes isoformes de 365 à 770 acides aminés. Parmi ces différentes isoformes, trois sont majoritairement retrouvées dans le cerveau, les formes 770, 751 et 695 (Golde et al.1990). La forme de 695 acides aminés qui est la plus courte des trois isoformes reste la forme majoritaire produite. Cette protéine bien que retrouvée majoritairement dans le tissu nerveux, est également retrouvée dans divers tissus ou fluides tels que la peau, les muscles et le système sanguin.

Bien que son rôle ne soit pas clairement défini, plusieurs études ont montré que l'APP est impliquée dans différents processus cellulaires tels que :

- La synaptogénèse et la plasticité synaptique (Gralle and Ferreira 2007)
- La signalisation cellulaire (Nishimoto et al. 1993)
- La différenciation des cellules souches neuronales (Kwak et al. 2006)
- L'homéostasie de métaux tels que le cuivre et le zinc (Hesse et al. 1994)

## II.4.2 Protéolyse de l'APP

L'APP est métabolisée via deux voies biologiques

- la voie non amyloïdogénique qui n'est pas responsable de la production de peptide amyloïde
- la voie amyloïdogénique responsable de la production du peptide amyloïde (Figure 5).

Chacune des voies met en jeu des enzymes ayant un rôle particulier.

- L' $\alpha$ -sécrétase
- La  $\beta$ -sécrétase
- La  $\gamma$ -sécrétase

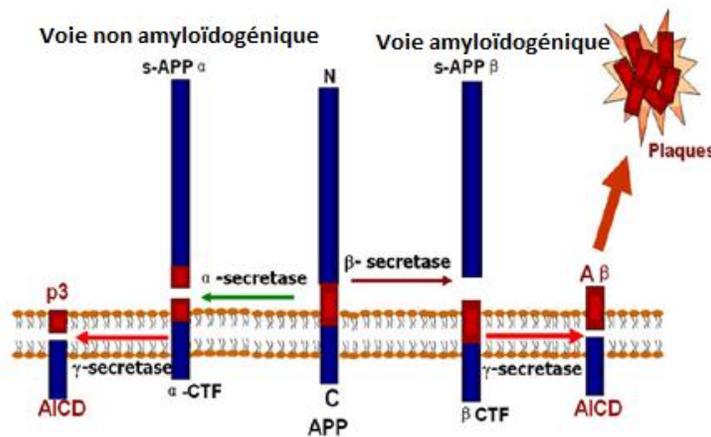


Figure 5 : Métabolisme de la protéine APP après action des trois sécrétases (Zhang et al. 2009)

### II.4.2.1 L' $\alpha$ -sécrétase

Trois enzymes présentant une activité «  $\alpha$ -sécrétase » ont été identifiées, ADAM17, ADAM10 et ADAM9 (ADAM : Métalloprotéase avec domaine désintégrine). Ces enzymes appartiennent à la famille des métalloprotéinases et interviennent dans la voie non-amyloïdogénique de l'APP. Le clivage de l'APP par cette enzyme est réalisé en position 687 pour l'isoforme 770, en position 668 pour l'isoforme 751 et en position 612 pour l'isoforme 695, entre la lysine 16 et la leucine 17 du peptide amyloïde A $\beta$ , empêchant sa formation (De Strooper et al. 2000). Cette protéolyse réalisée au niveau de la membrane plasmique (Kojiro et al. 2001) donne naissance au fragment N-terminal soluble appelé sAPP $\alpha$  (soluble APP $\alpha$ ) et un fragment transmembranaire C-terminal de 83 acides aminés appelé C83 ou CTF $\alpha$ . Le fragment soluble sAPP $\alpha$  présente une activité neuroprotectrice (Stein et al, 2004). *In vivo* sAPP $\alpha$  permet une augmentation de la mémoire à court terme par l'augmentation de la plasticité synaptique. (Meziane et al. 1998)

### II.4.2.2 La $\beta$ -sécrétase

La protéolyse par la  $\beta$ -sécrétase correspond à la première étape de la voie amyloïdogénique.

La  $\beta$ -sécrétase entraîne une protéolyse de l'APP en position 671 pour l'isoforme 770, en position 652 pour l'isoforme 751 et en position 596 pour l'isoforme 695, entre une méthionine et un acide aspartique. Cette protéolyse n'altère pas le peptide amyloïde  $A\beta$  et entraîne la libération d'un fragment soluble nommé sAPP $\beta$  et un fragment C-terminal transmembranaire de 99 acides aminés appelé C99 ou CTF $\beta$ . Le nom de cette enzyme BACE1 (Beta-site APP Cleaving Enzyme 1) faisant référence au gène cloné et identifié par cinq laboratoires a été retenu. (Hussain et al. 1999 ; Sinha et Lieberburg, 1999 ; Yan et al. 1999 ; Lin et al. 2000 ; Vassar et al. 1999). Son implication dans la formation des plaques a été révélée dans une récente étude en utilisant des souris présentant un taux élevée de BACE1. (Cay et al. 2011). De plus son activité serait modulé par la sphingosine 1 phosphate.

### II.4.2.3 La $\gamma$ -sécrétase

Cette enzyme intervient dans les 2 voies de lyse de l'APP (Figure 5). Elle permet la finalisation de la protéolyse de la protéine APP via la protéolyse du fragment transmembranaire C83 ou C99. L'activité catalytique de la  $\gamma$ -sécrétase nécessite la formation d'un complexe formé de quatre protéines transmembranaires : la préséniline 1 ou 2, la nicastrine, Pen-2 (Presenilin-Enhancer-2) et l'Aph-1 (Anterior Pharynx defective-1). Chacune de ces quatre protéines possède un rôle bien déterminé. Pen-2 permet de maintenir la stabilité de l'ensemble du complexe, la nicastrine permettrait la reconnaissance des différents substrats de la  $\gamma$ -sécrétase (Shah et al. 2005), les présénilines permettent la stabilisation (Pitsi and Octave, 2004) de C99.

Ce complexe une fois formé permet à la  $\gamma$ -sécrétase de cliver l'APP en deux sites distincts : le site  $\gamma$  et  $\epsilon$ . La coupure en ces deux sites permet la formation de peptides amyloïde de tailles différentes, les peptides  $A\beta$  1-40 et  $A\beta$  1-42 représentant les deux formes majoritaires (Qi-Takahara et al. 2005) ainsi que la libération du fragment AICD (APP intracellular Domain) dans la voie amyloïdogénique qui pourrait être impliqué dans les phénomènes d'apoptose (Kinoshita et al. 2002) ou encore dans la signalisation. Dans la voie non amyloïdogénique la  $\gamma$ -sécrétase entraîne la libération de l'AICD et du fragment P3 ( $A\beta$  17-42).

Les différentes lyses entraînent la formation des fragments sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , AICD, P3 et  $A\beta$ .

#### II.4.2.4 AICD

Parmi ces différents fragments on retrouve le fragment AICD produit dans les deux voies sous la forme AICD59 et AICD57 (59 et 57 acides aminés) issus des précurseurs APP-Cter  $\alpha$  et APP-Cter  $\beta$ . A l'heure actuelle, sa fonction biologique est toujours discutée. Des études montrent que le fragment AICD associé à la protéine adaptatrice nucléaire Fe65 et au complexe d'histone Tip60 participe à la transactivation hétérologue des gènes nucléaires (Cao and Sudhof 2001). L'AICD joue également un rôle dans les phénomènes d'apoptose (Kinoshita et al. 2002 ; Kögel et al. 2011). Des études récentes réalisées à partir de modèles présentant une surexpression d'AICD ont montré des résultats contradictoires :

- une augmentation significative de la phosphorylation de la protéine Tau (protéine responsable des dégénérescences des neurofibrilles) entraînant une baisse des fonctions cognitives (Ghosal et al. 2009) a été observée
- aucune phosphorylation de Tau dans l'étude de Giliberto l'année suivante (Giliberto et al. 2010).

Des recherches complémentaires sur le fragment AICD sont nécessaires afin de comprendre son véritable rôle pathologique.

#### II.4.2.5 Fragment P3

Le fragment P3 A $\beta$  17-42 correspondant aux résidus 17 à 42 du peptide A $\beta$  est produit par le clivage non-amyloïdogénique de la  $\gamma$ -sécrétase. Contrairement aux autres fragments issus de la protéolyse de l'APP, P3 fut peu étudié, car il était considéré comme rapidement dégradé dans le milieu extracellulaire (Haass, Hung et al. 1993). En 1996 P3 a été décrit comme étant un composant principal des dépôts pré-amyloïdes chez les personnes atteintes de la trisomie 21 (Lalowski et al. 1996) et étant présent exclusivement chez les patients atteints de la MA (Higgins et al. 1996). A l'heure actuelle aucune étude ne présente de lien direct entre ce fragment et la MA. En effet, une surexpression de P3 n'entraîne aucune toxicité (Walsh et al. 2002). D'ailleurs le fragment P3 est incapable de former des oligomères, comme décrit en 2008 par Dulin (Dulin et al. 2008).

#### II.4.2.6 Le peptide Amyloïde A $\beta$

Comme décrit précédemment, le peptide A $\beta$  provient du clivage successif de l'APP par la  $\beta$ -sécrétase et de la  $\gamma$ -sécrétase. Le clivage par les deux enzymes libère le peptide amyloïde A $\beta$  avec une séquence composée de 15 à 43 acides aminés : parmi elles les formes A $\beta$  1-40 et A $\beta$  1-42, mais également des formes tronquées avec une perte d'acides aminés du côté N-terminal, comme les formes A $\beta$  3-x (Wirhth et al. 2009). Les formes les plus étudiées restent les peptides A $\beta$  1-40 et A $\beta$  1-42, qui comptent comme étant les formes les plus toxiques malgré leur présence minoritaire. A $\beta$  1-42 ne représente que 10% de l'abondance totale du peptide A $\beta$ . (Sergeant et al. 2003).

Asp<sub>1</sub>-Ala-Glu-Phe-Arg-His<sub>6</sub>-Asp-Ser-Gly-Tyr<sub>10</sub>-Glu<sub>11</sub>-Val-His<sub>13</sub>-  
His<sub>14</sub>-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-  
Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met<sub>35</sub>-Val-Gly-Gly-Val-Val<sub>40</sub>-Ile<sub>41</sub>-  
Ala<sub>42</sub>

Figure 6 : Séquence peptidique du peptide A $\beta$ 42, N- vers C-terminal. La partie rouge représente les acides aminés participants à la chélation d'ions métalliques. En gras les acides aminés du domaine transmembranaire et en bleu les acides aminés 41 et 42 du peptide A $\beta$ 1-42 (Clippindale et al. 2001).

## II.5 Rôle physiologique du peptide amyloïde (peptide A $\beta$ )

La production et la présence du peptide A $\beta$  dans les cellules neuronales est naturelle (Haass et al. 1992), tout comme sa présence dans les cellules non neuronales (Shoji et al. 1992). Dès lors la question de sa fonction biologique a été posée. Différents groupes de recherches se sont penchés sur le rôle physiologique du peptide amyloïde comme le groupe de Yankner en 1990 (Yankner et al. 1990) qui montra que les résidus 25 à 35 du peptide amyloïde possède des propriétés neurotrophiques (concentration de l'ordre de la picomole). Ce caractère neurotrophique a également été montré avec le peptide A $\beta$  1-40 toujours à des concentrations picomolaire (Chen and Dong, 2009). Pour des concentrations plus importantes de l'ordre de la nanomole, les peptides amyloïdes A $\beta$  1-40 et A $\beta$  1-42 ont une activité antioxydante (Kontush et al. 2001), mais entraîne également la survie des neurones de l'hippocampe (Yankner et al. 1990). L'importance du peptide A $\beta$  1-40 à de faible concentration a été démontrée par sa capacité de bloquer la formation des protofibrilles A $\beta$  1-42 en fibrilles (Jan et al. 2008).

Plus récemment des études ont démontré que le peptide A $\beta$  1-42 serait associé à l'apprentissage et la formation de la mémoire (Garcia-Osta and Alberini, 2009).

Tous ces exemples ci-dessus montrent le rôle protecteur des peptides amyloïdes à des concentrations relativement faibles et dans des structures monomériques.

### II.5.1 Le peptide A $\beta$ et la toxicité

Ces quelques exemples montrent que le peptide A $\beta$  sous sa forme monomère ne présente pas de caractère toxique mais au contraire un rôle protecteur d'un point de vue physiologique. Cependant, ce même peptide présente également un caractère neurotoxique que nous allons développer. Le caractère neurotoxique des deux formes A $\beta$  1-40 et A $\beta$  1-42 est en fait corrélé à leur état d'agrégation. La forme A $\beta$  1-40 semble néanmoins moins toxique que la forme A $\beta$  1-42 (Zou et al. 2003)

Dans la suite sont présentées les différentes formes d'agrégats du peptide A $\beta$  ainsi que leur toxicité dans le cadre de la MA.

### II.5.1.1 Peptide Amyloïde soluble

Le terme de peptide amyloïde soluble regroupe l'ensemble des formes restées en solution après une centrifugation d'extraits bruts de cerveaux à 100 000 g. Parmi ces espèces se retrouvent les monomères, les dimères, les trimères ainsi que les oligomères (Walsh et al. 2000). Plusieurs études ont montré un lien direct entre les formes solubles d'A $\beta$  et la MA. Les cellules présentant des mutations de l'APP et des présénilines ont montré une augmentation de la formation d'oligomères (Xia et al. 1997). Ce phénomène a également été remarqué chez des souris APP transgéniques où l'augmentation de peptide A $\beta$  soluble entraîne une diminution des synapses (Mucke et al. 2000). Une autre étude très récente vient de montrer que les dimères d'A $\beta$  entraîneraient la phosphorylation de la protéine Tau ainsi que la dégénérescence des neurones (Jin et al 2011)

Deux autres structures sont également formées à partir du peptide amyloïde : la forme oligomérique ou ADDL (A $\beta$ -Derived Diffuse Ligand), et la forme fibrillaire

### II.5.1.2 Les formes oligomères ou ADDL

Les formes oligomères ou ADDL (A $\beta$ -Derived Diffuse Ligand) sont des oligomères formés de 3 à 24 molécules d'A $\beta$ . Toutefois des formes comportant jusqu'à 48 monomères A $\beta$  ont également été identifiées.

Cette structure a été décrite par l'équipe de Lambert en 1998 après l'isolement et l'identification des protofibrilles (Lambert et al. 1998) L'utilisation du microscope à force atomique a permis d'observer sa structure (Klein et al. 2001).



Figure 7 : Microscopie à force atomique révélant les ADDL de 5nm de diamètre (Chromy et al. 2003)

Dès lors plusieurs équipes ont concentré leurs efforts sur cette forme soluble. En 2003 l'équipe de Gong a pu identifier une forme de 12 monomères d'A $\beta$  comme étant la forme la plus active et présente à des taux élevés dans les cerveaux de patients atteints de la MA. (Gong et al. 2003). Deux ans plus tard des analyses dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ont également montré des taux importants d'ADDL (Georganopoulou et al 2005). Différentes équipes de recherches ont tenté d'établir un lien entre les ADDL et la mémoire : des injections d'ADDL chez le rat ont montré des perturbations de la mémoire

(Clearly et al. 2005). Ce n'est qu'en 2006 que la toxicité de la forme ADDL à 12 monomères d'A $\beta$  fut révélée dans des souris transgéniques (Lesné et al. 2006) soit 3 ans après la découverte de la forme ADDL à 12 monomères.

### II.5.1.3 La forme fibrillaire

Bien que la forme oligomérique est représentée comme étant la forme la plus toxique, la forme fibrillaire de l'amyloïde  $\beta$  est également toxique et représente également un intérêt dans le cadre de la MA. En effet il s'agit du dernier stade structural avant la formation des plaques séniles retrouvées dans le cerveau. La structure des fibrilles d'A $\beta$  a pu être révélée par cristallographie et par l'utilisation de la RMN : ces études ont mis en évidence une organisation en feuillets  $\beta$  parallèles et antiparallèles. (Irie et al. 2005)

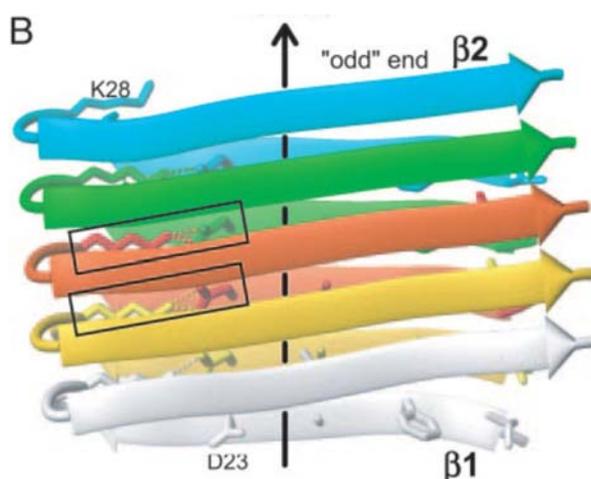


Figure 8 : Représentation fibrillaire du peptide 1-42. Chaque couleur représente un peptide en interaction avec ses voisins immédiats. (Luhrs et al.2005)

## II.6 Mécanismes moléculaires de la toxicité induite par l'A $\beta$

Il est largement accepté que la MA débute avec un défaut de l'expression ou du métabolisme de l'APP, ou avec un changement de la stabilité ou de l'état d'agrégation de l'A $\beta$ , qui induisent un déséquilibre entre la production et la dégradation du peptide A $\beta$ . Ce dernier est libéré dans le milieu extracellulaire, et se retrouve soit dans l'espace intercellulaire, soit dans la cellule. Cette accumulation graduelle d'A $\beta$  pourrait initier une cascade d'événements qui incluent une phase inflammatoire, des changements neurologiques et synaptiques, la formation d'amas neurofibrillaires et la perte de transmission synaptique (pour revue voir Selkoe, 2002, Verdier and Penke, 2004). Il a été démontré que la majorité des formes d'A $\beta$  présentes dans les plaques sont des formes tronquées dans l'extrémité N-terminale (Sergeant et al. 2003)

L'agrégation physiologique d'A $\beta$  soluble en fibrilles a longtemps été considérée comme une étape clé dans la propagation de la maladie. La formation des fibrilles est un processus comprenant deux étapes : une étape de nucléation initiale lente suivie par une rapide élongation des fibrilles. L'A $\beta$  possède des qualités de

tension de surface particulières, et il a été proposé qu'au dessus d'une concentration limite de 0.1mM la nucléation est le résultat de la formation de micelles (Lomakin et al. 1996). Les micelles s'associent pour former un noyau dense, ou s'associent sur des protofibrilles préexistantes. L'élongation des fibrilles débute par la formation de petits intermédiaires, qui sont toxiques pour des neurones en culture (Walsh et al. 1999).

La toxicité de ces premiers agrégats est basée sur leur capacité intrinsèque de perturber des processus fondamentaux pour la cellule en interagissant avec différentes membranes cellulaires, induisant un stress oxydatif et une augmentation du  $Ca^{2+}$  libre, qui peut éventuellement conduire à une apoptose (Stefani and Tompson, 2003).

Les protofibrilles s'associent latéralement pour former des fibrilles amyloïdes. Il est possible que ces fibrilles aient un effet protecteur en elles-mêmes : elles pourraient constituer pour l'organisme un moyen de « séquestrer » les intermédiaires toxiques (Lansbury, 1999). Cependant, la corrélation entre la présence de ces fibrilles avec la toxicité observée dans la MA est bien établie, même si les fibrilles sont moins toxiques que les intermédiaires pré-fibrillaires (Stefani et Tompson, 2003). La MA commence par des altérations dans la transmission synaptique dans l'hippocampe avant la dégénération neurofibrillaire, et cette dysfonction synaptique semble induite par les espèces oligomériques de l'A $\beta$  (Selkoe, 2002).

De plus, l'A $\beta$  possède des propriétés trophiques dues à sa capacité à capturer les ions métalliques redox (Cu, Fe) et le Zn, les empêchant de jouer leur rôle avec d'autres ligands de l'équilibre redox. La chélation du Cu par l'A $\beta$  pourrait aggraver le stress oxydatif dans l'environnement légèrement acide et oxydatif qui accompagne les traumatismes crâniens et la MA. (Atwood et al. 2003).

Ces dernières années, l'utilisation de peptide A $\beta$  synthétique, de modèles de culture cellulaire, de souris transgéniques et de cerveau humain suggère donc que les formes diffusibles, préfibrillaires de l'A $\beta$ , ont un effet cytotoxique important (Walsh et Selkoe, 2007 pour revue).

Les oligomères et les protofibrilles d'A $\beta$  exercent leur effet neurotoxique par leur action directe sur les neurones. Cependant, les fibrilles peuvent également avoir un effet neurotoxique, indirect, en induisant la production d'intermédiaires toxiques par les cellules gliales, qui induisent la neurodégénérescence associée avec la MA (voir Fassbender et al. 2001 pour revue).

## II.7 Objectifs de ce travail

Différentes hypothèses coexistent donc et tentent d'expliquer, au niveau moléculaire, la toxicité induite par l'A $\beta$ . Nous avons vu que celles-ci, qui ne sont pas forcément exclusives, sont rendues plus complexes encore par l'existence de différentes formes d'A $\beta$ , de séquence et d'état d'agrégation différents. Ainsi, le rôle des fibrilles d'A $\beta$  dans la pathogénie de la MA est toujours discuté. Si ces fibrilles ne sont actuellement pas considérées comme étant la forme la plus toxique de l'A $\beta$ , leur fonction reste à préciser.

Ce travail vise à identifier les partenaires moléculaires de formes fibrillaires de l'A $\beta$ . Pour cela, nous avons utilisé un test de co-précipitation entre des fibrilles d'A $\beta$  1-42 synthétiques et des protéines extraites de synaptosomes de rats (Lorenzo et al. 2000, Verdier et al. 2005). Un des avantages de ce modèle est qu'il permet de travailler sur une séquence d'A $\beta$  connue, sous un état d'agrégation validé. L'utilisation des synaptosomes permet de réduire la complexité des échantillons biologiques, même si notre protocole conduit à la présence dans les échantillons de protéines « contaminantes », qui ne sont pas purement synaptosomales mais qui peuvent cependant avoir un intérêt biologique. L'utilisation de la spectrométrie de masse, plus particulièrement d'un spectromètre de type ESI-LIT-FTICR nous a permis de réaliser des identifications protéiques avec une grande précision diminuant le nombre de faux positifs.

# III INTRODUCTION A LA PROTEOMIQUE

---

## III.1 Introduction a la protéomique

### III.1.1 Avant-propos

Durant de nombreuses années, la génomique a été considérée comme la discipline phare permettant de comprendre le fonctionnement d'une cellule ainsi que le mécanisme de certaines pathologies. Le développement de nombreuses techniques de biologie moléculaire a permis de réaliser de grandes avancées dans ce domaine. Depuis le démarrage du projet de séquençage du génome humain au début des années 90, près de 20 000 gènes ont été identifiés grâce à l'action conjointe de différents groupes de recherches publics et privés (International Human Genome Sequencing Consortium 2004).

Cependant une telle quantité d'information ne permet pas de comprendre tous les mécanismes cellulaires : l'étude des gènes seule ne suffit pas à la compréhension de la vie de la cellule ainsi que les différentes interactions retrouvées en son sein. Après le séquençage à haut débit du génome, l'étude des protéines s'avère donc nécessaire afin d'obtenir une meilleure compréhension des systèmes cellulaires.

### III.1.2 Le protéome

C'est en 1994 qu'un étudiant australien nommé Mark Wilkins (Wilkins et al. 1996) employa le terme protéome pour la première fois lors de ses travaux de thèse. Ce terme, qui résulte de la contraction des mots « protéine » et « génome », représente l'ensemble des protéines exprimées par un génome donné, dans un environnement donné, à un moment donné. A l'inverse du génome, le protéome décrit de façon dynamique les protéines exprimées selon l'état de la cellule. Les différentes modifications post-traductionnelles rendent l'identification et la compréhension de leur fonction bien plus complexe que l'étude du génome.

### III.1.3 L'analyse protéomique

Le terme analyse protéomique introduit en 1998 par Anderson et Anderson (Anderson et Anderson 1998) désigne l'analyse quantitative des niveaux d'expression des protéines permettant la compréhension des mécanismes de contrôle de l'expression génétique. Toutefois la définition revisitée de Tyres et Mann (Tyres et Mann 2003) définit l'analyse protéomique comme étant l'analyse globale des protéines caractérisées par leurs interactions, leurs modifications et les différents isoformes exprimées dans la cellule. Dès le début, de nombreux outils ont été mis en œuvre pour permettre la caractérisation moléculaire et la quantification des protéines. Ils seront revus par la suite.

Deux stratégies permettent l'identification des protéines: l'approche bottom-up et l'approche top-down. L'approche bottom-up qui a longtemps été la plus utilisée repose sur une stratégie basée sur la digestion protéolytique des protéines d'intérêt suivie d'une identification par spectrométrie de masse.

L'approche top-down qui nécessite l'utilisation de spectromètres de masse permettant une analyse de masse précise repose sur la fragmentation directe des protéines d'intérêt sans digestion au préalable. Dans le cadre de notre étude nous avons utilisé la stratégie bottom-up ; nous allons donc développer cette stratégie dans cette introduction.

### III.1.4 L'analyse protéomique et la stratégie bottom-up

#### III.1.4.1 La cartographie peptidique (PMF)

La cartographie peptidique ou (PMF pour Peptide Mass Fingerprint) est une technique d'identification des protéines décrite en 1993 (Mann et al. 1993) Les protéines purifiées sont digérées par une endoprotéase (généralement la trypsine) et analysé par spectrométrie de masse. Chacune des masses des peptides protéolytiques mesurés est ensuite comparée à l'ensemble des masses théoriques provenant de digestion virtuelle *in silico* dans les banques de données en tenant compte de la spécificité protéolytique de l'enzyme. Cette comparaison nous permet d'identifier la protéine présente dans l'échantillon. Les différents candidats à l'identification sont triés en fonction de leur correspondance avec le profil expérimental.

Une des principales limites de cette technique est liée aux performances du spectromètre de masse mis en jeu. En effet la stratégie PMF nécessite une grande précision de mesure, de plus la présence de protéines en mélange et la complexité croissante des bases de données rend cette approche très délicate et nécessite des moyens de confirmations par séquençage dans de nombreux cas. Nous reviendrons sur ce point avec l'approche PMF avec le spectromètre de masse MALDI-Orbitrap.

Ces différentes limites et le nombre croissant de protéines et de peptides à analyser ont entraîné le développement de différentes approches de détection et d'identification des protéines. Parmi ces approches on retrouve la stratégie nano LC-MS/MS.

### III.1.4.2 Le séquençage par fragmentation

Dans le cas de protéines en mélange ou de protéines modifiées, le PMF ne peut pas être utilisé. En effet les spectres des mélanges protéolytiques se superposent et les espèces subissent un effet de suppression spectrale. En outre si certains peptides sont modifiés leur masse n'est pas égale à la masse théorique déduite de la séquence primaire. Enfin en prenant une combinaison de masses issues de peptides de protéines différentes, il est possible de trouver une correspondance meilleure pour une protéine qui n'est pas réellement présente dans le mélange. Dans tous ces cas de figure il est alors important d'obtenir une information de séquence qui lèvera les ambiguïtés d'interprétation due à la coïncidence exacte de peptide de séquences différentes mais de formules brutes identiques.

Le séquençage des peptides se fait en passant en mode spectrométrie de masse tandem où l'espèce d'intérêt est sélectionnée dans un premier temps, puis fragmentée. Les fragments obtenus sont alors mesurés et détectés. De l'information de fragmentation il est possible de remonter à la séquence. On parle alors de séquençage des peptides par spectrométrie de masse en MS/MS. Ce point sera un peu plus développé dans la suite. Avec un couplage à une technique séparative en phase liquide supplémentaire, les espèces vont être introduites séquentiellement dans le spectromètre de masse pour être fragmentées automatiquement. Lors d'une étude en 1992 (Hunt et al. 1992) cette approche a montré de nombreux avantages en comparaison avec l'approche de type PMF. En effet l'utilisation d'une chromatographie en amont du spectromètre de masse permet de à la fois de réaliser une séparation des peptides et de les concentrer et offre un gain en sensibilité et en gamme dynamique. Cette stratégie est désormais une technique de référence dans le cadre de l'analyse protéomique (Domon et al. 2006).

La compatibilité naturelle de la source électrospray avec la chromatographie liquide a fait de celle-ci la source de choix pour l'analyse en LC-MS/MS. Cependant l'apparition de micro-collecteurs de fractions a permis le développement de stratégies LC-MALDI MS/MS. Nous reviendrons sur le couplage LC-MALDI dans un prochain chapitre.

Intéressons nous aux différents outils permettant de réaliser les différentes approches.

## III.2 Les outils de l'analyse protéomique

Parmi les outils principaux permettant de réaliser l'analyse protéomique nous pouvons citer :

1. Le gel d'électrophorèse
2. La chromatographie en phase liquide
3. La spectrométrie de masse

### III.2.1 Le gel d'électrophorèse mono et bidimensionnelle.

Cette technique de séparation des protéines reste une technique de choix de part sa simplicité et sa reproductibilité. La séparation est réalisée sur un gel de polyacrylamide dont le taux de réticulation va déterminer la taille des pores du gel. La présence de SDS va entraîner la dénaturation des protéines et apporter une charge négative à la protéine. La séparation sera donc uniquement réalisée en fonction de la masse de la protéine. L'utilisation de la séparation bidimensionnelle des protéines fut décrite en 1975 (O'Farrell et al. 1975) avec jusqu'à 1000 spots résolus et détectés.

Cette méthode permet la séparation des protéines selon deux caractères physico-chimique :

- Le point isoélectrique
- La masse apparente

La première dimension est une séparation basée sur le point isoélectrique des protéines utilise la méthode d'isoélectrofocalisation. Cette première séparation réalisée sur un gradient de pH permet la séparation des protéines uniquement en fonction de leur charge, plus exactement en fonction de leur pI. La migration de la protéine s'arrêtera lorsque son pI sera atteint et que sa charge apparente sera nulle.

La seconde dimension est réalisée sur gel SDS PAGE permettant de réaliser la séparation uniquement en fonction de la masse des protéines.

Cette technique n'étant pas mise en œuvre dans le cadre de ces travaux elle ne sera pas détaillée dans ce manuscrit. Pour une revue détaillée voir par exemple la revue de Rabilloud (Rabilloud 2000)

### III.2.2 La chromatographie en phase liquide (HPLC)

La séparation des peptides par chromatographie en phase liquide est rapidement devenue une technique de choix pour l'analyse en protéomique grâce à son couplage relativement simple avec la spectrométrie de masse. Cette technique fait intervenir deux phases, une phase solide stationnaire et une phase mobile liquide. Les avantages de cette technique sont relativement nombreux car elle permet de réaliser des séparations des peptides selon de nombreuses propriétés physico-chimiques telles que la charge, le pI, la taille, et l'hydrophobie.

#### III.2.2.1 La chromatographie à polarité de phases inversée (RPLC)

La chromatographie en phase liquide à polarité de phase inversée (RPLC pour Reversed-phase Liquid Chromatography) est une méthode chromatographique qui met en œuvre une phase stationnaire apolaire. Le terme "reversed phase" est historique : dans les années 1970 la plupart des séparations chromatographiques étaient réalisées sur une phase stationnaire de silice non modifiée ou sur de l'alumine modifiée pour obtenir une surface hydrophile. Ces phases qui avaient une plus forte affinité pour les composés polaires étaient les phases dites « normales ». L'ajout de chaînes alkyles sur les supports

stationnaires permet d'inverser l'ordre d'éluion et est donc appelé « Reversed » (Molnar and Horvath 1976). Les composés polaires sont élués les premiers alors que les composés apolaires sont retenus.

La RPLC peut aussi être considérée comme une chromatographie d'hydrophobicité. Elle est similaire à la chromatographie d'échange d'ions. Des groupes lipophiles ou hydrophobes sont liés covalamment à la phase stationnaire. Lorsque la solution de peptides, polypeptides ou protéines est percolée à travers la colonne, les espèces hydrophiles seront éluées les premières, alors que les protéines hydrophobes seront retenues sur la phase stationnaire. Dans ce cas la séparation fait intervenir en général :

- une phase stationnaire apolaire composée de silice sur laquelle sont greffés des chaînes alkyles de 4 à 18 carbones selon la masse moyenne et l'hydrophobicité ou la polarité des composés étudiés (pour les peptides des chaînes octadécyle sont généralement utilisées).
- une phase mobile liquide aqueuse contenant de l'acétonitrile (AcN) ou du méthanol (MeOH). Elle permet la séparation en fonction de la polarité des peptides, la concentration croissante de solvant organique apolaire venant rompre les interactions entre les solutés et la phase stationnaire.

Très rapidement la chromatographie en phase liquide à polarité de phases inversée (RPLC) s'est imposée comme la technique de référence pour le couplage avec la spectrométrie de masse (MS) de par son pouvoir de résolution des peptides et la compatibilité des solvants utilisés avec les modes d'ionisation utilisés en spectrométrie de masse pour les peptides.

De nombreux développements ont été nécessaires afin d'obtenir une sensibilité d'analyse compatible avec les quantités d'échantillons disponibles en miniaturisant la technique. Pour cela l'utilisation de très faibles débits (entre 100 et 300 nL/min) a du être réalisée sur des colonnes de petits diamètres (entre 50 et 100 µm de diamètre interne). La chromatographie reste un outil robuste dans le cadre de l'analyse protéomique, elle reste cependant délicate à mettre en œuvre avec certains problèmes liés aux nombreuses connexions qui peuvent augmenter les volumes morts et entraîner une perte en résolution chromatographique. Afin de faciliter le système chromatographique des développements ont été réalisés, nous pouvons citer l'exemple des puces chromatographiques. (Yin et al. 2005, Hardouin et al. 2006).

### III.2.2.2 L'approche multidimensionnelle.

#### III.2.2.2.1 La chromatographie en phase liquide bidimensionnelle LC2D

Afin d'augmenter la capacité d'analyse de notre système chromatographique par rapport à la stratégie monodimensionnelle, une séparation bidimensionnelle permettant d'augmenter la capacité de pics de la séparation chromatographique a été envisagée. On parle alors de « Multi-Dimensional Liquid Chromatography » ou MDLC faisant référence aux travaux publiés en 1984 (Giddings et al. 1984). Cette séparation fait intervenir deux séparations chromatographiques successives en ligne ou non (LC2D). Elle permet de séparer les peptides selon deux caractères physico-chimiques et non plus un seul comme lors de la stratégie monodimensionnelle. Cette séparation multiple a permis le développement d'analyses d'échantillons encore plus complexes (Link et al. 1999).

Cette approche a été nommée MudPIT (Multi-Dimensional Protein Identification Technology) (Gonzalez-Begne et al. 2009) ou protéomique shotgun (Delmotte et al. 2009).

Généralement ce type de d'approche fait intervenir deux types de séparations selon des paramètres physico-chimiques indépendants, même si certaines séparations 2DLC font intervenir deux colonnes RPLC avec un changement de phase mobile. La stratégie LC2D la plus généralement utilisée repose sur une séparation des peptides avec une chromatographie d'échanges de cations (communément appelé SCX pour Strong Cation Exchange). Cette première séparation nécessite une phase mobile saline permettant la séparation des peptides selon des interactions ioniques. La deuxième séparation est réalisée selon un gradient classique en phase inverse avec une séparation basée sur la polarité des peptides.

Le schéma de principe de cette séparation est détaillé au paragraphe III.4.3 page 66

#### III.2.2.2.2 Alternatives à la LC2D

Toujours dans le but d'augmenter le nombre de protéines identifiées et d'augmenter la capacité d'analyse des approches utilisant une séparation dite 3D ont été développées. Ce type d'analyse combine trois séparations successives : une première séparation de type RP suivie d'une séparation SCX et une dernière séparation RP. Bien que ce type de séparation ait montré des résultats intéressants (Anderson et al. 2006) sa complexité d'exécution ainsi que le nombre d'étapes de séparation n'ont pas permis à cette technique de rencontrer un grand succès.

Alors que la tendance actuelle tend vers une augmentation de la rapidité des gradients d'élution pour obtenir une séparation bidimensionnelle des peptides plus rapide, malgré les difficultés de traitement du signal en spectrométrie de masse, une approche monodimensionnelle basée sur l'allongement du gradient a été développée au laboratoire. Un allongement de la durée du gradient augmente la capacité d'analyse en spectrométrie de masse sans réaliser de séparation multidimensionnelle. Les premières études réalisées au

laboratoire ont permis de comparer les résultats d'une analyse en LC2D contre une analyse en LC1D avec un gradient de 15 heures. Les travaux d'A.M Hesse au laboratoire (Hesse 2009) montrent des résultats équivalents entre une analyse LC2D et une analyse LC1D de 15 heures. Ceci nous montre que l'allongement de la durée du gradient conduit à des résultats tout aussi satisfaisants que la LC2D. Moins contraignante cette alternative présente les avantages suivants :

- Elle ne nécessite pas de montage particulier mise à part la nanoLC MS/MS
- Elle est robuste
- Elle est moins chère
- Elle est automatisable
- Elle ne prend pas plus de temps qu'une analyse bidimensionnelle.

### III.3 La spectrométrie de masse

#### III.3.1 Définition

A la question : « qu'est ce qu'un spectromètre de masse ? » certains diront de manière simple qu'il s'agit d'une « balance » permettant de mesurer de petites masses. Cette définition s'avère simpliste mais n'est pas complètement fautive ; la spectrométrie de masse est une technique d'analyse physique permettant la séparation et la détection des ions en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$   $m$  étant la masse et  $z$  la charge). Cette technique utilisée depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle (Thomson et al. 1913) a connu depuis de nombreuses évolutions qui ont permis d'étendre son domaine d'application vers les sciences du vivant.

Tous les spectromètres de masse possèdent 3 éléments essentiels à son fonctionnement :

- Une source d'ionisation
- Un analyseur de masse
- Un détecteur
- Un enregistreur

Chacun de ces éléments tient un rôle dans l'analyse des molécules :

- La source d'ionisation permet depuis une phase liquide ou solide le passage des molécules à l'état gazeux.
- Les différentes molécules ionisées sont ensuite séparées dans l'analyseur en fonction du rapport  $m/z$ .
- Chaque ion est ensuite transformé en signal électrique grâce au détecteur.

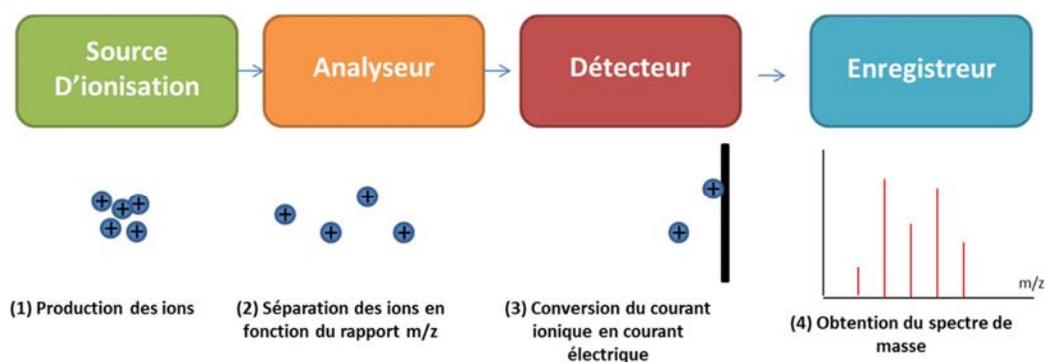


Figure 9: Représentation schématique d'un spectromètre de masse avec chaque compartiment nécessaire à son fonctionnement.

### III.3.2 Les sources d'ionisation.

Tout comme son nom l'indique la source d'ionisation assure l'ionisation des molécules d'intérêt afin de les détecter au sein du spectromètre de masse.

Deux découvertes importantes récompensées par deux prix Nobel de chimie en 2002 (Fenn et Tanaka) ont permis de démocratiser la spectrométrie de masse et son utilisation pour les macromolécules telles que les peptides et les protéines. Ces deux méthodes sont rapidement décrites ci-dessous.

#### III.3.2.1 L'ionisation électrospray (ESI)

Bien que ce principe fut utilisé en 1968 par Dole (Dole et al. 1968) pour l'étude de molécules de haut poids moléculaire, le principe d'électrospray ou ESI décrit dans les années 1980 par Yamashita et Fenn (Whitehouse et al. 1985 ; Fenn et al. 1989) montrèrent l'intérêt de cette technique pour l'étude des protéines.

Sous l'effet d'un champ électrique et placés dans un gradient de pression décroissant dans une interface chauffée, les ions présents en solution se retrouvent sous une forme gazeuse. Cette production d'ions est la résultante de la formation d'un flux nébulisé ou « spray » de fines gouttelettes formées de solvant et d'analytes. Par la suite ces différentes gouttelettes rétrécissent avec l'évaporation du solvant pour atteindre la limite de stabilité de Rayleigh. Cette limite correspondant au point où les répulsions coulombiennes entre les charges égalent les forces cohésives de la tension de surface du liquide. Cette limite atteinte, la force due aux répulsions électrostatiques provoque la désorption des ions jusqu'à obtenir des espèces totalement désolvatées à l'entrée dans le spectromètre de masse. Les différentes étapes de ce processus peuvent être expliquées par différentes équations (Kerbarle et al. 2000)

1. Le processus d'électronébulisation nécessite un champ électrique appelé  $E_0$  :

$$E_0 = \left( \frac{2\gamma \cos 49^\circ}{\epsilon_0 r_c} \right) \text{ Équation 1}$$

$\gamma$  étant la tension de surface du liquide,  $49^\circ$  étant le demi-angle du cône de Taylor,  $\epsilon_0$  la permittivité du vide et  $r_c$  le rayon du capillaire

2. Atteinte de la limite de Rayleigh

$$q_{\text{Rayleigh}} = 8\pi(\gamma\epsilon_0 r^3)^{1/2} \text{ Équation 2}$$

$q_{\text{Rayleigh}}$  correspond à la charge à la limite de Rayleigh,  $r$  le rayon de la goutte et  $\epsilon_0$  la permittivité du vide.

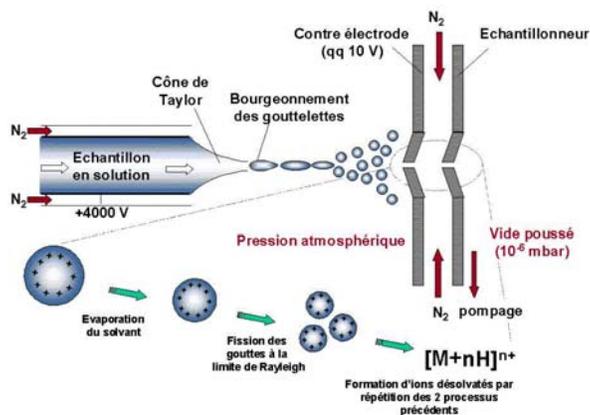


Figure 10: Principe général de l'ionisation Electrospray (Vinh 1999)

L'évaporation progressive du solvant contenu dans les gouttes permet la désorption de l'analyte et la formation d'ions multichargés.

L'ESI est une ionisation douce. Avec le développement de sources de type « nano » (Wilm et al. 1996) la sensibilité de cette méthode d'ionisation a pu être augmentée pour des détections de quantités d'échantillon de l'ordre l'attomole. Cependant cette technique miniaturisée possède toutefois certains inconvénients :

- Les spectres issus de cette ionisation sont complexes avec la présence d'ions multichargés.
- La qualité du spectre observé dépend de la qualité du « spray » ce qui peut engendrer des problèmes de stabilité au cours du temps

Il est donc primordial de veiller à la bonne reproductibilité des analyses en fonction du vieillissement de l'aiguille ou « tip » utilisé, mais également de bien optimiser les différents paramètres tels que la tension du capillaire et la position de l'aiguille pour obtenir le « spray » le plus régulier possible.

### III.3.2.2 L'ionisation MALDI

En 1988 Karas et Hillenkamp mettent au point un moyen permettant de produire des ions à partir de protéines de masse moléculaire supérieure à 10 kDa (Karas et al. 1988) par désorption laser à l'aide de matrice. A la suite de ces travaux l'ionisation MALDI (Désorption Laser Assistée par Matrice) a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives à l'analyse protéomique.

Le principe de ce mode d'ionisation repose sur l'irradiation par des impulsions laser d'un dépôt cristallin contenant l'analyte et une matrice organique co-cristallisés. Cette irradiation est réalisée à l'aide d'un laser pulsé à une longueur d'onde UV ou IR ce qui entraîne la désorption du couple matrice/analyte se retrouvant chargé grâce au transfert des protons de la matrice vers l'analyte. Dans le cadre de cette étude nous avons employé un laser travaillant dans l'UV, la configuration la plus répandue. Cette méthode peut se décomposer en 3 grandes étapes :

- Transfert de l'énergie du laser à la matrice
- Désorption de l'analyte avec les cristaux de matrice
- Ionisation de l'analyte par transfert de protons

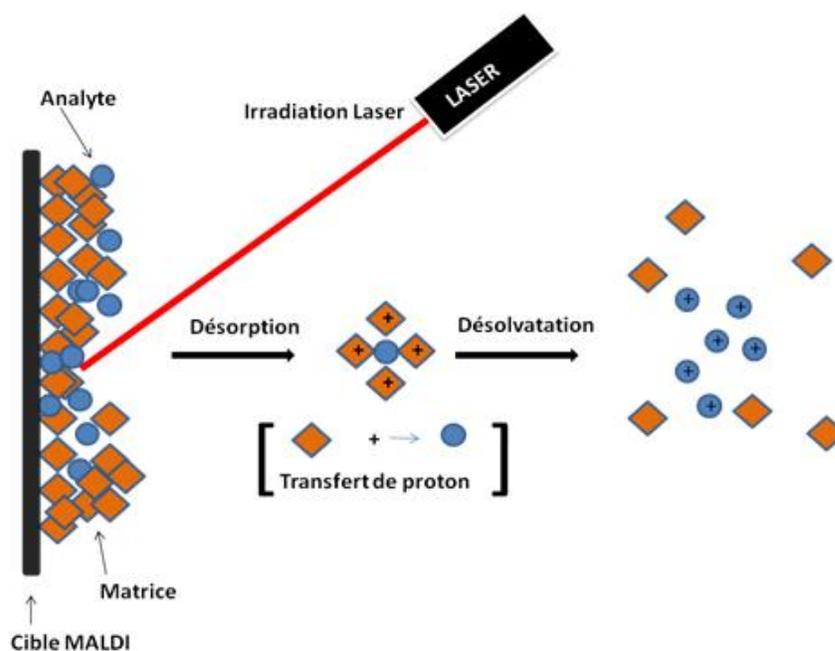


Figure 11: Principe général de l'ionisation MALDI

L'ionisation MALDI présente de nombreux avantages :

- La simplicité des spectres MS et MS/MS avec la présence quasi exclusive d'ions monochargés dans le cas des peptides, et d'ions de faible état de charge pour les protéines.
- L'analyse de composés de nature chimique différente.
- La possibilité de réaliser de l'imagerie moléculaire à partir de coupes de tissu.

L'ionisation MALDI présente néanmoins quelques inconvénients :

- En dessous de  $m/z$  600 Da les ions de matrice peuvent masquer le signal provenant des analytes, notamment en protéomique où l'on travaille avec de faibles quantités d'échantillons.
- La qualité du spectre dépend de la qualité du dépôt et peut donc varier pour un même échantillon

### III.3.3 Les analyseurs

Les analyseurs permettent la séparation des ions en fonction du rapport  $m/z$ , cette partie du spectromètre de masse est caractérisée par sa sensibilité, sa résolution, sa gamme dynamique et la précision de mesure. Ces différentes caractéristiques permettent de classer les analyseurs en différents groupes. Parmi ces analyseurs on retrouve les temps de vol, les quadripôles, les trappes et les analyseurs de type FTMS comme l'analyseur à résonance cyclotron ou l'Orbitrap.

#### III.3.3.1 Le temps de vol (TOF ou Time of Flight)

Souvent associé à l'ionisation MALDI, cet analyseur développé initialement en 1955 (Wiley et al. 1955) possède un long tube de vol libre de champ dans lequel règne un vide poussé de l'ordre de  $10^{-7}$  mbar. A travers ce tube les différents peptides se déplacent à une vitesse dépendante de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). Après ionisation, les ions sont accélérés vers l'analyseur avec une différence de potentiel ( $U$ ). Avec l'accélération les ions vont acquérir une énergie cinétique  $E_c$  donnée par l'énergie de potentiel  $E_p$ . Cet analyseur fait donc intervenir l'énergie cinétique des peptides ou des molécules à analyser.

$$E_c = \frac{1}{2} m \cdot v^2 \quad \text{Équation 3}$$

et

$$E_c = \frac{1}{2} m \cdot v^2 = q \cdot U = E_p \quad \text{Équation 4}$$

Où  $m$  est la masse de l'analyte et  $q$  est la charge totale de l'ion défini par  $q = z \cdot e$ ,  $z$  est l'état de charge et  $e = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{C}$  est la charge de l'électron

$$v = \sqrt{\frac{1.11}{l}} \quad \text{Equation 5}$$

La vitesse de l'ion est donc inversement proportionnelle à la racine carrée de  $m/z$ .

Le temps de vol ( $t$ ) de l'ion dans le tube de vol dépend de la vitesse de l'ion ( $v$ ) et de la longueur du tube du vol ( $l$ ) avec  $v = l/t$ . Nous obtenons donc :

$$l / t = v \quad \text{Equation 6}$$

La différence de potentiel  $U$ , la longueur du tube  $l$  ainsi que la charge de l'électron  $e$  étant constantes nous pouvons en déduire la valeur de  $m/z$  de l'ion en fonction du temps de vol.

Le temps nécessaire à l'ion pour traverser le tube de vol peut être calculé avec l'équation suivante :

$$t = \sqrt{\frac{l}{v}} \quad \text{Equation 7}$$

Dans le cas idéal, les ions sont générés au même moment et sur une même durée. Dans la pratique avec la largeur de l'impulsion laser, la distribution de vitesse initiale et la répartition de l'analyte dans la chambre d'ionisation, deux ions de masses identiques n'auront pas forcément la même vitesse et la même trajectoire dans le tube de vol. Ces deux problèmes limitent la résolution et la sensibilité.

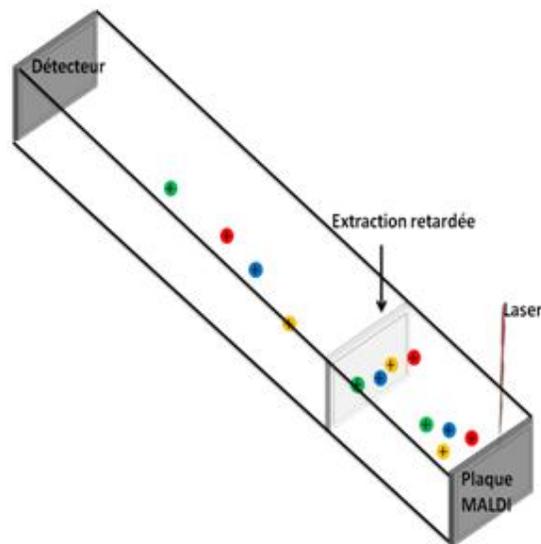


Figure 12 : Principe de l'extraction retardée dans l'analyseur temps de vol

### III.3.3.1.1 L'extraction retardée (Delay extraction DE)

L'ajout d'une lentille en amont de l'analyseur (Brown et al. 1995) possédant un potentiel légèrement supérieur à celui de la cible MALDI permet de retarder les ions, juste avant leur entrée dans l'analyseur. Ce retard de quelques nanosecondes permet à l'ensemble des ions d'entrer dans le tube de vol avec une moindre dispersion temporelle, ce qui limite *in fine* les problèmes de dispersion spatiale.

### III.3.3.1.2 Le réflecteur électrostatique (Réflectron)

Il a pour principal rôle de corriger la dispersion en énergie cinétique des ions. Pour cela une série de lentilles sur lesquelles sont appliqués des potentiels croissants sont placés à l'extrémité du tube de vol. Ces différentes lentilles vont agir comme un miroir électrostatique, et permettre une inversion de la direction des ions, qui vont converger sur un plan sur lequel est placé le détecteur. La dispersion en énergie est donc corrigée ponctuellement ce qui permet d'augmenter la résolution, mais il y a un coût en sensibilité car certaines espèces sont neutres et ne sont donc pas soumises à l'effet du champ électrostatique, ou se fragmentent avant et ne seront pas détectés correctement (Mamyrin et al. 1973).

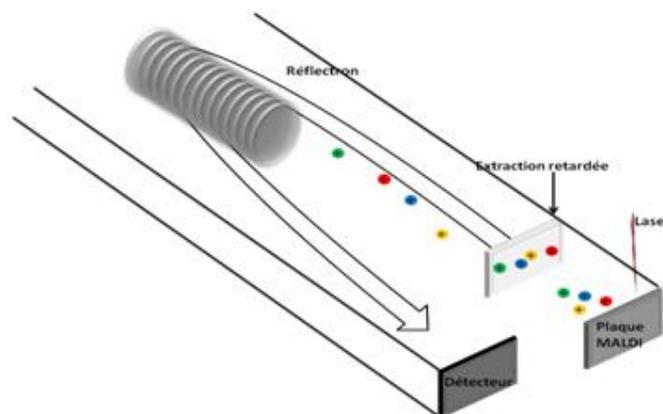


Figure 13: Principe du temps vol avec l'extraction retardée et le réflectron

### III.3.3.2 L'analyseur quadripolaire.

Le principe de fonctionnement de cet analyseur a été décrit la première fois en 1953 par Paul et Steinwedel (Paul et Steinwedel, 1953). Cet analyseur est composé de quatre barres métalliques parallèles opposées deux à deux. Cette opposition permet d'appliquer à chacun des couples connectés électriquement d'appliquer un potentiel opposé  $\pm\varphi$ .

$$\Phi = + (U-V.\cos \omega t) \text{ et } \Phi = -(U-V.\cos \omega t) \quad \text{Équation 8}$$

U étant la tension continue et V la tension alternative.

Comme dans tout spectromètre de masse l'entrée des ions dans l'analyseur est précédée d'une accélération, une fois les ions dans l'analyseur les ions subissent l'effet du champ quadripolaire. La trajectoire de chaque ion est dépendante des valeurs de U et de V, ces valeurs détermineront la stabilité de l'ion au sein du quadripôle. L'oscillation des trajectoires obéit aux équations de Mathieu.

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0 \quad \text{Équation 9}$$

avec  $\xi = \frac{\omega t}{2}$ ,  $a_u = \frac{8zeU}{mr_0^2\omega^2}$ ,  $q_u = \frac{4zeV}{mr_0^2\omega^2}$

Et  $u = x$  ou  $y$ , avec  $r_0$  le rayon du cercle entre les 4 barres,  $\omega$  la fréquence angulaire où  $\omega = 2\pi f$  avec  $f$  étant la fréquence du champ alternatif et  $m$  la masse de l'ion.

De ces équations il est possible de tirer une trajectoire des ions avec une composante circulaire sur l'axe du quadripôle de fréquence  $\omega$  et une composante continue axiale et radiale, dont l'amplitude radiale dépend des valeurs U et V. La valeur du rapport U/V à  $\omega$  constant permet de fixer la largeur de la fenêtre de  $m/z$  qui sera transmise. Un ion sera dit stable si l'amplitude radiale de sa trajectoire ne dépasse pas le diamètre de l'enceinte sur la distance parcourue pour la longueur totale du quadripôle. Pour stabiliser les ions il faut donc ajuster ce rapport U/V, en fonction du  $m/z$  à transmettre.

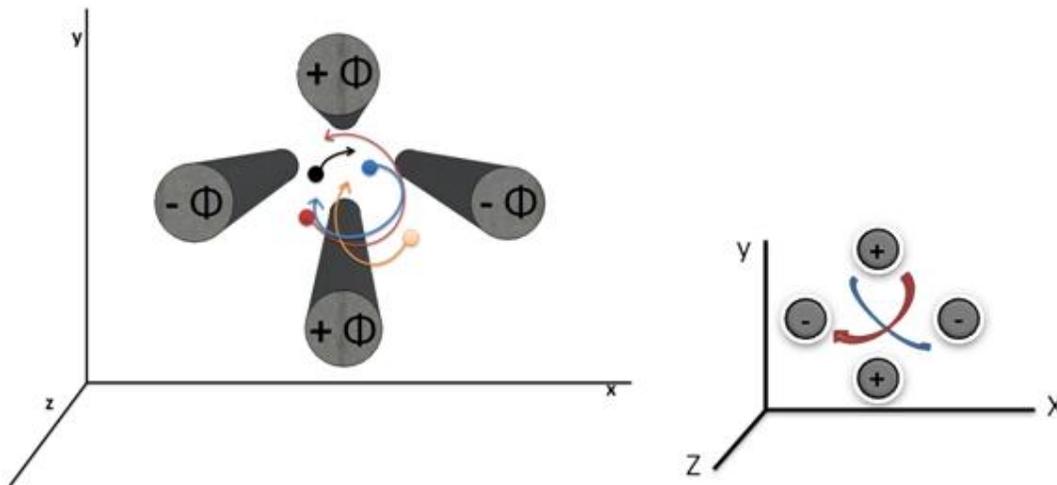


Figure 14: Principe de quadripôle avec le mouvement des ions au sein des quatre barres métalliques

Pour réaliser un balayage en  $m/z$  il faut donc réaliser un balayage de U et V à U/V et  $\omega$  constants.

### III.3.3.3 La trappe ionique linéaire

La trappe ionique linéaire ou trappe linéaire à deux dimensions fait partie de la nouvelle génération de pièges d'ions. Deux configurations commerciales existent et sont protégées par des brevets différents. Nous nous contenterons ici de décrire le système utilisé au cours de cette étude, qui possède un mode de détection radiale. La trappe ionique bidimensionnelle est composée de quatre barreaux parallèles à sections

hyperboliques segmentés en 3 tronçons. Les ions sont piégés par une combinaison d'un champ à deux dimensions quadripolaire radiofréquence RF et d'un champ non quadripolaire continu DC de manière analogue au fonctionnement d'un quadripôle.

Les spectromètres de masse FTICR et Orbitrap (cf. II.4.2 et II.4.3) sont équipés d'une trappe linéaire 2D (LTQ pour Linear Trap Quadrupole ou LIT pour Linear Ion Trap). Cette trappe ionique permet le piégeage des ions en direction axiale avec l'application d'une tension RF et en présence d'hélium. L'éjection des ions peut être réalisée radialement le long de l'axe x et y en modulant la tension RF ce qui permet la détection des ions avec la présence des deux détecteurs présents de part et d'autre du quadripôle. Une éjection axiale le long de l'axe z peut être également réalisée en modulant la tension continue sur les électrodes d'entrée et de sortie de la trappe. Cette éjection axiale a un intérêt particulier dans le couplage avec d'autres analyseurs (II.4.2 et II.4.3)

Les avantages de cet analyseur sont multiples, en effet une trappe ionique linéaire, comme les trappes tridimensionnelles, peut :

- Piéger un ion
- Mesurer les différentes masses des ions piégés
- Isoler un ion d'intérêt
- Fragmenter cet ion afin de réaliser la MS/MS

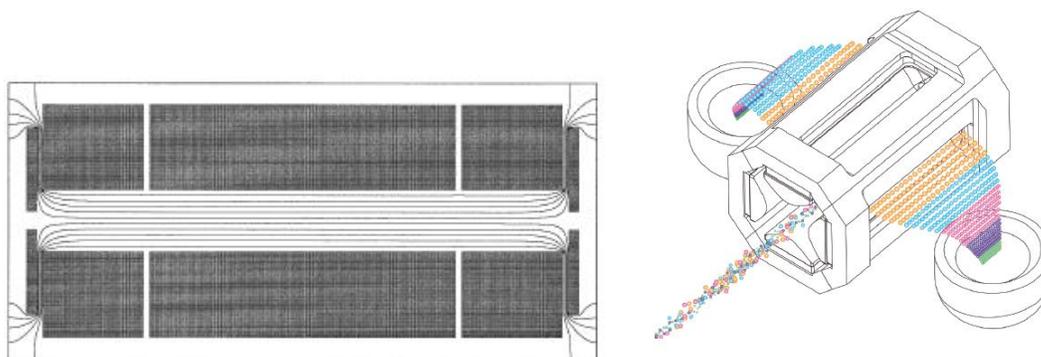


Figure 15: La trappe ionique linéaire avec les trois sections représentées (à gauche) (Schwartz and Senko 2002), modèle d'éjection axiale et radiale des ions avec la présence des deux détecteurs (à droite) (Thermo Fisher Scientific)

Les avantages de la trappe linéaire sont son efficacité de piégeage et sa sensibilité en modes MS et MS/MS, ainsi que sa capacité de piégeage.

En revanche la précision de cet analyseur reste du même ordre de grandeur que tous les analyseurs multipolaires de l'ordre de 1Da pour une gamme de masse continue classique 450-2000 Da.

Avec la multiplication des approches en protéomique, à la complexité des mélanges protéiques et au nombre croissant de modifications post-traductionnelles, la mesure de masse précise est rapidement devenue indispensable pour l'analyse protéomique. Des études ont pu montrer l'importance de l'exactitude de masse, en effet plus elle augmente et plus le nombre de peptides pouvant correspondre à la masse expérimentale diminue puisque la fenêtre de tolérance diminue. (Takach et al. 1997 ; Conrad et al. 2000). Il en est de même pour la fiabilité d'identification des peptides avec 99% de peptides exclus avec une précision de mesure de  $\pm 1$  ppm (Zubarev et al. 1996). L'ensemble de ces études a montré l'importance d'obtenir une bonne précision de mesure de masse pour éliminer le maximum de faux positifs.

C'est pour cela que le couplage d'instruments hybride permettant une mesure de masse précise (quelques ppm) en routine s'est démocratisé extrêmement rapidement depuis 2004.

### **III.3.3.4 L'analyseur à résonance cyclotron des ions à transformée de Fourier (FT-ICR)**

Le principe de cet analyseur repose sur le mouvement cyclotron, ce mouvement a été utilisé à la fin des années 40 avec l'introduction de l'oméga-tron, le premier spectromètre de masse à résonance cyclotron (Hipple et al. 1949). L'introduction de la transformée de Fourier dans le traitement du signal en 1974 (Comisarow and Marshall, 1974) a permis le développement de nombreuses applications.

L'analyse des ions au sein de cet analyseur est séparée en 3 phases :

- Le piégeage des ions
- L'excitation des ions
- La détection des ions

#### **III.3.3.4.1 Le piégeage des ions**

Dans le piège de Penning, les ions sont piégés grâce à l'action conjuguée d'un champ magnétique axial homogène B et d'un champ électrique quadripolaire statique E. Les pièges de Penning utilisent un champ magnétique homogène axial pour confiner les particules dans le plan médian, et un champ électrique quadripolaire pour les confiner selon l'axe de symétrie du piège.

Chaque champ possède un rôle précis, le champ magnétique effectué par un électro-aimant supraconducteur entraîne un mouvement en spirale des particules chargées alors que le champ électrique permet de stabiliser les particules afin qu'elles ne sortent pas du piège.

##### ***III.3.3.4.1.1 Mouvement des ions dans le piège***

Une fois piégées les ions subissent trois types d'oscillations :

- Une oscillation axiale
- Une oscillation cyclotron
- Une oscillation magnétron

Le piégeage des ions au sein de la cellule fait intervenir les trois mouvements (rotation cyclotron, rotation magnétron, oscillation de piégeage) de façon simultanée. Ce mouvement a été décrit par Marshall (Figure 19)

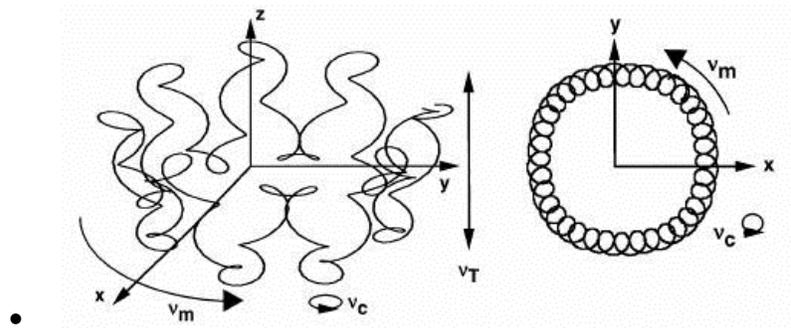


Figure 16: Les différentes trajectoires d'un ion dans un champ électromagnétique,  $v_T$  fréquence d'oscillation axiale,  $v_m$  fréquence d'oscillation magnétron,  $v_c$  fréquence d'oscillation cyclotron (Marshall et al. 1998)

En première approximation, il est possible de négliger l'oscillation magnétron, lorsque les ions ont des trajectoires cohérentes. L'oscillation axiale ne sera pas prise en compte dans la détection car elle se produit sur son axe de symétrie. Rappelons brièvement le principe régissant la résonance cyclotron.

#### **III.3.3.4.1.2 Rotation cyclotronique :**

Toute particule avec une charge non nulle et présente dans un champ magnétique  $B$  est soumise aux forces de Lorentz :

$$\mathbf{F} = q\mathbf{v} \wedge \mathbf{B} = m\mathbf{a} \quad \text{Équation 10}$$

Où  $m$  est la masse de l'ion,  $q$  sa charge,  $\mathbf{v}$  sa vitesse vectorielle et  $\mathbf{a}$  son accélération vectorielle. Cette force entraîne un mouvement cyclotron de très faible rayon  $r$  perpendiculaire à l'axe du champ  $B$ .

Ce rayon  $r$  est défini par la relation

$$r = \frac{mv_0}{qB_0} \quad \text{Équation 11}$$

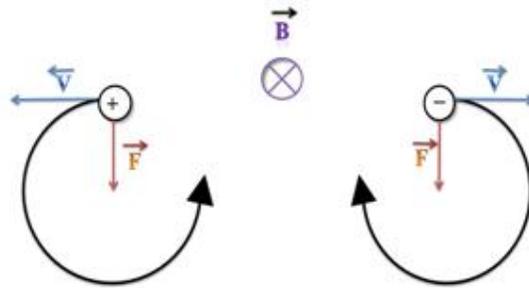


Figure 17: Illustration de la force de Lorentz ( $F = qv \wedge B$ ). Différence de rotation en fonction de la charge positive ou négative de l'ion dans un champ magnétique B (Marshall et al. 1998).

La fréquence cyclotron peut être définie en appliquant la deuxième loi de Newton :

$$qvB = \frac{mv^2}{r} \quad \text{ou} \quad \frac{v}{r} = \frac{qB}{m} \quad \text{Équation 12}$$

Où  $\frac{v}{r}$  représente la fréquence cyclotron.

La fréquence de rotation de l'ion sous l'action du champ magnétique est inversement proportionnelle à son rapport masse/charge et se définit comme suit :

$$\nu_c = \frac{eB_0}{2\pi m/z} \quad \text{Équation 13}$$

Avec  $\nu_c$  la fréquence en Hertz  $B_0$  le champ en Tesla,  $m$  la masse en kg,  $z$  le nombre de charge de l'ion et  $-e$  la charge de l'électron ( $e=1,602 \cdot 10^{-19}C$ ).

### III.3.3.4.2 L'excitation des ions

Le piège cyclotron est de géométrie cylindrique. Au sein du piège un ion possède sa propre fréquence cyclotron. Les ions seront détectés par enregistrement du courant image induit par leur mouvement dans le piège cyclotron. Pour détecter les ions il faut qu'ils aient une trajectoire cohérente de rayon maximal en passant au plus près des électrodes de détection positionnées de part et d'autre du piège avec une géométrie axiale. La détection des ions nécessite un balayage rapide de l'ensemble des fréquences afin que deux ions de même masse aient la même trajectoire. Ce balayage est ici réalisé en appliquant un signal qui est la combinaison de fréquence soit une tension continue.

Un ion entre en résonance lorsque la fréquence appliqué est égale à la fréquence cyclotron ( $\omega_c$ ). Cette entrée en résonance entraîne une augmentation de l'énergie cinétique donnée par l'équation :

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 = m.\omega^2.c.R^2$$

Équation 14

L'augmentation de l'énergie cinétique est traduite par une augmentation du rayon R donné par l'équation :

$$r = \frac{E_0 T}{2B_0}$$

Équation 15

Où  $E_0$  est l'amplitude du champ électrique appliqué, T la durée de l'excitation. Ce champ électrique est appliqué via les deux électrodes d'excitation positionnées en alternance avec les électrodes de détection selon l'axe du piège. De cette augmentation de l'énergie cinétique et du rayon découle la formation de la spirale d'Archimède (Figure 18)

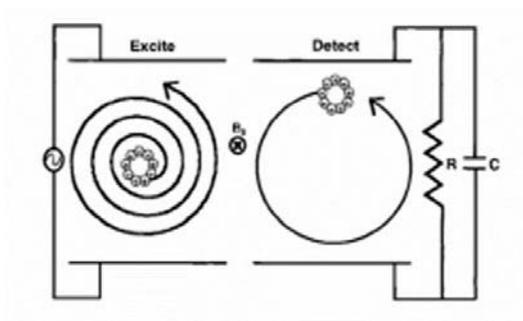


Figure 18: Trajectoires des ions au sein de l'analyseur cyclotron au moment de l'excitation. Le rayon de la trajectoire des ions augmente pour se rapprocher des électrodes de détection (Marshall et al. 1998)

Après cette phase d'excitation, l'ensemble des ions d'une même masse possèdent une trajectoire similaire, leur trajectoire et leur mouvement est cohérent : la détection peut être réalisée.

#### III.3.3.4.3 La détection des ions

La rotation cohérente des ions après excitation possèdent une trajectoire les amenant au niveau des plaques de détection. Cette rotation va induire un courant image. Ce courant prend la forme d'une sinusoïde de fréquence égale à leur fréquence de rotation  $\nu_c$ . La superposition des sinusoïdes de fréquences différentes provenant d'espèces de différent  $m/z$  résulte en un signal complexe, qui par définition peut se décomposer en une somme finie de sinusoïdes de fréquences distinctes et égales à la fréquence cyclotron de chaque  $m/z$  dans le piège, avec une intensité corrélée au nombre d'ions de chaque  $m/z$ . L'opération mathématique permettant de passer du domaine du temps (enregistrement du courant induit au cours du temps) au domaine des fréquences (décomposition du signal en une somme de signaux alternatif de fréquence différentes) est la transformée de Fourier.

C'est ce dernier traitement du signal qui a donné le nom générique de FTMS Spectrométrie de masse à transformée de Fourier, utilisé en commun pour les analyseurs FTICR et Orbitrap.

### III.3.3.5 L'Orbitrap

La trappe ionique électrostatique ou Orbitrap est un analyseur basée sur le concept du piège orbital décrit en 1923 (Kingdon et al. 1923) et remis à l'ordre du jour en 2000 par Alexander Makarov (Makarov et al. 2000). Commercialisé depuis 2005 il est devenu un analyseur de choix pour de nombreuses applications en protéomique. L'Orbitrap est composé de deux électrodes imbriquées, une électrode externe semblable de forme allongée et creuse et une électrode interne fuselée alignées selon le même l'axe (Figure 21)

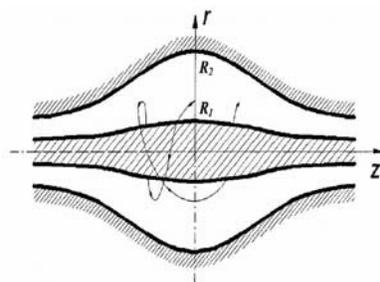


Figure 19 : Géométrie de l'Orbitrap (Makarov et al. 2000)

Les ions sont éjectés dans l'Orbitrap oscillent autour de l'électrode centrale sous l'influence d'un champ électrostatique axial et longitudinal avec une distribution de potentiel quadralogarithmique obtenue par la tension continue et la géométrie du piège.

L'équation du potentiel au sein de la trappe est la suivante :

$$U(r, z) = \frac{k}{2} \left( z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left( \frac{r}{R_m} \right) + C \quad \text{Équation 16}$$

Où  $k$  est la courbure du champ déterminé par la forme des électrodes et le potentiel appliqué,  $C$  une constante,  $R_m$  le rayon caractéristique et  $r$  et  $z$  les coordonnées cylindriques.

L'idée d'utiliser la trappe de Kingdon comme analyseur de masse avait déjà été décrite en 1995 (Oksman et al. 1995). La déviation du rapport  $m/z$  en utilisant la fréquence d'oscillation radiale ne permettait pas d'obtenir une bonne résolution de part la trop grande dépendance de la fréquence de rotation par rapport aux propriétés des ions. En revanche l'utilisation de la fréquence d'oscillation axiale décrite par Makarov qui est indépendante des propriétés des ions permet d'obtenir une très grande résolution.

La trajectoire des ions piégés dans la trappe correspond à une spirale complexe résultante de la combinaison des rotations autour de l'électrode centrale et de l'oscillation autour de l'axe. Trois fréquences peuvent être identifiées :

- la fréquence d'oscillation radiale  $\omega_r$ ,

$$\omega_r = \frac{\omega_z}{\sqrt{2}} \sqrt{\left(\frac{R_m}{R}\right)^2 - 2} \quad \text{Équation 17}$$

- la fréquence de rotation  $\omega_\varphi$

$$\omega_\varphi = \frac{\omega_z}{\sqrt{2}} \sqrt{\left(\frac{R_m}{R}\right)^2 - 1} \quad \text{Équation 18}$$

- fréquence d'oscillation axiale  $\omega_z$ .

$$\omega_z = \sqrt{k \frac{q}{m}} \quad \text{Équation 19}$$

La fréquence d'oscillation axiale est la seule fréquence utilisée avec l'analyseur Orbitrap car il s'agit de la seule fréquence n'étant pas dépendante des paramètres initiaux des ions. Cette oscillation est enregistrée grâce à deux électrodes de part et d'autre du piège orbitaire, et sur l'axe. Tout comme l'analyseur ICR, le courant induit par l'oscillation est soumis à la transformée de Fourier et permet d'obtenir les rapports m/z.

### III.4 Les couplages LC-MS

La spectrométrie de masse (MS) est certes une technique puissante capable de fournir des données essentielles sur une large gamme d'échantillons. Cependant à elle seule elle n'est pas capable de fournir les informations requises dans le cas d'échantillons complexes si elle n'est pas associée à une séparation préalable des composés.

Historiquement, de nombreuses études protéomiques nécessitant un fractionnement de l'échantillon reposent sur la 2DGE. Les spots contenant les protéines d'intérêt sont découpés ; les protéines sont soumises à une digestion protéolytique suivie d'une mesure de masse des peptides protéolytiques (en mode MS) ainsi qu'un séquençage de ces peptides par fragmentation (en mode MS/MS) pour identifier la protéine. Cependant cette approche souffre d'un certain nombre d'inconvénients dus à la matrice en gel :

- Les protéines de masses moléculaires extrêmes et de pI extrêmes sont sous représentées (problème de la gamme dynamique d'un gel).
- Les variations de charge et de taille de protéines dépendent de l'état de modification des protéines, ce qui peut poser des problèmes dans le cas d'une hétérogénéité moléculaire de la protéine

- Les protéines peuvent ne pas être détectées si elles sont trop faiblement abondantes ou si le rendement de coloration est mauvais
- La gamme dynamique des colorations de gel est limitée
- La 2DGE est longue à réaliser, et souffre de problèmes de reproductibilité
- Limitation des protéines membranaires dont la solubilisation nécessite la présence de détergents.

Les approches alternatives impliquent la LC-MS. Il faut citer la GeLC-MS/MS qui associe l'électrophorèse monodimensionnelle sur gel SDS-PAGE (Froehlich et al. 2003). Dans cette approche les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE, les bandes contenant plusieurs protéines sont découpées et les protéines protéolysées. Les mélanges de peptides protéolytiques sont ensuite analysés par  $\mu$ LC-MS/MS. Une autre approche est la technologie d'analyse multidimensionnelle MuDPIT (Multidimensional protein identification technology) (Washburn et al. 2001). Enfin le couplage simple  $\mu$ LC-MS/MS permet aussi dans certains cas de s'affranchir de l'étape de séparation des protéines sur gel.

### III.4.1 Couplage LC-ESI MS

Les séparations sur colonne capillaire ( $\mu$ LC) sont devenues une référence pour les applications en protéomique. Avec l'électrophorèse capillaire (CE) elles comptent parmi les outils les plus importants en sciences séparatives. Les couplages en ligne directs de type  $\mu$ LC-ESI-MS/MS sont très courants et ont fait l'objet de nombreuses revues (Gaspar et al. 2008; Staub et al. 2009). Les avantages de cette approche sont

- Une haute efficacité de séparation
- Des faibles limites de détection,
- Des quantités d'échantillon minimales
- Un coût de fonctionnement faible

Nous ne reviendrons pas ici en détail sur l'approche  $\mu$ LC que nous avons détaillée par ailleurs (voir Article en Annexe 3). Les conditions de séparation utilisées particulières à cette étude sont données dans la partie matériel et méthode.

L'interface avec la source nanoESI du spectromètre de masse est réalisée en connectant le capillaire de sortie de colonne en silice fondue de 20 $\mu$ m de diamètre interne via un adaptateur en Téflon à un émetteur en silice fondue de diamètre interne 20 $\mu$ m en entrée et de 2-3 $\mu$ m en sortie. Ce capillaire est métallisé sur toute sa longueur excepté 1 cm du côté source MS et une tension de 1,3V est appliquée à sa surface externe. Il est positionné à 2-3 mm en face de l'entrée du spectromètre de masse portée à quelques V et chauffée 275°C. La position exacte de l'aiguille est ajustée afin d'obtenir un spray stable. Cette position varie d'un électro-nébuliseur à l'autre. Le spray est dit fonctionner en mode Jet (Nemes et al. 2007).

La photographie ci-dessous illustre ce mode. Nous n'avons pas pu prendre une photo d'aussi bonne qualité au laboratoire mais cela correspond à notre observation expérimentale.

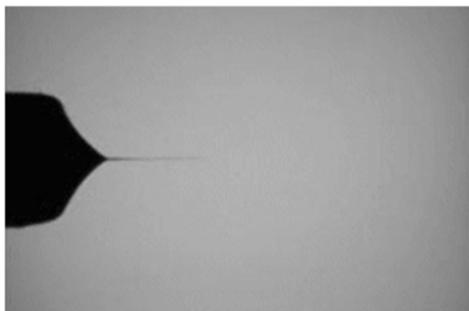


Figure 20: Photo du nanospray en mode Jet (Nemes, P, I Marginean, and A Vertes, Spraying Mode Effect on Droplet Formation and Ion Chemistry in Electrosprays. Analytical Chemistry, 2007. 79(8): p. 3105-3116.)

### III.4.2 Montage monodimensionnel

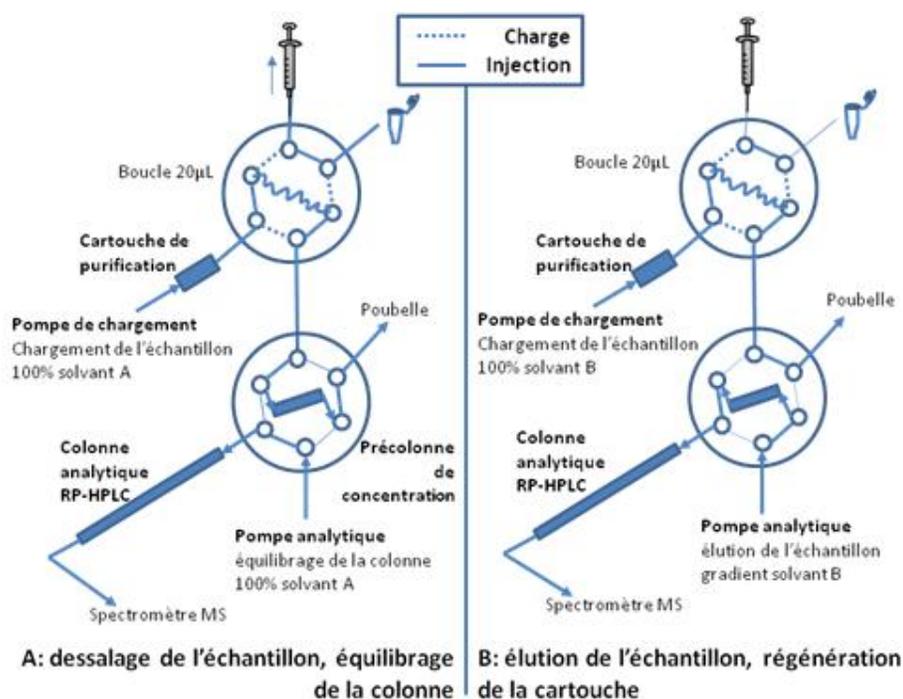


Figure 21: Schéma de principe du montage de LC MS monodimensionnelle (Annexe 3)

La Figure 21 présente le schéma de principe du montage utilisé au laboratoire pour les séparations monodimensionnelles. Le principe de ce montage a été bien détaillé par Hesse et al (Hesse et al. 2008). Brièvement, une cartouche de purification permet d'éliminer en amont du circuit les impuretés retenues par la phase stationnaire et contenues à l'état de trace dans les solvants. L'échantillon est injecté, concentré et dessalé sur la précolonne de concentration, puis est élué avec la pompe analytique de la précolonne vers la colonne analytique grâce à un gradient de solvant B (90 % Acétonitrile ; 10% H<sub>2</sub>O ; 0.1% Acide

formique) dans la phase liquide vers le spectromètre de masse. Pendant ce temps la cartouche de purification est nettoyée.

### III.4.3 Montage bidimensionnel

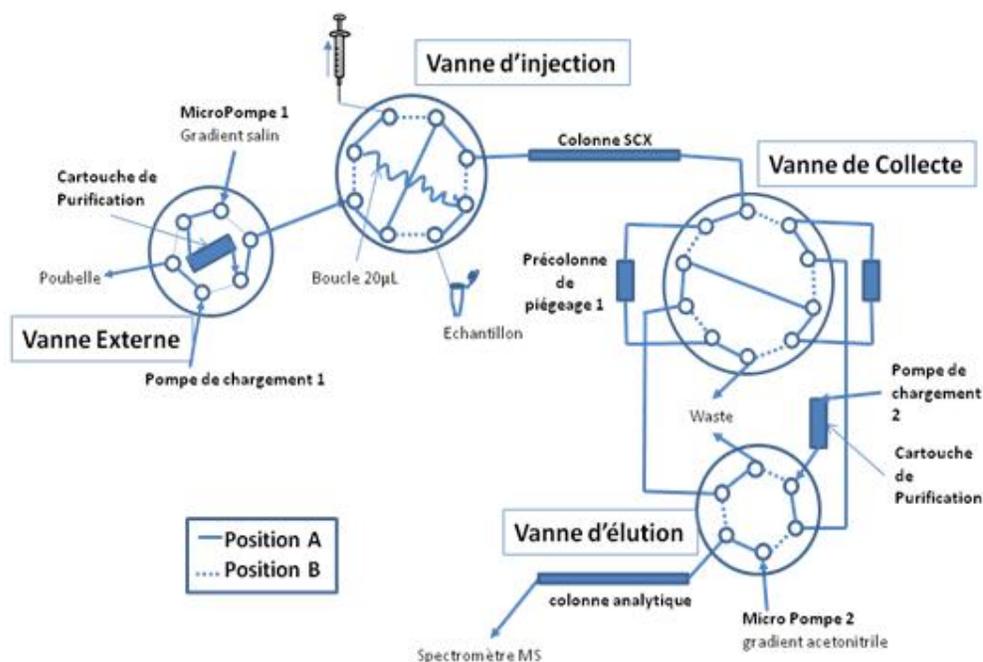


Figure 22: Schéma de principe du montage chromatographique bidimensionnel (Annexe 3)

La Figure 22 présente le schéma de principe du montage bidimensionnel « on-line », décrit en détail par Hesse et al (Annexe 3). Brièvement, deux cartouches de purification sont installées en tête de circuit pour chaque dimension pour piéger les impuretés des solvants. L'échantillon est injecté directement sur la colonne de première dimension (échangeuse de cations forts), puis élué avec un gradient de sels. L'éluât est fractionné par piégeage alterné sur les précolonnes 1 et 2, puis est élué sur la colonne analytique vers le spectromètre de masse avec un gradient de solvant B après dessalage/concentration sur les précolonnes.

Un autre mode de séparation bidimensionnelle peut être utilisé : Il s'agit cette fois de collecter en sortie de première dimension les fractions d'éluât dans une plaque multi-puits puis d'injecter les fractions dans le système de seconde dimension.

### III.4.4 La LC-MALDI MS

#### III.4.4.1 Interface LC-MS « on-line » vs. « off-line »

Pour réduire la complexité des échantillons, le couplage de la chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse (LC-MS), soit « online » soit « offline », est donc inévitable. On appelle « online » une interface qui ne dissocie pas dans le temps deux méthodes d'analyses couplées. Ces analyses sont réalisées séquentiellement sans rupture entre les deux. On appelle « offline » une interface qui dissocie dans le temps deux modes d'analyse en couplage. Les deux types d'analyses peuvent être effectués à des moments très distincts, et les temps de leur réalisation sont indépendants.

La LC-ESI a pendant longtemps été une méthode de choix en protéomique. De par la nature intrinsèque des séparations en phase liquide, l'ionisation en mode ESI permet une interface plus simple et directe en mode « on-line » que l'ionisation MALDI. Cette dernière nécessitant l'utilisation d'une matrice, elle rend délicate le couplage entre la chromatographie et l'ionisation MALDI. Toutefois l'ionisation MALDI présente de nombreux avantages comparés à l'ESI, et en particulier le temps disponible pour l'analyse en MS et en MS/MS qui est relativement court dans le cas de séparations à haute résolution. Dans ce cas pendant la durée d'une analyse MS/MS d'un composé donné il se peut que le composé soit totalement élué avant la fin de l'acquisition MS/MS. Dans le cas de mélanges complexes, certaines espèces co-éluées peuvent ne pas être sélectionnées faute de temps. Dans certains cas la séparation entière en LC-MS doit être répétée en employant des listes d'exclusion des précurseurs déjà fragmentés.

En général le mode de couplage le plus simple est le mode « offline ». Les deux techniques sont « découplées » et peuvent être optimisées séparément. Cette observation reste valable pour les couplages LC-MS comme pour les couplages LC-LC. Ce mode de collecte est d'ailleurs le mode historiquement utilisé pour les premières études associant LC et MS.

Le développement et l'intérêt de la LC MALDI offline sont apparus avec l'avancée technologique des spectromètres de masse équipés de source MALDI et notamment la possibilité de réaliser la spectrométrie de masse en tandem. Le MALDI est moins sensible aux contaminations dues aux additifs trouvés dans les solvants de séparation, comme le SDS ou certains sels. De plus le MALDI produit des espèces monochargées et les spectres de fragmentations sont plus simples que les spectres obtenus en mode ESI.

Les premières analyses en LC MALDI offline réalisées au milieu des années 90 consistaient à récupérer les différentes fractions chromatographiques dans plusieurs tubes afin de les analyser séparément en MS. Plusieurs groupes de recherche ont pu identifier plusieurs protéines issues de mélanges en procédant de cette manière. Cependant ce type de collecte ne permet pas d'obtenir un pouvoir de séparation performant une bonne répétabilité. Les volumes collectés sont de l'ordre du nL à quelques  $\mu$ L. De nombreuses méthodes ont été développées pour rendre ces deux techniques analytiques compatibles.

#### III.4.4.2 Le couplage LC MALDI en ligne

La notion de couplage LC MALDI en ligne nécessite que la séparation chromatographique des protéines ou des peptides d'intérêt soit directement introduite au sein du spectromètre de masse.

Afin d'obtenir un résultat similaire au couplage LC-ESI, plusieurs approches ont été développées pour l'introduction directe des matrices MALDI. Parmi ces approches on retrouve le couplage en ligne par flux continu et le couplage par aérosol.

Les premières expériences de LC MALDI en flux continu furent décrites en 1993. A cette époque la chromatographie liquide n'était pas encore utilisée pour réaliser ce couplage. Une simple seringue à laquelle était couplée une sonde contenant la matrice et l'analyte était utilisée. Cette sonde introduite directement dans le spectromètre de masse permettait d'analyser en sortie du capillaire la protéine ou le peptide d'intérêt. (Li et al. 1993). Avec cette méthode le groupe de Li a pu identifier la myoglobine avec des résultats similaires aux dépôts conventionnels sur plaque. Ce système peut être comparé à l'introduction directe réalisée en électrospray. Ce n'est qu'en 1995 que les premières expériences de couplage avec une véritable chromatographie liquide furent développées utilisant toujours la sonde pour l'injection de l'analyte mélangé à la matrice. (Nagra and Li 1995). Cette méthode a permis l'identification de 9 pmol de cytochrome extrait d'un cœur de cheval et de 8 pmol de lysozyme. Bien que ces quantités semblent importantes de nos jours il faut resituer les possibilités d'analyse de l'époque.

Le couplage en ligne en aérosol est le système se rapprochant le plus de l'ionisation en électrospray. En effet dans ce type de couplage le mélange analyte/matrice est introduit dans un capillaire chauffé à haute température ce qui permet de créer un aérosol contenant les ions d'intérêt. Les différents ions en sortie de capillaire sont ensuite irradiés avec un laser pulsé comme toute analyse en ionisation MALDI. En 1994, le groupe de Murray présenta un système couplé à un système chromatographique conventionnel comprenant une colonne de séparation de type C18. Ce montage permit la séparation et l'analyse d'un mélange comprenant plusieurs protéines telles que la bradykinine, la gramicidine, et la myoglobine à des quantités comprises entre 12 et 94 nmol. (Murray et al.1994). Ces travaux ont par la suite inspirés différentes équipes de recherche qui ont à leur tour proposé des interfaces en ligne permettant d'augmenter la résolution d'analyse en spectrométrie de masse sans altérer la qualité de la séparation chromatographique. (Zhan et al. 1999)

Pour simplifier le couplage entre l'ionisation MALDI et la chromatographie et la rendre compatible avec les spectromètres équipés d'une source MALDI de nombreux groupes ont développé des approches permettant ce type d'étude. Il s'agit de la LC MALDI « off line ».

### III.4.4.3 La LC MALDI « off-line »

Contrairement à la LC MALDI « on line », la LC MALDI « off line » implique un délai entre la séparation chromatographique et l'analyse en spectrométrie de masse. En effet les différentes fractions sont collectées avant analyse MS.

Au début des années 2000 l'automatisation des collectes de fractions chromatographiques directement sur les plaques MALDI a considérablement changé les perspectives d'applications de la LC- MALDI « offline ». La collecte à intervalles réguliers de volumes de l'ordre de quelques nL permet de limiter la perte de résolution de la séparation. Ainsi les peptides sont séparés dans des fractions de volume restreint ce qui diminue les problèmes de dilution. De plus les fractions sont moins complexes ce qui limite les phénomènes de suppression spectrale. Enfin moins d'espèces sont présentes dans chaque dépôt et moins de précurseurs sont donc sélectionnés par spot. Il est possible de réaliser plus de 20 analyses MS/MS par spot (3000 tirs laser/MSMS et volume de spot de 20 nL). La conséquence en protéomique est une augmentation sensible du nombre de peptides séquencés et du nombre de protéines identifiées avec une meilleure couverture de séquence. Ainsi les développements réalisés permettent d'avoir des résultats aussi performants en LC-MALDI qu'en LC-ESI désormais. Nous pouvons citer les recherches de Bodnar qui traita de la complémentarité entre les approches LC-MALDI et LC-ESI. (Bodnar et al. 2003).

Cette notion de complémentarité des deux modes d'ionisation permis à la LC MALDI de devenir une technique alternative à la LC-ESI pour de nombreuses applications, notamment pour rechercher des espèces moins bien ionisées en ESI.

Cependant la qualité des résultats dépend comme pour toutes les analyses en mode MALDI de la qualité de la préparation des dépôts d'échantillon, et les paramètres à ajuster finement sont nombreux. Citons ici le débit de l'éluât, le débit de matrice, la fréquence de collecte, la nature de la surface de collecte, la tension surfacique et le système de solvants, le contrôle de la température et de l'humidité environnante...

#### III.4.4.3.1 L'interface logique de la LC MALDI

La configuration off line de la LC-MALDI permet de réaliser un arrêt dans le temps de la séparation chromatographique. Elle est devenue une approche très puissante en protéomique (Mirgorodskaya et al. 2005). Contrairement aux couplages en ligne qui nécessitent une décision instantanée pour la sélection des précurseurs, il est possible de rechercher l'apex des pics chromatographique avec un rapport Signal/Bruit optimal pour réaliser les fragmentations en mode MS/MS. De plus l'analyse des spots collectés se fait dans un ordre arbitraire et il est notamment possible d'analyser plusieurs fois le même spot. Cet avantage a permis le développement d'analyses utilisant la chromatographie multidimensionnelle (Zhen et al. 2004) associé à des programmes bioinformatiques permettant une sélection précise des précurseurs sans redondance entre fractions. (Gandhi et al. 2010). En effet un des problèmes de la chromatographie bidimensionnelle en phase liquide off line est la présence de peptides identiques ou de masse très proches

dans différentes fractions. Une exclusion dynamique des peptides existe déjà pour des masses retrouvées à deux spots d'écart. Cette exclusion dynamique ne s'applique pas lorsque cette séparation de deux spots est dépassée ; cela signifie qu'un ion retrouvé dans différentes fractions sera fragmenté plusieurs fois. Les logiciels cités ci-dessus permettent de discriminer ce genre de peptides et de fragmenter l'espèce la plus intense afin d'obtenir le meilleur spectre MS/MS possible.

Ainsi l'approche « offline » permet dans ce cas d'augmenter le débit et de diminuer le temps machine nécessaire pour une analyse. Dans les méthodes « online » la durée de l'analyse MS est donnée par la durée de séparation chromatographique. Dans les méthodes « off-line », les séparations peuvent durer des heures aussi, mais la même séparation peut-être analysée plusieurs fois de façon répétitive avec des paramètres d'analyse différents en spectrométrie de masse.

Il faut alors tenir compte du débit analytique intrinsèque du spectromètre de masse. Le débit d'un MALDI TOF est en première approximation et jusqu'à une limite électronique (environ 10kHz) directement proportionnel à la vitesse d'acquisition des spectres individuels. Cette vitesse est elle-même proportionnelle à la fréquence du laser mis en œuvre. (Moskovets et al. 2006). Les dernières études mettent en œuvre des lasers UV à cartouche solide travaillant à des fréquences entre 100 et 5000 Hz, et compatibles avec l'ionisation MALDI (Vestal et al. 2009). Ceci devrait diminuer de façon très significative les temps d'analyse en MALDI MS. Actuellement certains appareils commerciaux travaillent avec des lasers UV à 1kHz.

#### **III.4.4.3.2 L'interface technique de la LC-MALDI**

Bien que le couplage « offline » de la LC-MALDI puisse être simplement réalisé de façon manuelle par collecte et dépôt des échantillons, cette approche est fastidieuse et augmente le risque d'erreur et de perte d'échantillon (Griffin et al. 2001). De plus la reproductibilité de la fréquence de collecte est très faible. Une revue récente a traité des interfaces potentielles (Pes et al. 2010).

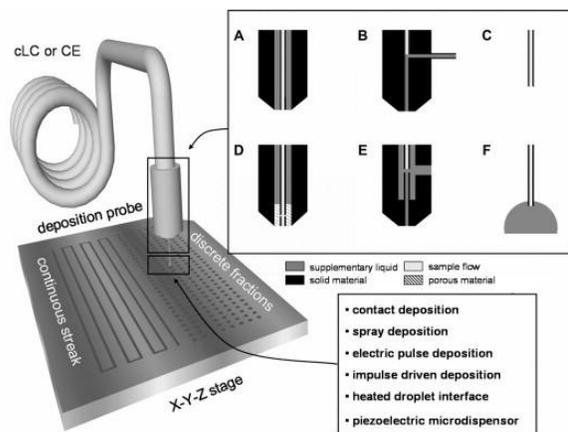


Figure 23: Schéma de couplage "off-line" illustrant l'ajout de liquide supplémentaire, et le mécanisme de dépôt.

Les jonctions utilisées pour les techniques séparatives en  $\mu$ LC incluent (A) le flux co-axial du liquide supplémentaire autour de l'éluât, (B) la jonction en T, (C) le dépôt direct. Les jonctions utilisées pour le couplage en CE (capillary electrophoresis) incluent (D) la jonction poreuse, (E) la jonction liquide, (F) le couplage électrique par contact de goutte. (Pes, Preisler, J Chromatography A 2010 1217 :3966-3977)

Dans le cadre de ce travail nous avons privilégié le montage B, qui permettait un meilleur mélange de l'échantillon avec la matrice.

De la même façon les modes de dépôts sont variés mais nous avons privilégié le plus simple particulièrement bien adapté à notre gamme de débit (200-300 nL/min) pour le couplage  $\mu$ LC, c'est-à-dire le dépôt par contact. Les autres modes de dépôt sont listés sur la Figure 23.

Ce mode dépose par contact la goutte qui s'est formée à l'extrémité du capillaire. Un des principaux inconvénients de cette méthode est l'effet mémoire résultant d'un dépôt imparfait et de trace résiduelle sur les parois externes du capillaire de dépôt.

L'ajout de la matrice en sortie de séparation a un effet de dilution. Cette augmentation de volume va donc être préjudiciable à la limite de détection de l'analyse, mais va aussi avoir une influence sur la taille des dépôts et donc sur la surface utile d'une plaque MALDI pour collecter une séparation LC. Une solution proposée est de travailler sur des supports pré-structurés et recouverts de matériaux hydrophobes afin de limiter l'étalement des dépôts en maîtrisant leur position très précisément en ajoutant des ancrs hydrophiles (Johnson et al. 2001). Ce système breveté a été installé exclusivement sur les appareils commercialisés par le fabricant Bruker.

Plus récemment, en 2008 Hattan et al ont travaillé sur des plaques structurées avec des micro-puits emplies de phase monolithique. L'idée est ici d'augmenter la capacité de rétention de la surface et de proposer une méthode de concentration in-situ. Cette surface a permis d'augmenter d'un facteur 30 la concentration surfacique d'échantillon dans les cristaux de matrice en comparaison avec les surfaces en inox classique (Hattan et al. 2008)

### III.4.4.3.3 La LC MALDI et la quantification

Jusqu'à très récemment le spectromètre le plus largement utilisé était le TOF/TOF de part sa complémentarité directe avec l'ionisation MALDI. Ce type de spectromètre comme décrit précédemment possède une gamme de masse très étendue et sans limitations théorique en basse masse en MS/MS. Ceci le rend compatible avec des applications de quantifications comme l'iTRAQ qui implique la détection des ions rapporteurs de masse 114 à 117 Da pour réaliser une quantification relative. (Ruppen et al. 2010 ; Tan et al. 2011).

La technologie label free qui correspond à une quantification des peptides et des protéines sans marquage a également été étudiée en LC MALDI (Neubert et al. 2008). De nombreuses études présentant des thématiques biologiques diverses ont utilisé cette méthode de quantification pour répondre à certaines problématiques (Rocchiccioli et al. 2010 ; Toyama et al. 2011). Cette méthodologie assez efficace présente toutefois certains inconvénients qui peuvent perturber l'analyse label free. En effet cette méthode basée principalement sur l'intensité des signaux MS nécessite des dépôts MALDI très réguliers. L'aire des pics va être reconstituée sur plusieurs fractions. Il faut donc que la fréquence d'échantillonnage ne soit pas trop délétère pour la résolution pour obtenir une analyse la plus répétable possible, de plus certains pics de matrice peuvent avoir un effet supprimeur sur l'ensemble des ions analysés.

A cela nous pouvons également ajouter les difficultés de retraitement des données comprenant l'alignement des spectres, la normalisation et l'identification des peptides et des protéines quantifiées.

## III.5 Les configurations de spectrométrie de masse tandem

### III.5.1 MALDI TOF/TOF

#### III.5.1.1 Évolution de la configuration

A la fin des années 80, la découverte de méthodes d'ionisation douces a ouvert la possibilité d'analyser des biopolymères qui sont sous forme libre polaires et labiles, et de caractériser leurs produits de dégradation par spectrométrie de masse. Ces processus d'ionisation douce apportent très peu d'énergie interne pendant la production des ions et favorisent la production d'ions pseudo moléculaires sous la forme d'adduits de protons mono ou multichargés. Au cours de l'ionisation, cependant, diverses décompositions ou fragmentations des ions précurseurs peuvent se produire, et doivent être minimisées car elles ne sont pas maîtrisées. A contrario ces phénomènes peuvent être exploités pour la caractérisation structurale d'une séquence peptidique complète. Pour cela les ions moléculaires sont activés par apport d'énergie vibrationnelle afin d'induire la rupture unimoléculaire de certaines liaisons. Une revue très complète sur les aspects instrumentaux des spectromètres de type MALDI TOF a été rédigée par Vestal (Vestal ML Journal of Mass spectrometry, 2009 44 303-317).

Les matrices MALDI dites « chaudes » apportent plus d'énergie interne. La décomposition unimoléculaire qui résulte de cet excès d'énergie est une décomposition d'ions métastables appelée Post Source Decay (PSD), et dépend de la nature physicochimique des ions. Dans le cas de peptides la régularité des spectres PSD va dépendre de la séquence peptidique et de la composition en acides aminés. Généralement les spectres PSD ne donnent qu'une information partielle de séquence. Les matrices MALDI dites « froides » permettent aussi d'avoir des informations de séquence et ce séquençage peut être relativement complet lorsque les ions sont activés à haute énergie comme dans le cas des appareils à secteurs (Medzihradsky et al. 1996). De plus si on introduit de l'air en sortie de source MALDI, la fragmentation de type PSD obtenue en spectrométrie de masse à temps de vol TOF produit des ions fragments de la chaîne peptidique et des ions immoniums plus intenses, même avec des matrices « froides » (Stimson IJMSIP 1997 169/170 :231-240).

Les analyseurs TOF sont en général optimisés pour la transmission des ions de hautes énergies cinétique (20 keV). Les collisions d'ions de 1keV ou plus vont fournir des fragments de haute énergie. C'est pour cela que les TOF sont souvent employés dans les configurations hybrides avec des secteurs (Strobel et al. 1992) ou dans des combinaisons tandem de type TOF/TOF. Diverses configurations ont été proposées. Citons par exemple la configuration avec deux TOF orthogonaux proposée par Schey (Schey IJMSIP 1989, 94, 1) mais dont la résolution était faible. Une autre configuration associait un tandem TOFTOF avec une cellule de collision et équipé d'un miroir électrostatique à champ non linéaire qui permettait de focaliser sur le détecteur tous les ions issus de dégradations métastables en mode PSD d'énergie cinétique différente avec une unique valeur de tension appliquée sur le réflectron (Coredero et al. 1995). Dans le cadre de ce travail nous avons utilisé un appareil tandem TOFTOF dérivé du schéma de principe initialement décrit par les groupes de Burlingame et Vestal (Medzihradzky et al. 2000) dont la représentation est donné en Figure 24. Cette configuration permet de sélectionner plus rigoureusement et avec une meilleure précision les ions précurseurs, en comparaison avec les analyses PSD. De même l'activation des ions par collision et la détection des fragments issus de cette activation sont réalisés dans un TOF avec une unique valeur de tension appliquée sur le miroir réflecteur.

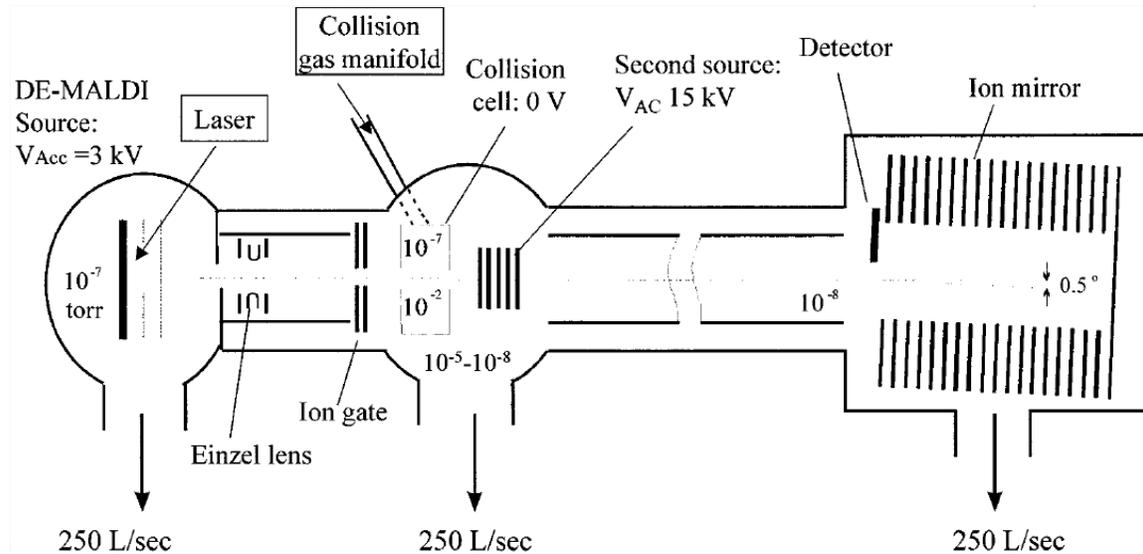


Figure 24: MALDI TOF/TOF (hors échelle).

La pression dans la cellule de collision n'est pas mesurée directement mais est supposée augmenter à partir d'une valeur de base d'environ  $10^{-7}$  Torr en absence de gaz jusqu'à  $10^{-2}$  Torr en présence de gaz.

Le spectromètre utilisé dérive de la configuration présentée dans la figure ci-dessus. La distance de vol en mode linéaire est de 150 cm entre la plaque cible de la source et le détecteur. La distance de vol entre la cible et détecteur réflectron en mode réflectron est de 300 cm. La distance de vol pour l'analyse des ions fragments entre la cellule de collision et le détecteur réflectron est de 240 cm. L'appareil comporte deux zones d'accélération, la première en trois étages, la seconde en deux. Le laser pulsé utilisé pour l'ionisation MALDI est un Nd-YAG travaillant dans l'UV à 355 nm, avec une fréquence de 200 Hz et une largeur d'impulsion de 3 ns au moins. Trois pompes turbomoléculaires permettent d'obtenir les  $10^{-9}$  Torr nécessaire pour garantir un libre parcours moyen suffisant pour que les ions traversent le tube de vol.

### III.5.1.2 Fonctionnement en mode TOF/TOF MS/MS

Si l'appareil peut fonctionner en mode MALDI TOF classique, dans son mode TOF/TOF, il faut distinguer quatre zones principales dans cet instrument selon leur fonctionnalité :

- Source 1
- Sélection des ions
- Zone de collision et source 2
- Détection des fragments

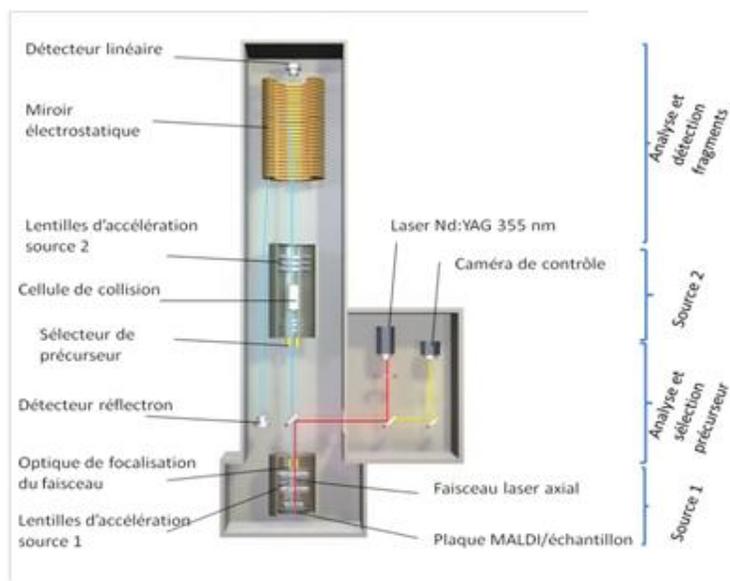


Figure 25: Schéma de principe du spectromètre MALDI TOF/TOF utilisé dans cette étude

(Dessin du 4800 TOFTOF d'après le fournisseur AbSciex)

La zone “source 1” est une région sous haute tension qui permet d’accélérer les ions, puis de focaliser et de diriger le faisceau d’ions. Après l’impact laser, la plaque cible MALDI portant l’échantillon est portée à un potentiel d’accélération compris entre 0 et 25,000 V après un délai défini (delayed extraction time). Les ions sont accélérés. Une tension variable et une connexion à la terre permettent d’obtenir un gradient de potentiel pour focaliser en vitesse les ions et améliorer la résolution. L’optique ionique de la source

- Focalise le faisceau d’ions vers le tube de vol.
- Affine et dirige le faisceau d’ions en corrigeant les trajectoires en x et y orthogonales à l’axe du tube de vol.

Enfin la zone de la Source 1 est maintenue à environ 50 °C pour minimiser l’accumulation de matrice et limiter le nettoyage. La spécificité de la source est de fournir un faisceau laser pulsé orthogonal afin d’optimiser le processus MALDI en se rapprochant de la configuration idéale pour la distribution des ions dans le volume d’accélération. Comme illustré sur la Figure suivante, un faisceau axial permet d’optimiser la distribution spatiale des ions en entrée de tube de vol.

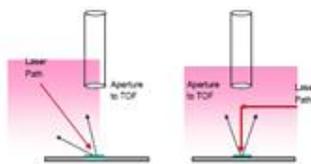


Figure 26: Comparaison des configurations avec impact laser non axial (à gauche) et axial (à droite)

Le premier analyseur est utilisé pour la sélection d’ions. Il est composé d’un TOF relativement court (environ 40 cm) délimité entre la zone d’accélération source 1 et le sélecteur d’ion précurseur pour la MS/MS (Time ion selector TIS). La tension d’accélération et le délai d’extraction sont ajustés de telle sorte

que le faisceau d'ions soit focalisé précisément dans la zone du TIS (Time Ion Selector), afin de ne pas perdre en résolution de sélection par dispersion du faisceau. Le TIS est constitué de deux lentilles de déflexion, une première lentille agissant comme filtre des basses masses par défaut fermé et une seconde lentille agissant comme filtre en hautes masses par défaut ouvert. Au temps d'arrivée estimé en entrée de la première lentille elle s'ouvre pour les laisser les ions de  $m/z$  égal ou supérieurs au  $m/z$  d'intérêt, et au temps d'arrivée de l'ion à la seconde lentille elle se ferme pour bloquer les ions de  $m/z$  supérieurs au  $m/z$  d'intérêt. Avec un tel système il est possible d'atteindre une résolution de TIS de 400 (Vestal 1998).

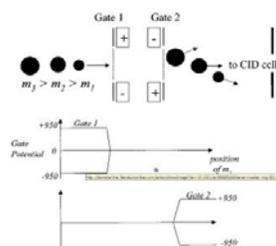


Figure 27: Schéma de principe du sélecteur de précurseur (Time Ion Selector TIS) d'après (Medzihradszky, Anal chem 2000 72 :552).

Sur ce schéma sont indiquées la déflexion des ions légers ( $m_1$ ) en lentille 1 (Gate 1) et la déflexion des ions lourds ( $m_3$ ) en lentille 2 (Gate 2). Seuls les ions de masse intermédiaire  $m_2$  peuvent passer à travers cet ensemble pour atteindre la cellule de collision. Chaque « porte » est ouverte quand les deux électrodes sont à la masse, et est fermée lorsqu'elle est portée à une tension de 950V.

La troisième zone est la cellule de collision et l'optique de transfert entre les deux TOF « Source 2 ». Afin d'éliminer totalement les ions défléchis par le TIS, la zone de décélération est positionnée environ à 8 cm. Avant d'entrer dans la cellule de collision (avec ou sans gaz de collision), les ions sont décélérés et refocalisés. Ils sont fragmentés dans la cellule puis accélérés de nouveau à 15 kV. Seuls les ions dans la zone sous impulsion au moment de l'accélération vont être analysés dans la suite, ce qui permet de déterminer une position et un temps initial pour la mesure du temps de vol. Les fragments formés dans la cellule de collision ont la même vitesse et un temps de vol dans la source 2 identique au précurseur associé, ils seront donc accélérés de façon similaire vers le miroir électrostatique. L'énergie totale de l'ion précurseur non fragmenté est la somme des énergies apportées par les deux sources. Afin d'obtenir une fragmentation informative pour le séquençage des peptides, la pression en mode PSD en de l'ordre de  $10^{-7}$  Torr, et en mode CID elle augmente vers  $10^{-6}$  Torr. Nous avons travaillé avec l'air comme gaz de collision.

La dernière zone est l'analyseur et le détecteur des ions fragments. Connaissant l'énergie des ions fragments grâce aux paramètres de source, il est possible d'ajuster la tension du miroir électrostatique afin de refocaliser nos fragments sur le détecteur réflectron. Cette dernière est ajustée pour pouvoir détecter simultanément tous les ions d'une même fragmentation, contrairement au mode PSD, où de multiples tensions doivent être ajustées pour focaliser les ions de chaque gamme de masse successivement. En routine, la résolution obtenue sur les précurseurs est de 10000, sur la sélection des précurseurs elle est de 50, et sur les fragments elle est environ de 4000, pour une précision au laboratoire et en étalonnage

externe d'environ 50 ppm sur la plaque en couplage en chromatographie. Ceci est à comparer avec les dernières performances (qui bien sûr ne sont pas des valeurs de routine) rapportées par Vestal (Vestal et al. 2009) : résolution sur les précurseurs >30000, erreur de masse < 2ppm sur la plaque. Ces écarts sont dus au caractère non idéal de la plaque (déformation à l'usage, effet de bord), et à un choix de sensibilité maximale notamment.

### III.5.1.3 Application au séquençage des peptides

Les spectres TOF/TOF MS/MS donnent des résultats de couverture de séquence bien meilleurs que les résultats en PSD (Medzihradszky et al. 2000). L'avantage principal est bien sûr d'obtenir le spectre de fragmentation en une seule étape, avec une unique valeur de gradient de potentiel appliquée sur le réflectron. La fragmentation peut être optimisée en utilisant divers gaz de collision ou en modifiant la matrice utilisée pour la préparation de l'échantillon. La composition en acides aminés influence le profil de fragmentation. Les matrices froides vont limiter les décompositions en source. La taille des peptides est aussi très importante, et pour des peptides de  $m/z > 1000$  Da l'utilisation de matrice « chaude » comme l'acide alpha cyano hydroxy cinnamique peut s'avérer indispensable, comme nous l'avons observé dans cette étude.

## III.5.2 Les hybrides LIT-FTMS

### III.5.2.1 LIT-FTICR

Les différentes avancées technologiques en instrumentation ont permis ces dernières années le développement de spectromètres de masse hybrides à haute résolution et de haute précision. Le LIT-FTICR qui est un appareil de la gamme des spectromètres de masse hybride FTMS a la particularité de posséder deux analyseurs, une trappe linéaire et une cellule ICR.

L'utilisation d'une trappe ionique linéaire en amont de la cellule ICR permet d'améliorer les performances de l'appareil. En effet l'apport de la trappe linéaire permet de réduire les temps d'analyse ainsi que la durée du cycle MS et MS/MS. L'intérêt majeur de ce type de spectromètre hybride réside dans la possibilité de réaliser en parallèle une analyse MS à haute résolution et précision dans la cellule ICR et une analyse MS/MS indépendante dans la trappe linéaire. (Senko MW, Schwartz JC, Schoen AE, Syka 2000). L'utilisation des deux analyseurs en tandem nécessite quelques optimisations techniques. La configuration de ce spectromètre de masse est présenté sur la Figure 28 et comprend plusieurs zones.

Trois éléments caractérisent le LIT-FTICR :

- La trappe linéaire
- Le système de transmission des ions
- La cellule ICR

### III.5.2.1.1 La trappe linéaire ou système LTQ

La trappe linéaire présente dans le système LIT-FTICR, dont le fonctionnement a été décrit précédemment, est spécialement conçue pour le couplage avec l'analyseur ICR. Elle est précédée de 3 guides d'ions permettant l'arrivée des ions depuis la source.

Le premier guide d'ions est composé d'un quadripôle et d'une première lentille. Il s'agit du guide d'ions le plus proche de la source, une tension RF est appliquée donnant un champ électrique, ce champ permet de guider les ions dans l'axe du quadripôle vers la lentille. La lentille en métal est soumise à un potentiel de  $\pm 5$  V et permet également la focalisation des ions vers le deuxième guide d'ions.

Le deuxième guide d'ions possède des caractéristiques similaires au premier guide. Il s'agit d'un quadripôle tout comme le premier sur lequel est appliquée une tension RF permettant le passage des ions dans l'axe du quadripôle et vers la seconde lentille. Cependant le potentiel doit obligatoirement avoir une valeur inférieure à celle du premier guide d'ion pour éviter la perte des ions.

Avant leur entrée dans la trappe linéaire les ions sont dirigés vers le troisième guide d'ions qui est un octapôle toujours sous l'action d'une tension RF, les différents ions passent dans l'axe de l'octopôle pour se diriger vers la troisième lentille qui a pour rôle de réguler l'injection des ions vers la trappe linéaire.

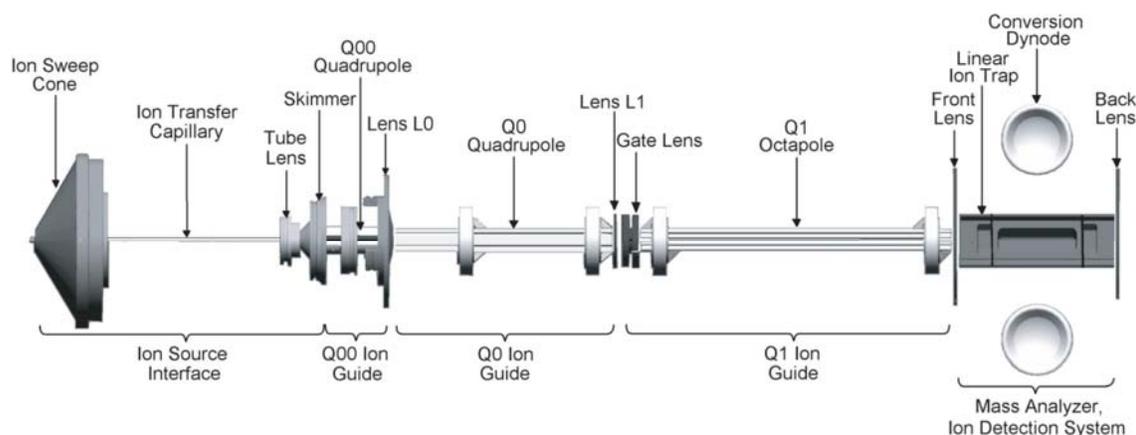


Figure 28 : Représentation du système LTQ avec les 3 guides d'ions et la trappe ionique linéaire (Thermo Fisher Scientific)

### III.5.2.1.2 Le système de transmission des ions.

Les différents guides d'ions décrits dans la partie LTQ font partie intégrante du système de transmission des ions cependant nous avons volontairement voulu séparer le système de guide d'ions du LTQ et de la cellule ICR. Une série d'octopoles permet de faire le lien entre la trappe linéaire et la cellule ICR. Cet octopôle d'une longueur suffisante pour faire entrer la cellule ICR au sein de l'aimant est indispensable pour éviter toute perte d'ions lors du transfert de la trappe vers la cellule.

Au total une distance de 80 cm est parcourue par les ions. Ceci doit être pris en compte car les ions sont en fait séparés dans ce transfert par un effet temps de vol qui n'est pas négligeable et qui peut discriminer la détection des ions en fonction de leur valeur de  $m/z$ . pour pallier à ce problème nous nous limitons à des gammes de masse d'une décade.

Afin d'éviter tout effet de charge spatiale par un remplissage trop important des pièges (trappe linéaire et piège cyclotron), les ions sont comptés suite à une injection rapide extemporanée d'une fraction de l'échantillon afin d'évaluer le temps de remplissage nécessaire pour obtenir la valeur cible de remplissage optimale. Cette valeur est déterminée par l'opérateur en fonction du type d'analyse souhaitée.

Parmi les paramètres importants de ce type d'analyse, le temps de remplissage est loin d'être négligeable car il peut être du même ordre de grandeur que le temps de détection et d'enregistrement lui-même (500ms à 1s).

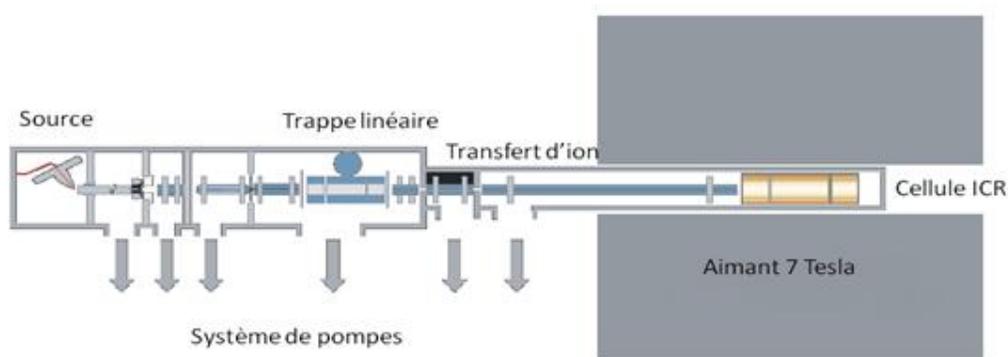


Figure 29: Système hybride LIT-FTICR (Thermo Fisher Scientific)

### III.5.2.2 Les hybrides LIT-Orbitrap

Le système LIT-Orbitrap est un autre appareil hybride de type FTMS commercialisé après le système LIT-FTICR. La configuration de ce système est très proche du système LIT-FTICR.

Ce système comprend une trappe linéaire, un octopôle, une C-trap et l'Orbitrap. Le mouvement des ions de la source vers la trappe linéaire est identique à celui retrouvé sur le système LIT-FTICR. En sortie de la trappe les ions sont guidés par un octopôle de 30 cm vers un quadripôle incurvé nommé C-trap. Ce quadripôle incurvé dont l'axe central est un arc de cercle en forme de C, possède des barres hyperboliques entourées de deux lentilles avec des orifices sur chacune d'elles permettant le transport des ions vers l'Orbitrap. La C-trap joue un rôle important dans les performances du LIT-Orbitrap ; en effet en l'absence d'une C-trap les ions seraient éjectés vers l'Orbitrap axialement ce qui réduit considérablement la stabilité des ions ainsi que ces performances. L'utilisation de la C-trap permet de concentrer les ions, de les focaliser et de réaliser une éjection radiale dans l'Orbitrap ce qui a pour but de garantir une meilleure

stabilité. Cet appareil hybride est commercialisé en deux versions l'une possédant une source ESI (Figure 30), la seconde possédant une source MALDI (Figure 31). La source MALDI présente sur cet appareil est une source MALDI sous vide équipée d'un laser de 60 Hz.

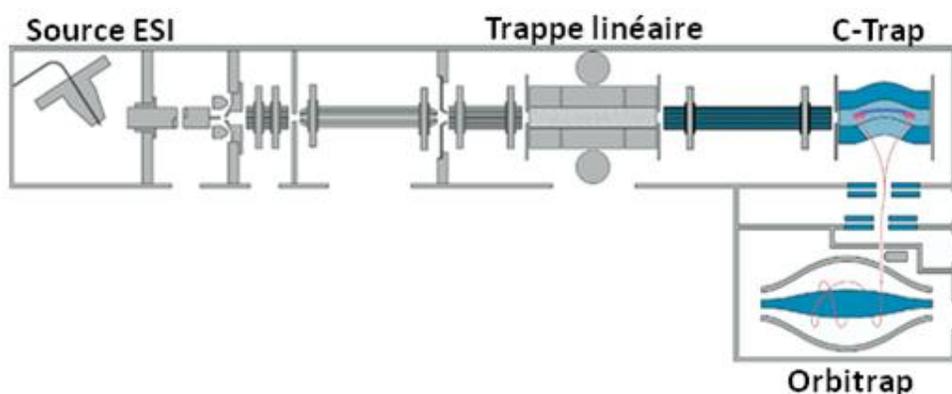


Figure 30: Configuration commerciale du système LIT-Orbitrap avec une source électrospray (Thermo Fisher Scientific)

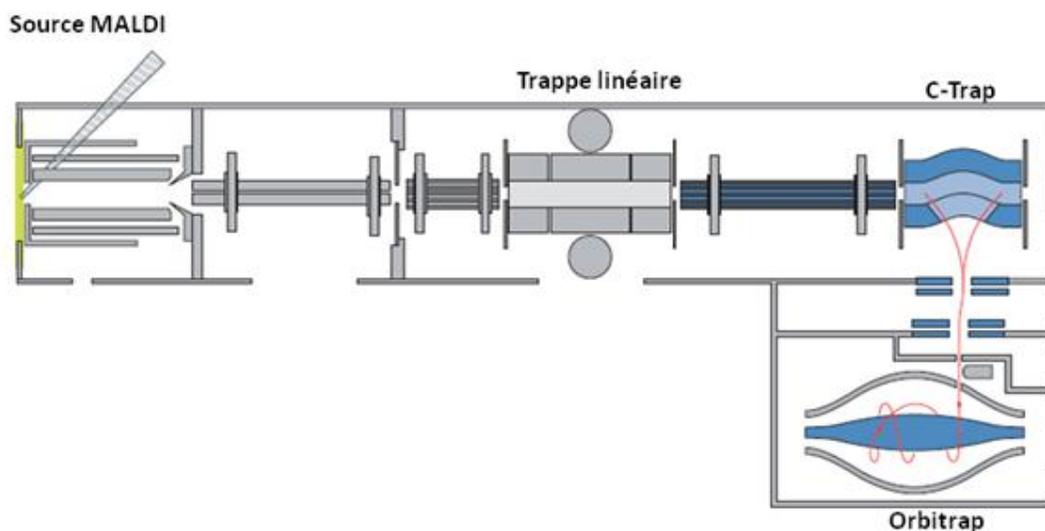


Figure 31 Configuration commerciale du système LIT-Orbitrap avec une source MALDI (Thermo Fisher Scientific)

### III.6 La fragmentation induite par collision CID

Il s'agit de la méthode de fragmentation la plus utilisée en protéomique. La fragmentation des peptides est généralement réalisée en présence de molécules de gaz inertes tel que l'Hélium ou l'Argon. Le processus de collision des ions s'effectue en deux étapes.

- La collision entre l'ion et les molécules de gaz neutres
- La décomposition unimoléculaire de l'ion activé.

$AB + G \rightleftharpoons AB^* + G$  Collision avec le gaz (G) étape d'activation et de désactivation

$AB^* \rightarrow A+B$  Décomposition unimoléculaire Équation 20

L'étape de décomposition unimoléculaire de l'ion ainsi que son rendement sont définis par les théories du quasi équilibre (QET) et RRKM (Rice, Ramsberger, Kassel, Marcus). Bien que ces deux théories soient sensiblement différentes, l'ensemble de la communauté scientifique parle d'une seule et même théorie la RRKM /QET. Cette théorie permet de comprendre les réactions des ions en présence de gaz dans un compartiment soumis à un vide poussée. Elle repose sur les travaux de Rosenstock et Marcus en 1952 (Rosenstock et al. 1952 ; Marcus et al. 1952). Elle a été ensuite revue et simplifiée en 1990 (Gilbert et al. 1990), elle est basée sur quatre hypothèses :

- La dissociation de l'ion moléculaire est plus longue que son excitation
- Le taux de dissociation est faible comparé au taux de redistribution de l'énergie d'excitation
- Les fragments sont formés par une série de réactions unimoléculaires consécutives et compétitives.
- Au sein du spectromètre de masse, les ions produits sont des systèmes isolés en état d'équilibre interne, la notion de système isolé implique que l'ion ne peut échanger quoi que ce soit avec le milieu qui l'entoure. Aucun échange de matière ou d'énergie n'est possible.

Cette absence totale d'échange de matière implique que la vitesse de fragmentation  $k(E)$  des ions au sein du spectromètre de masse dépend uniquement de l'énergie interne de celui-ci. L'équation du quasi équilibre RRKM/QET définit cette notion :

$$k(E) = \nu \left[ \frac{(E_{int} - E_0)}{E_{int}} \right]^{S-1} \quad \text{Équation 21}$$

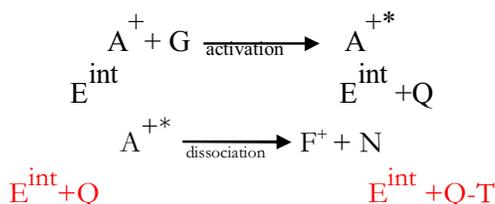
Où  $k(E)$  est la constante de vitesse,  $\nu$  le facteur caractérisant l'état de transition de la réaction ou facteur entropique,  $E_{int}$  l'énergie interne de l'ion avant sa fragmentation,  $E_0$  l'énergie d'activation nécessaire afin de réaliser la fragmentation et  $S$  le nombre d'oscillateurs.

Avant la collision avec le gaz l'ion possède une énergie interne  $E_{int}$  qui est dépendante de la méthode d'ionisation utilisée (Electrospray, MALDI). Afin de pouvoir réaliser la fragmentation de l'ion une augmentation de l'énergie interne post source est nécessaire, cette augmentation de l'énergie est appelée l'excitation secondaire et fait intervenir un gaz cible qui a pour but d'exciter les ions stables.

Le phénomène de dissociation de l'ion s'opère en deux étapes. La première étape consiste à l'excitation de l'ion  $A^+$  formé après ionisation, avec le gaz cible. La collision avec le gaz va entraîner une augmentation de l'énergie interne d'une quantité  $Q$ .

La seconde étape consiste à la dissociation de l'ion activé  $A^{+*}$  en fragments ( $F^+$ ) et en élément neutres ( $N$ ).

Equation 22



Dans tout phénomène de collision il y a un transfert d'énergie au centre de masse ( $E_{CM}$ ) tel que :

$$E_{CM} = E_{lab} \frac{m}{M + m} \quad \text{Equation 23}$$

Où  $E_{lab}$  représente l'énergie cinétique de l'ion dans le référentiel du laboratoire,  $m$  la masse du gaz cible.

### III.6.1 Différents types de collision

En fonction du spectromètre de masse utilisé on observe différents type de collision des ions.

#### III.6.1.1 Collision à haute énergie

Ce type de collision est réalisé uniquement dans les spectromètres de masse de type TOF/TOF ou hybrides. Au sein de ces spectromètres de masse les ions sont soumis à une accélération leur permettant d'acquérir une énergie cinétique de l'ordre de quelques kiloelectronvolt (keV). Une fois les ions accélérés, ils sont excités électroniquement grâce à la collision avec des atomes ou molécules de gaz.

Les collisions à haute énergie permettent de rompre les liaisons peptidiques mais également les liaisons des chaînes latérales ce qui permet de dissocier deux acides aminés comme l'isoleucine et la leucine. La rupture des liaisons est la résultante de la distribution de l'énergie interne en énergie vibrationnelle. L'un des gaz les plus utilisés dans ce type de collision est l'hélium. Contrairement aux gaz comme l'argon, l'hélium est efficace pour le transfert d'énergie. Cependant dans nos travaux nous avons utilisé l'air, pour des raisons de coût et de simplicité.

#### III.6.1.2 Collision à basse énergie

Ce type de collision est réalisé dans les spectromètres de masse tels que la trappe ionique, le triple quadripôle. Dans ce type de collision, une faible quantité d'énergie (de l'ordre de quelques dizaines d'électronvolts) est ajoutée à l'énergie interne de l'ion précurseur. Afin d'obtenir une fragmentation, plusieurs collisions sont accumulées. Dans les cellules de collision multipolaires, les gaz utilisés pour ce type de fragmentation sont l'Argon et le Xénon qui sont des gaz permettant d'augmenter l'énergie du centre de masse nécessaire pour entraîner le phénomène de dissociation. Dans les trappes ioniques, seul l'hélium est utilisé.

### III.6.2 La fragmentation peptidique

L'analyse de nombreux fragments peptidiques a permis d'instaurer une règle de fragmentation décrite en 1984 par Roepstorff et Fohlman, cette nomenclature (Roepstorff and Fohlmann 1984) a été simplifiée et complétée en 1990 par Biemann (Biemann et al. 1990)

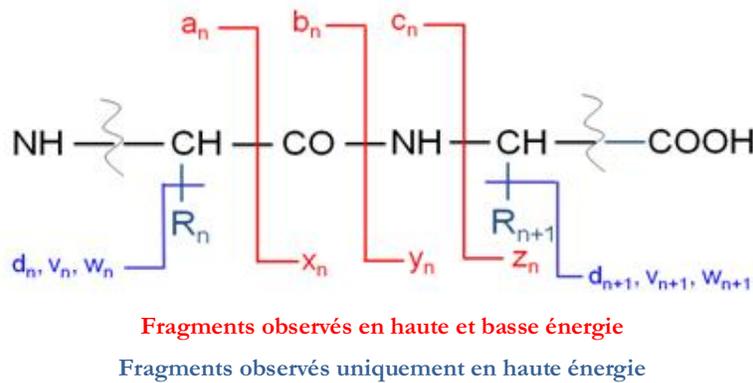


Figure 32 : Nomenclature de la fragmentation peptidique en haute et basse énergie

Après fragmentation on observe deux types d'ions :

- Les ions de séries a, b et c possédant une charge positive portée par la partie N-terminale
- Les ions de séries x, y et z possédant une charge positive portée par la partie C-terminale

Les spectres de masse présentent en majorité des ions de types b et y correspondant aux ruptures des liaisons peptidiques ce qui permet de déterminer la séquence en acides aminés d'un peptide.

### III.6.3 Identification des peptides et des protéines

L'outil informatique est un outil quotidien pour toute personne travaillant dans le domaine de la protéomique. L'analyse des spectres, le traitement des données, l'identification des protéines et des peptides nécessitent l'utilisation de la bioinformatique.

De nombreux outils permettent l'identification des peptides et des protéines. Parmi ces outils, les banques de protéines et les moteurs de recherche sont des éléments indispensables pour toute analyse en protéomique. Nous allons développer ci-dessous les différentes banques de protéines et les moteurs de recherches existant actuellement.

#### III.6.3.1 Les banques de protéines

Avec l'explosion de la protéomique et les nombreuses recherches en génomiques le nombre de banques de séquence n'a cessé d'augmenter (Apweiler et al. 2004). Cependant toutes ces banques n'ont pas les mêmes critères de confiance. Ce taux de confiance dépend de la redondance des séquences présentes au sein de la banque et du taux de vérification de chacune des séquences.

### III.6.3.1.1 Les banques généralistes de dépôts ou séquence repositories

Il s'agit de l'ensemble des banques produites par le groupe NCBI (National Center for Biotechnology Information). Les différentes séquences présentes en son sein proviennent de la traduction de gène prédit par des algorithmes. Cette traduction entraîne la présence de nombreuses erreurs de séquences ainsi que des nombreuses redondances. Parmi ces banques nous pouvons citer l'exemple de la banque GenPept qui utilise les banques nucléotidiques tel que GenBank ou EMBL.

De part la qualité moindre et le nombre de redondances que contient ce type de banque son utilisation en protéomique reste délicate et les résultats doivent être considérés avec soin.

### III.6.3.1.2 Les banques protéiques.

Contrairement aux banques généralistes les banques protéiques sont largement utilisées en protéomique, le niveau de confiance et le faible taux de redondance ainsi que les régulières corrections en font des banques de choix pour l'analyse protéomique.

En 2003 l'association de plusieurs grands instituts comme l'institut suisse de bioinformatique (SIB), l'institut européen de bioinformatique (EBI) et le Protéine Information Ressource (PIR) a permis la création d'une banque stable corrigée et validée par des experts. Avec ce consortium est née la banque Uniprot (Universal Protein Ressource).

La banque Uniprot présente deux variantes : La Banque UniprotKB/Swissprot et la banque UniprotKB/TrEMBL

- La banque UniprotKB/SwissProt

Avec des corrections régulières et un faible taux de redondant la banque UniprotKB/SwissProt fait office de banque de référence en protéomique. Créée en 1986, cette banque comprend un grand nombre d'informations continuellement mises à jour telles que les modifications post traductionnelles, les localisations cellulaires et les fonctions.

- La banque UniprotKB/TrEMBL

Il s'agit de la banque complémentaire de SwissProt contenant les séquences protéiques issues de la traduction des séquences codantes des banques nucléotidiques GenBank, EMBL et DDB. Cette banque a pour principal rôle de fournir à la communauté scientifique de nouvelles séquences protéiques. Ces nouvelles séquences issues de la traduction de séquence génomiques seront par la suite corrigées et validées par un groupe d'experts.

### III.6.3.2 Les moteurs de recherches

Les moteurs de recherches sont des algorithmes comparant des masses ou spectres expérimentaux à des masses ou spectres théoriques provenant de digestions *in silico*.

Ces différents moteurs de recherches sont classés en deux grands groupes d'algorithmes :

- Les algorithmes de recherches heuristiques
- Les algorithmes de recherches probabilistiques

Dans la catégorie des algorithmes de recherches heuristiques on retrouve les moteurs de recherches Sequest ou X!tandem ce type d'algorithme travaille sur la corrélation entre un spectre expérimental et un spectre théorique. Plus la similarité entre les deux spectres est grande et plus le score calculé sera élevé. Ici il n'est pas tenu compte de l'intensité des fragments obtenus.

Les algorithmes de probabilité tels que MASCOT modélisent la fragmentation et calculent la probabilité de correspondance avec une séquence donnée. Plus le nombre de fragments théoriques attendus et correspondant à des pics intenses du spectre est élevé, plus le score est élevé.



# IV MATERIEL ET METHODES

---

## IV.1 Test de coprécipitation

### IV.1.1 Matériel chimique

Le peptide amyloïde bêta 1-42 de séquence :

DEAFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

a été synthétisé suivant le protocole décrit par Palotas (Palotas et al. 2002) en Hongrie dans le laboratoire du département de chimie médicale à l'Université de Szeged. Le peptide une fois synthétisé a été purifié puis lyophilisé à partir d'une solution aqueuse. Cette étape est nécessaire pour le maintien de la forme protofibrillaire du peptide. Pour éviter toute dégradation du peptide une conservation à  $-80^{\circ}\text{C}$  est nécessaire jusqu'à l'utilisation du peptide.

Afin d'obtenir la forme fibrillaire du peptide  $A\beta$ , il est incubé dans de l'eau pendant 48h à  $37^{\circ}\text{C}$  à une concentration de  $66\ \mu\text{M}$ .

Afin de déterminer les protéines liées spécifiquement à l' $A\beta$ , nous avons utilisé comme témoin négatif la bêta-cristalline. Cette protéine a la particularité de former des fibrilles similaires aux fibrilles d'amyloïdes. Pour obtenir ces fibrilles,  $200\ \mu\text{M}$  de  $\beta$ -cristalline (Sigma, St Louis, MO, USA) sont incubés 48 heures à  $37^{\circ}\text{C}$  (Meehan et al. 2004)

### IV.1.2 Matériel biologique

#### IV.1.2.1 Rats

L'ensemble des expériences réalisées sur les rats est conforme à la législation établie par le ministère de l'agriculture. (Agrément 31-242)

Les 6 expériences faites chez le rat ont été réalisées avec des rats Sprague Dawley males pesant entre 230 et 260 grammes achetés chez Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Les rats sont au nombre de 2 par cages dans une pièce thermo régulée à  $24\ ^{\circ}\text{C}$  avec un cycle lumineux de 12 heures. Ces animaux sont nourris et abreuvés *ad libitum*. La période d'adaptation à l'environnement est de 2 semaines ce qui est suffisant pour éviter tout traumatisme de l'animal.

#### IV.1.2.2 Sacrifice

L'ensemble des sacrifices a été réalisé sous anesthésie, chaque rat est profondément anesthésié par injection de pentoarbital (60mg/kg) (Ceva Santé Animale, Libourne, France). Afin d'éviter tout traumatisme chaque rat a été anesthésié individuellement à l'abri des autres rats.

Le sacrifice est réalisé par décapitation, ce qui nous permet de récupérer rapidement chaque cerveau et les stocker dans la glace afin d'éviter toute dégradation protéique.

#### IV.1.2.3 Purification des synaptosomes.

Les synaptosomes sont purifiés à partir des cerveaux entiers de rats selon le protocole établi par Fabian et al. 2002. Immédiatement après le sacrifice, chaque cerveau est prélevé et broyé à l'aide d'une sonde en présence de 15 mL d'une solution contenant 5mM de Tris HCl, 50 $\mu$  CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT à pH 7,4.

Chaque broyat traité en parallèle est centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes afin d'éliminer les gros débris cellulaires. Les culots sont resuspendus dans 3 ml de sucrose à 10% et centrifugé pendant 12 000 g pendant 20 minutes.

Nous éliminons le surnageant pour ensuite resuspendre le culot dans 3 ml de sucrose à 10% suivi d'une centrifugation de 25 minutes à 20 000g. Après centrifugation le surnageant est une nouvelle fois éliminé le culot est une nouvelle fois resuspendu dans 3 ml de sucrose à 10 % et centrifugé 14 000 g pendant 20 minutes. Cette étape a été répétée deux fois afin de laver le culot et d'obtenir uniquement les cellules.

Les différents culots issus des centrifugations successives sont resuspendus dans 3 ml de tampon de lyse contenant 5 mM de Tris HCl, 50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> pH 8,1 et incubé pendant 30 minutes dans la glace.

Cette lyse est suivie d'une ultracentrifugation en gradient de sucrose 10%, 28,5 %, 34% à 128 000g pendant 2 heures.

La fraction de synaptosomes est récupérée à l'interface 28,5/34%. Cette fraction est ensuite diluée trois fois dans un volume final de 9 ml dans 50 mM de Tris HCL, pH 7,4 et centrifugée pendant 1 heure à 128 000 g.

#### IV.1.2.4 Test de Co-précipitation

Après la centrifugation d'une heure à 128 000 g, une fois le culot de synaptosomes récupéré, les protéines sont extraites par une incubation avec 2 ml de Triton 1% X-100 dans du tampon phosphate pH 6,8 comprenant des anti-protéases qui empêchent la dégradation des protéines. Celui-ci est ensuite centrifugé à 16 000 g pendant 30 minutes à 4°C

Le surnageant comprenant les protéines solubles des synaptosomes sont incubées en présence d'A $\beta$  fibrillaire ou de  $\beta$ -cristalline à une concentration finale de 20 $\mu$ M durant la nuit.

Une fois l'incubation réalisée les échantillons sont centrifugés à 16 000 g pendant 10 minutes et lavés 2 fois avec 20mM d'HEPES afin d'éliminer les protéines n'ayant pas co-précipité avec les protéines fibrillaires. Les culots protéiques sont resuspendus dans 1% d'azide de sodium et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

## IV.2 Identification des protéines

### IV.2.1 Réduction et alkylation

Afin de réduire les différentes protéines pour que l'ensemble des sites de digestion soient accessibles, nous avons ajouté à notre échantillon protéique 10 mM de DTT dans 50 mM de bicarbonate d'ammonium aqueux, le mélange est ensuite placé à 56°C pendant 30 minutes sous agitation. Cette réaction permet de réduire les ponts disulfures essentiels au maintien des structures tridimensionnelles des protéines.

Après réduction des ponts disulfures, les différentes protéines sont alkylées grâce à une solution d'iodoacétamide à 55 mM dans 50 mM de bicarbonate d'ammonium. Cette alkylation permet d'empêcher la reformation des ponts disulfure en bloquant les cystéines portant les groupements -SH par les molécules d'iodoacétamide.

Vingt minutes dans l'obscurité sont nécessaires pour le bon fonctionnement de la réaction.

### IV.2.2 Digestion enzymatique

L'enzyme la plus généralement utilisée en protéomique est la trypsine car elle permet d'obtenir des fragments de tailles comprises entre 600 et 5000 Da compatibles avec une analyse en LC-MS/MS

La trypsine clive les protéines à l'extrémité carboxy-terminale des acides aminés, lysine et arginine sauf s'ils sont suivis d'une proline.

Au laboratoire nous utilisons la trypsine Roche (Trypsin, modified, Sequencing Grade, 1141825001) cette trypsine est d'abord resuspendue en reprenant 25 µg de trypsine dans 250 µl de TFA 0,1% suivi d'une sonication de 10 minutes.

Cette solution est ensuite préparée à 50ng/µL pour réaliser la digestion, 20 mM de bicarbonate d'ammonium, 0,04% CaCl<sub>2</sub>. Cette solution est préparée quelques instants avant la digestion et placée à 4°C pour éviter toute autolyse prématurée de la trypsine.

La digestion est réalisée pendant une nuit à 37°C, le lendemain 15 µl d'acide formique à 10% sont ajoutés pour arrêter la réaction.

### IV.3 Les différents types d'échantillons utilisés lors de nos études.

Plusieurs échantillons provenant de différents organismes ont été utilisés lors de nos différentes études. Voici une brève description de chacun de ces échantillons ainsi que leur utilisation.

#### IV.3.1 Échantillon Alzheimer

Une fois la digestion réalisée, chaque échantillon est stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$ , en attendant l'analyse en LC-MS/MS. L'ensemble des échantillons est traité en parallèle, 6 $\mu\text{l}$  sont injectés pour chaque analyse.

#### IV.3.2 Échantillon Standard

Pour le contrôle de nos analyses LC-ESI-FTICR ainsi que la mise au point des couplages LC-MALDI-TOF/TOF et LC-MALDI LIT-Orbitrap, nous avons utilisé un mélange commercial de protéines standard digéré par la trypsine

La mise au point des analyses en LC-MALDI TOF/TOF et LC MALDI LIT-Orbitrap, a été réalisée avec un mélange standard de protéines digérées par la trypsine (référence LCP 161088, Dionex, Pays-Bas) comprenant 6 protéines de poids moléculaires compris entre 11 et 135 kDa :

- Cytochrome C Bovin 11 kDa
- Lysozyme Poulet 14 kDa
- Alcool déshydrogénase *Escherichia Coli* 37 kDa
- Albumine de sérum bovin 69 kDa
- Sérotransferrine bovine 78 kDa
- B-Galactosidase 135 kDa

Afin de valider toutes nos analyses, nous utilisons au laboratoire une concentration de 20 fmol/ $\mu\text{L}$  de LCP soit une injection de 2 $\mu\text{l}$  d'une solution à 10 fmol/ $\mu\text{L}$ . L'analyse régulière de ce mélange à cette concentration nous permet de vérifier la qualité de notre système analytique.

#### IV.3.3 Comparaison LC MALDI versus LC ESI

##### IV.3.3.1 Mélange *Escherichia Coli*

A partir d'une culture bactérienne de 48h d'*Escherichia coli* nous avons pu obtenir après dilution 150 fmol d'extrait brut que nous avons digéré à la trypsine afin d'obtenir un mélange complexe de peptides.

Ce mélange nous permettra d'étudier la complémentarité entre l'ionisation ESI et l'ionisation MALDI.

#### IV.3.3.2 Échantillon *Stratum Corneum*

Dans le cadre d'analyses communes avec le Docteur Anne-Marie Hesse. Nous avons utilisé des échantillons de *stratum corneum* plantaire (SCP) (corne de pied) afin d'étudier la complémentarité ESI/MALDI en utilisant la chromatographie bidimensionnelle.

Les échantillons de *stratum corneum* plantaire sont obtenus en suivant le protocole de Guerrin (Guerrin et al. 1998)

#### IV.3.4 Mise au point du MALDI Orbitrap.

##### IV.3.4.1 Échantillons de colza

Afin de mettre au point les différents paramètres du MALDI LIT-Orbitrap nous avons utilisé le mélange de protéines LCP (défini plus haut) ainsi qu'un échantillon de colza issu d'une collaboration sur la plateforme de l'ESPCI.

#### IV.3.5 Comparaison LC MALDI TOF/TOF versus LC MALDI LIT-Orbitrap

##### IV.3.5.1 Biopsie Pulmonaire

Pour réaliser la comparaison entre le MALDI TOF/TOF et le MALDI LIT-Orbitrap nous avons utilisé des échantillons extraits de biopsies de poumons de patients atteints d'amylose.

Après une première analyse en LC-LIT-FTICR permettant l'identification des protéines d'intérêt nous avons pu utiliser l'excès pour notre étude. L'analyse de ces échantillons avec ces deux machines est un moyen supplémentaire d'obtenir des informations de séquence.

Les différentes biopsies sont broyées à l'aide d'une sonde à ultrasons. Une fois broyé l'échantillon est digéré par la trypsine et analysé en LC-MS/MS.

### IV.4 Chromatographie liquide mono dimensionnelle à polarité de phase inversée

#### IV.4.1 Chromatographie Liquide par phase inverse couplée au système nanoESI-LIT-FTICR

Les différents solvants utilisés pour la phase mobile de la chromatographie monodimensionnelle contiennent de l'eau (H<sub>2</sub>O), de l'acétonitrile (ACN) et de l'acide formique (AF).

L'ensemble des analyses a été réalisé sur un système chromatographique Ultimate U3000 (Dionex)

Après passage dans la boucle d'injection les peptides sont chargés sur une précolonne C18 (C18 PepMap100, 5 $\mu$ m, 100 Å, 300  $\mu$ m de diamètre interne et 5 mm de longueur, (Dionex) ce qui permet leur dessalage et leur concentration dans le solvant A (H<sub>2</sub>O/ACN/AF, 98/2/0,1, v/v/v) au débit de 15 $\mu$ L/min pendant 5 minutes. Une fois cette étape réalisée, les peptides sont élués vers la colonne analytique C18 à polarité de phase inversé (RP) au débit de 220 nL/min (C18 PepMap100, 3 $\mu$ m, 100 Å, 75  $\mu$ m de diamètre interne et 15 cm de longueur, (Dionex).

#### IV.4.2 Chromatographie Liquide par phase inverse couplée au système Probot MALDI-TOF/TOF

Pour les études RPLC MALDI TOF-TOF, les analyses sont réalisées avec un système chromatographique Ultimate U3000 (Dionex) couplé au système de microcollecte Probot (Dionex). Les peptides chargés sur la précolonne de type C18 (C18 PepMap100, 5 $\mu$ m, 100 Å, 300  $\mu$ m de diamètre interne et 5 mm de longueur, Dionex,) sont dessalés et concentrés pendant 5 minutes au débit de 20  $\mu$ L/min dans un solvant A comprenant 98% d'eau, 2% d'acétonitrile et 0,1% de TFA. Une fois les 5 minutes écoulées, les échantillons sont élués vers la colonne analytique de type C18 à polarité de phase inversée au débit de 220 nL/min. La séparation des peptides suit le gradient suivant :

- 0% à 50 % de solvant B (ACN/H<sub>2</sub>O/AF, 90/10/0,1, v/v/v) pendant 35 minutes
- 100 % B pendant 15 minutes correspondant au palier isocratique.
- 100% A (H<sub>2</sub>O/ACN/AF, 98/2/0,1, v/v/v) pendant 15 minutes permettant le rééquilibrage de la colonne.

#### IV.4.3 Chromatographie Liquide bidimensionnelle off line

L'utilisation de la chromatographie bidimensionnelle nous a permis d'étudier la complémentarité ESI/MALDI avec un nombre de peptides plus important. Pour cela les peptides digérés sont dans un premier temps retenus sur une colonne capillaire de type SCX (Strong Cation Exchange ou Echange de cation BioBasic SCX 5  $\mu$ m, 300 Å, 320 di et 15 cm de long, ThermoFisher Scientific).

La première dimension est réalisée en deux étapes.

Une première étape de rétention des peptides en condition saline avec les tampons suivants :

- 90% Tampon A': ACN/H<sub>2</sub>O/AF, 5/95/0.1, v/v/v
- 10% Tampon B': 100mM formiate d'ammonium, tamponé à pH=2,5 par du TFA, 25% ACN

Une deuxième étape de séparation des peptides avec un gradient linéaire de 20% à 70% de solvant B pendant 12 minutes avec un débit de 4 $\mu$ L/min. Le gradient est suivi d'un palier de 15 minutes à 100% B.

Les peptides issus de la séparation sont collectés automatiquement dans une plaque multi-puits toutes les 60 secondes, l'excès d'acétonitrile est évaporé avec une centrifugeuse sous vide équipée d'un système de

chauffage. Les fractions collectées et séchées sont reprises dans 10  $\mu\text{L}$  de tampon A ( $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{AF}$ , 98/2/0,1, v/v/v).

Chaque fraction est injectée dans le système chromatographique RP correspondant à la deuxième dimension. L'éluât chromatographique de la deuxième dimension est collecté sur une plaque MALDI-TOF/TOF avec le Probot.

## IV.5 Collecte de l'éluât chromatographique sur plaque MALDI TOF/TOF

L'éluât est déposé sur une plaque MALDI vierge grâce au collecteur de microfractions Probot (Dionex). Les peptides élués au débit de 0.220  $\mu\text{L}/\text{min}$  sont mélangés à la matrice au débit de 0.442  $\mu\text{L}/\text{min}$  afin d'obtenir un rapport éluât/matrice de 1/2 et un débit total de 0.662  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

La matrice utilisée est la CHCA (acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy cinnamique) (LaserBio Labs, Sophia Antipolis, France) à 5 mg/ml dans 60% d'acétonitrile, 0,1 TFA et 10% de citrate d'ammonium. La collecte des dépôts débute 15 minutes après la fin du dessalage des peptides et dure 40 minutes. La fréquence de dépôts est de 10 secondes ce qui permet d'obtenir un échantillonnage de 6 dépôts par minute. La taille des dépôts ainsi que leur volume permet de déposer un total de 2880 spots sur une seule plaque MALDI pour le MALDI-TOF/TOF. Nous reviendrons sur l'optimisation des dépôts sur plaque MALDI.

### IV.5.1 Collecte de l'éluât chromatographique sur plaque MALDI LIT-Orbitrap

Le logiciel d'analyse du MALDI LIT-Orbitrap ne permettant pas de modifier les plans de plaque nous n'avons pas pu adapter le schéma de plaque du TOF/TOF.

La limite de 1536 spots par plaque nous permet de déposer uniquement 6 échantillons différents.

Afin de déposer plus d'échantillons nous devons doubler le temps de collecte par spots afin de doubler le nombre de spots collectés.

## IV.6 Spectrométrie de masse

### IV.6.1 Spectromètre de masse nanoESI-LIT-FTICR

L'analyse des peptides élués est réalisée en ligne avec un spectromètre de masse de type hybride LIT-FTICR (Thermo Scientific, CA, USA) équipé d'un système nanospray. L'ensemble des analyses est réalisé en mode positif sur la gamme de masse 450-2000 Th en mode MS. La stratégie d'analyse utilisée est la suivante : une analyse MS en full scan réalisée dans la cellule ICR (analyseur à résonance cyclotronique d'ion) avec une résolution de 60 000. Les sept peptides les plus intenses (minimum deux fois chargés) sont ensuite fragmentés dans le LTQ (Trappe ionique). La fenêtre de sélection autour du peptide d'intérêt est de 2 m/z, l'énergie de collision appliquée dans la trappe est de 35%.

#### IV.6.2 Spectromètre de masse nano ESI-QqTOF

Les peptides élués en sortie de chromatographie monodimensionnelle sont détectés sur un spectromètre de masse de type hybride QqTOF (QTof2, Micromass Waters).

Ce spectromètre de masse équipé d'une source nanospray (New Objective, Etats-Unis) permettant un couplage direct avec le système chromatographique U3000 (Dionex).

L'analyse MS des peptides est réalisée en mode positif sur une gamme de masse de 400 à 1300 Th. L'analyse MS/MS est réalisée avec les 3 peptides les plus intenses portant 2 ou 3 charges positives sur une gamme de masse 50-2600 Th

#### IV.6.3 Spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF

Une fois la collecte des fractions sur la plaque MALDI réalisée, les dépôts correspondant aux différents chromatogrammes sont analysés sur un spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF 4800 (Applied Biosystems, Framingham, MA). Les analyses MS sont réalisées en mode réflectron positif sur une gamme de masse de 700 à 4000 Da avec une intensité du laser de 2250 pour 1600 tirs cumulés. La liste des précurseurs pour l'analyse MS/MS est générée automatiquement par le logiciel du constructeur selon les paramètres suivants : 7 précurseurs maximum par spot ; rapport signal/bruit minimum 40 ; tolérance de masse des précurseurs entre les spots  $\pm 100$  ppm ; exclusion dynamique entre deux précurseurs 2 spots. Les données MS/MS sont acquises en utilisant l'air comme gaz de collision avec une énergie de 2keV et une intensité de laser de 3500 avec 2500 tirs cumulés.

L'étalonnage est obtenu en réalisant une calibration externe, réalisée avec les 8 spots présents autour de la plaque MALDI permettant une calibration de la masse mais également une calibration de la linéarité de la plaque MALDI ce qui permet d'obtenir une calibration homogène tout autour de la plaque sans obtenir de déviation entre les différentes extrémités. Le calibrant utilisé est composé d'un mélange de quatre peptides standard comprenant le fragment 1-5 de la bradykinine (573,315 Da), l'angiotensine humaine II (1046,542 Da), la neurotensine (1672,918 Da), le fragment 18-39 de l'ACTH (2465,199 Da) et la Chaîne B de l'insuline (3494,651 Da) (Proteomix Peptide calibration Mix 4, LaserBio Labs, Sophia Antipolis, France).

#### IV.6.4 Spectromètre de masse MALDI Orbitrap

Une fois la collecte des fractions sur la plaque MALDI réalisée, les différents dépôts sont analysés par un spectromètre de masse hybride MALDI LIT-Orbitrap (Thermo Scientific).

Les analyses MS sont réalisées en mode positif dans l'Orbitrap avec une résolution de 60 000 sur une gamme de masse comprise entre 815 et 4000 Da avec une énergie de laser de 20  $\mu$ J et 5 microscans. Le mode de détection utilisé est le CPS pour Crystal Positioning System permettant une détection automatique des cristaux de matrice. Le filtrage automatique des spectres (ASF) permettant d'acquérir les

spectres qui possèdent des intensités supérieures à une certaine valeur n'a pas été utilisé. Le remplissage automatique de la trappe est activé (AGC).

L'analyse MS/MS est réalisée dans la trappe linéaire (LTQ), l'énergie du laser reste identique (20µJ), le nombre de microscans nécessaire pour obtenir une fragmentation de qualité est de 40, La fenêtre de sélection dans le LTQ est de 2 m/z l'énergie de collision nécessaire à la fragmentation des peptides est de 40%

La calibration de masse est réalisée en externe avec un mélange de peptides standards comprenant MRFA (524,27 Da), le fragment 1-7 de la Bradykinine (757,40 Da), la Bradykinine (1060,57 Da), l'Angiotensine I (1296,69 Da), la Neurotensine (1672,92 Da) Renine (1758,93 Da), le fragment 1-16 de l'ACTH (1936,99 Da), la Melittine (2845,75 Da) et le fragment 7-38 de l'ACTH (3657,93 Da) (MSCAL4 Sigma Aldrich St Louis MO USA).

Ces différents peptides permettent à la fois de réaliser la calibration de la gamme de masse normale 150-2000 Da mais également de la gamme de masse supérieure 200-4000 Da.

## IV.7 Recherche dans les banques de données

### IV.7.1 Paramétrage des recherches

Pour l'ensemble des échantillons analysés en spectrométrie de masse, les recherches sont réalisées avec le logiciel de recherche Mascot 2.3 (MatrixScience, Londres, UK) contre la banque de données Swissprot (version Juillet 2011)

Pour les recherches des analyses réalisées sur les spectromètres de masse de type LIT-FTICR, LIT-Orbitrap et QqTOF sont réalisées avec l'utilitaire Mascot Daemon en utilisant les serveurs Mascot, pour les recherches des analyses MALDI-TOF/TOF nous avons utilisé le logiciel ProteinPilot, ce logiciel utilise également l'algorithme de recherche Mascot. Les paramètres de tolérance de masse MS et MS/MS pour l'ensemble des spectromètres de masse utilisés au laboratoire sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Tableau de tolérance de masse pour les différents spectromètres de masse utilisés au laboratoire

Spectromètre de masse utilisé	Tolérance MS	Tolérance MS/MS
ESI-LIT-FTICR	10 ppm	0.6 Da
ESI-QqTOF	0.3 Da	0.3 Da
MALDI-LIT-Orbitrap	10 ppm	0.6 Da
MALDI-TOF/TOF	75 ppm	0.3 Da

#### IV.7.1.1 Échantillon Standard

Pour les échantillons standards les recherches sont réalisées avec l'utilitaire Mascot Daemon avec les paramètres de tolérance de masse décrits ci-dessus. Les recherches sont effectuées avec une digestion à la trypsine avec un maximum de 2 misscleavage. Les modifications biochimiques devant être appliquées à la suite de la réduction et de l'alkylation des protéines sont la carboxyméthylation des cystéines et l'oxydation des méthionines. Aucune taxonomie n'a été choisie sachant que les protéines du mélange standard proviennent de plusieurs organismes.

#### IV.7.1.2 Échantillons Alzheimer

Pour les échantillons Alzheimer les recherches sont réalisées avec l'utilitaire Mascot Daemon avec les paramètres de tolérance de masse décrits ci-dessus. Les recherches sont effectuées avec l'organisme *Rattus* avec une digestion à la trypsine avec un maximum de 2 misscleavage. Les modifications biochimiques pouvant être appliquées à la suite de la réduction et de l'alkylation des protéines sont la carbamidométhylation des cystéines et l'oxydation des méthionines. A ces modifications nous pouvons également ajouter N-acétylation des protéines ; Pyroglutamate Gln.

#### IV.7.1.3 Échantillons *Escherichia coli*

Pour les échantillons issus de la digestion des extraits bruts d'*E.coli* les recherches sont réalisées avec l'utilitaire Mascot Daemon avec les paramètres de tolérance de masse décrits ci-dessus. Les recherches sont effectuées avec l'organisme *Escherichia coli* avec une digestion à la trypsine avec un maximum de 2 erreurs de lyses. Les modifications biochimiques pouvant être appliqués à la suite de la réduction et de l'alkylation des protéines sont la carbamidométhylation des cystéines et l'oxydation des méthionines.

#### IV.7.1.4 Échantillons *Stratum Corneum* Plantaire (SCP)

Pour les échantillons issus de la digestion des extraits de *stratum corneum* plantaire les recherches sont réalisées avec l'utilitaire Mascot Daemon avec les paramètres de tolérance de masse décrits ci-dessus. Les recherches sont effectuées avec l'organisme *Humain* avec une digestion à la trypsine avec un maximum de 2 misscleavage. Les modifications biochimiques pouvant être appliqués à la suite de la réduction et de l'alkylation des protéines sont la carbamidométhylation des cystéines et l'oxydation des méthionines.

#### IV.7.1.5 Échantillons de biopsie pulmonaire

Pour les échantillons issus de la digestion des extraits de biopsie pulmonaire les recherches sont réalisées avec l'utilitaire Mascot Daemon avec les paramètres de tolérance de masse décrits ci-dessus. Les recherches sont effectuées avec l'organisme *Humain* avec une digestion à la trypsine avec un maximum de 2 erreurs de lyses. Les modifications biochimiques pouvant être appliqués à la suite de la réduction et de l'alkylation des protéines sont la carbamidométhylation des cystéines et l'oxydation des méthionines.

## IV.7.2 Validation des protéines.

Afin d'obtenir la meilleure identification chaque échantillon passé en spectrométrie de masse est analysé trois fois pour obtenir la meilleure couverture de séquence possible mais également éviter les faux positifs.

La validation de l'identification des protéines est régie par les règles du laboratoire. Chaque protéine est validée si elle possède un minimum de 2 peptides avec un score de 30. Cette règle est valable pour l'ensemble des analyses réalisées au laboratoire. Ce type de validation nous permet d'identifier les protéines de façon relativement fiable.

## IV.8 Recherche des partenaires du peptide A $\beta$ par LC-MS/MS

### IV.8.1 Stratégie expérimentale

Comme évoqué dans notre introduction, la forme fibrillaire de l'Amyloïde- $\beta$  (A $\beta$ ) joue un rôle central pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la neuro-dégénérescence de la maladie d'Alzheimer.

Le but de nos travaux est d'établir une cartographie des partenaires protéiques de l'A $\beta$  sous ses différentes formes (monomère, oligomère, fibrillaire ou plaque d'agrégats extracellulaire). Pour cela nous avons tout d'abord établi une stratégie expérimentale. Dans le cadre de cette étude nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la validation de cette approche grâce à une comparaison des partenaires protéiques d'amas fibrillaires de l'A $\beta$  avec pour contrôle les agrégats de  $\beta$ -crystalline. Nous avons ensuite mis en évidence les limites de cette première stratégie et nous nous sommes attachés à montrer comment compléter les informations obtenues en modifiant notre approche.

Afin d'étudier les différents partenaires de la forme fibrillaire de l'Amyloïde- $\beta$  A $\beta$  1-42, nous avons suivi une stratégie basée sur l'analyse LC-MS/MS des protéines précipitées avec l'A $\beta$  1-42 (Verdier et al. 2005). Cette stratégie d'analyse avait précédemment permis d'identifier 40 protéines spécifiquement en association avec la forme A $\beta$  fibrillaire. Cette première liste de protéines proposait des candidats pouvant être impliqués dans les interactions avec A $\beta$  dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Grâce aux différentes avancées technologiques en protéomique il a été possible de reprendre et compléter cette liste. Le montage en sensibilité et en résolution de la spectrométrie de masse, associée aux développements méthodologiques réalisés au cours de cette étude, nous ont permis de compléter et de confronter nos identifications à la liste de référence publiée dans les travaux précédents. De nouveaux candidats ont été identifiés et ont fait l'objet d'une étude bibliographique plus détaillée afin de recouper l'identification directe de ces partenaires par une approche protéomique en bottom-up avec les données de la littérature.

Pour identifier les différents partenaires de l'A $\beta$  1-42 nous avons utilisé les synaptosomes issus de différents cerveaux de rats comme modèle biologique. Comme indiqué dans l'introduction, nous avons

utilisé un test de co-précipitation entre des fibrilles d'A $\beta$  1-42 synthétique et des protéines extraites de synaptosomes de rats (Lorenzo et al. 2000, Verdier et al. 2005). Un des avantages de ce modèle est qu'il permet de travailler sur une séquence d'A $\beta$  connue, sous un état d'agrégation validé. Elles ont fait l'objet de nombreuses études pour comprendre les différents mécanismes du cerveau (Verdier et al. 2005 ; Bai et al. 2007).

Enfin, contrairement à l'expérience de 2005 où 4 cerveaux de rats avaient été utilisés en une unique expérience pour réaliser l'identification des protéines associées aux formes fibrillaires d'A $\beta$  1-42, nous avons décidé d'utiliser un seul individu par expérience afin de prendre en compte les variations inter-individu et de tenir compte des problèmes de statistique pouvant perturber l'identification et l'étude des résultats obtenus. Ceci a été rendu possible grâce à la sensibilité accrue des analyses lors de cette étude. Au-delà de l'aspect reproductibilité biologique (6 rats ont été étudiés séparément) nous avons de surcroît travaillé sur des triplicatas techniques, chaque rat ayant été évalué pour l'identification des protéines associées à des fibrilles de  $\beta$ -cristalline versus des fibrilles d'A $\beta$  1-42 agrégés.

Pour obtenir ces cellules, différentes centrifugations successives du tissu nerveux sont réalisées, les cellules obtenues sont incubées en présence de fibrilles d'amyloïde- $\beta$  1-42 et de  $\beta$ -cristalline, un « homologue structural » qui est notre témoin négatif (Ecroyd and Carver 2009).

Après une incubation de 12 heures, les fibrilles sont précipitées et les protéines en association vont co-précipiter. L'ensemble de ces protéines sera ensuite traité pour être analysé en protéomique via une approche bottom-up en LC-MS/MS.

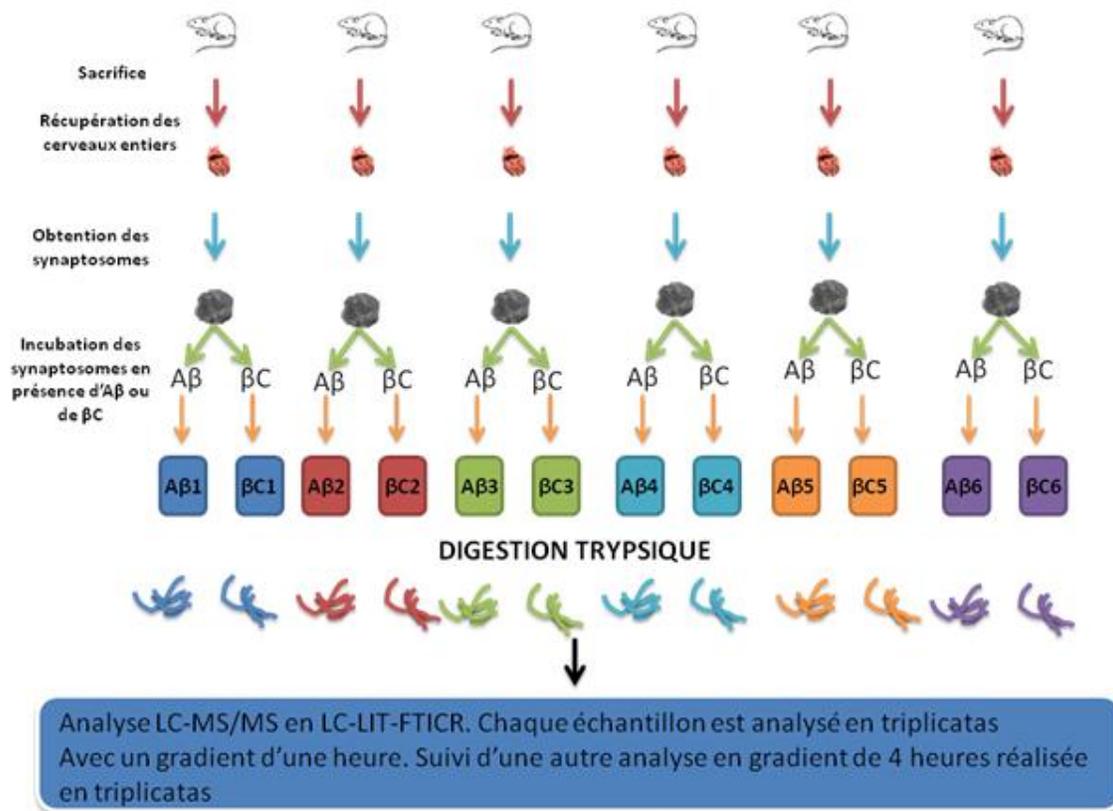


Figure 33 : Stratégie expérimentale suivie pour les 6 campagnes

La Figure ci-dessus représente les campagnes d'analyses réellement utiles pour les résultats finaux de l'étude. La stratégie expérimentale présente de nombreuses étapes. Au total, les différentes mises au point ainsi que les nombreux essais n'apportant pas de résultats satisfaisants ont nécessité le sacrifice d'une quinzaine de rats, soit 9 rats supplémentaires, ce qui a rendu l'étude particulièrement longue.

A travers chacune de ces étapes il est important de prendre plusieurs précautions permettant d'éviter la contamination ou la perte de l'échantillon.

1. Le sacrifice et la récupération des cerveaux : Afin d'éviter toute contamination protéique il est nécessaire de sacrifier l'animal dans une zone décontaminée et propre au sens protéomique (exempte de la présence de protéines standard en grande quantité comme la BSA ou la caséine) et d'utiliser des outils n'étant pas en contact avec des poils ou avec un autre animal (kératines). Lors de la récupération du cerveau il est conseillé de laver le cerveau avec du PBS afin de décontaminer le cerveau de toute kératine.
2. Centrifugations : Comme pour toute centrifugation il est important au moment des différents lavages de vérifier la présence d'un culot.

3. Gradient de sucrose : Il s'agit de l'étape cruciale de notre stratégie d'analyse, en effet elle nous permet de récupérer les synaptosomes pour notre étude. Une imprécision dans le gradient de sucrose peut en effet entraîner la perte de notre échantillon.

#### IV.8.2 Analyse LC-MS/MS

Après digestion, l'ensemble des peptides protéolytiques est analysé par couplage nanoLC MS/MS. La séparation chromatographique tient un rôle extrêmement important dans le cadre de l'analyse. En effet la séparation des peptides par chromatographie doit permettre de réaliser une détection sensible (bon rapport signal sur bruit), de séparer au mieux les espèces peptidiques, tout en restant compatible avec la rapidité de balayage du spectromètre. Le choix des solvants, la pente des gradients, le temps de séparation, etc. sont des paramètres cruciaux. Nous verrons que le mode d'ionisation peut être déterminant pour la détection d'une espèce, mais dans cette première partie nous nous sommes limités au mode d'ionisation en nanoESI.

Nous nous sommes intéressés notamment à la pente du gradient c'est-à-dire à la durée de séparation. Les gradients classiques pour les mélanges peu complexes utilisés en couplage avec un appareil du type LTQ-FT durent au laboratoire environ une heure, ce qui permet d'obtenir un compromis intéressant pour une séparation à la fois rapide et efficace.

Cependant nos études au laboratoire montrent que l'utilisation de gradients plus long dans le temps et pouvant durer jusqu'à 15 heures permettait d'obtenir des résultats supérieurs à un gradient classique et comparables à une séparation réalisée en chromatographie bidimensionnelle (Hesse 2009).

Avant tout il s'agit dans ce cas de considérer divers facteurs :

- Le temps de séparation et le temps d'analyse nécessaire : en effet l'optimisation doit permettre de proposer des conditions expérimentales réalistes dans le cadre de notre étude. Avec un gradient de 15 heures, chaque échantillon nécessite une semaine d'analyse (étalonnage et reconditionnement de la colonne nécessaires), soit deux semaines par animal étudié. Se posent alors des problèmes de stabilité et de conservation des échantillons. Ce point va en faveur d'un gradient court
- Le temps de séparation et la capacité de pics du spectromètre de masse théorique : en effet le spectromètre de masse travaille avec une fréquence d'échantillonnage limitante, puisque chaque espèce est sélectionnée séquentiellement. La co-élution ou la quasi co-élution de plusieurs espèces aboutit nécessairement à une sélection incomplète et non reproductible de toutes les espèces présentes. Cette fréquence d'analyse va de plus chuter lorsque les espèces sont faiblement abondantes. Ce point va en faveur d'un gradient long.

- La pente du gradient et le pouvoir résolusif : D'après la formule de Purnell, la résolution R de deux espèces A et B est donnée par

$$R = \frac{1}{4} \frac{1 - \alpha}{1 + \alpha} \frac{1}{1 + k'_B} \sqrt{N}$$

- Où  $\alpha$  est le facteur de séparation des espèces A et B dans le système chromatographique considéré (sélectivité),  $k'_B$  est le facteur de rétention de l'espèce B (facteur de capacité), N est le nombre de plateaux théorique de la colonne (efficacité). Diminuer la pente du gradient va augmenter le temps de rétention et le facteur de rétention, et le terme en  $k'_B$  va tendre vers 1 asymptotiquement. Améliorer la résolution se fera donc plutôt en jouant sur l'efficacité de la colonne et en adaptant les natures des phases stationnaires et des phases mobiles mises en jeu. Ce point n'est pas en faveur de l'allongement des gradients indépendamment de la colonne (nature et type de phase)
- Le temps de rétention et le rapport signal sur bruit : A efficacité et sélectivité données, R atteint un plateau puis évolue peu. D'après la formule de Purcell. Par définition du pouvoir de résolution

$$R = \frac{1}{4} \frac{t_{r(A)} - t_{r(B)}}{1}$$

- Où  $t_{r(A)}$  et  $t_{r(B)}$  sont les temps de rétentions relatifs des espèces A et B respectivement et  $\omega_A$  est la largeur de pic à la base des espèces A et B. Si R tend une constante alors si la différence entre les temps de rétention augmente, la largeur de pic  $\omega$  augmente aussi. La quantité d'analyte étant constante, l'aire du pic est constante, donc si la largeur augmente, l'intensité à l'apex du pic diminue et donc l'intensité et le rapport signal sur bruit à l'apex diminue quelle que soit le mode de détection. Ce point va en faveur d'un gradient court
- La robustesse d'identification et la qualité des spectres : la qualité spectrale d'un enregistrement en mode MS et par effet induit en mode MS/MS dépend de l'intensité du signal. De surcroît, certaines espèces ne seront plus détectées au dessus du seuil de déclenchement de l'analyse en mode MS/MS. Enfin lorsque le rapport signal sur bruit diminue une recherche manuelle des pics d'intérêt sera elle-même infructueuse. En revanche la coexistence d'espèces non résolues au moment de l'élution pose aussi un certain nombre de problèmes, puisque que seule une espèce pourra être sélectionnée à la fois pour le mode MS/MS, et que l'ionisation simultanée d'espèce de caractéristiques physico-chimiques différentes souffre d'effets de suppression au détriment des espèces moins facilement ionisées.

Il faut donc finement ajuster la durée de séparation afin de définir un compromis entre ces différents points. Au laboratoire nous avons évalué leur influence sur un ensemble de protéines standard digérées et nous avons ensuite extrapolé nos résultats à la complexité de notre échantillon. Cette étude ne faisant pas partie en propre du cadre de cette thèse, elle n'est pas détaillée ici. Dans le cadre de cette étude la durée totale de séparation a été fixée à 4 heures

L'optimisation a été validée par l'étude du nombre de protéines identifiées. La Figure 34 représente l'évolution entre le point initial et le résultat en fin d'optimisation sur une séparation monodimensionnelle en nanoLC couplée à un appareil de type nanoESI LIT-FTICR et travaillant en mode nanoLC MS/MS automatique, tous les paramètres de traitement de données étant égaux. Ces chiffres sont réalisés à partir d'une analyse en triplicata sur un échantillon de protéines synaptosomales coprécipitées en présence d'A $\beta$  1-42.

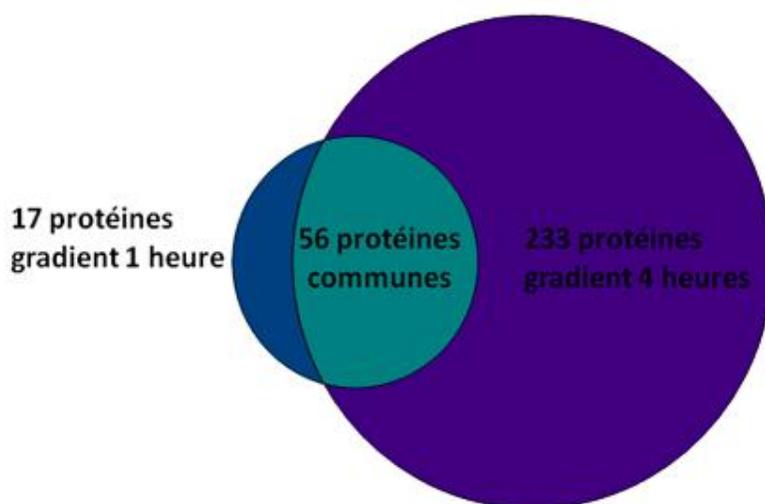


Figure 34 : Nombre de protéines identifiées en fonction de la durée de gradient d'acétonitrile utilisé. Le diagramme de Venn montre que 85% des protéines sont identifiées exclusivement en gradient long, 4% sont uniquement identifiées en gradient court.

Nous pouvons observer à la suite de ces analyses que le gradient long permet d'obtenir une couverture du protéome de cet échantillon plus importante que le gradient court comme attendu. Ainsi sur les 306 protéines identifiées au total, 233 sont exclusivement identifiées avec le gradient long, 56 protéines sont identifiées en commun avec les deux gradients et de façon un peu surprenante 17 protéines sont identifiées uniquement avec le gradient court. Il faut noter que ces protéines identifiées en gradient court exclusivement sont des protéines identifiées avec en général uniquement 2 peptides c'est-à-dire avec un score relativement faible. L'Annexe 4 reprend ces protéines en détail. Le score indiqué est le score Mascot tel que détaillé dans la partie expérimentale. De la même façon, si les protéines exclusivement identifiées avec le gradient long leur score d'identification est compris 70 et 1700 avec un nombre de séquences identifiées compris 2 et 35. L'Annexe 5 reprend ces protéines en détail. Il est aussi intéressant de considérer la couverture de séquence des protéines identifiées en commun. Dans l'Annexe 5 il est clairement mis en évidence que la qualité et la robustesse d'identification sont meilleures avec un gradient long.

Ceci peut s'expliquer de par la probable complexité du mélange injecté. En effet le nombre élevé de peptides en sortie de colonne dont de nombreux sont coélus ne peuvent être analysés simultanément par le spectromètre de masse. Par ailleurs les temps d'éluion plus longs ne nous ont pas permis d'améliorer notablement la qualité des analyses. C'est pourquoi les compromis de 4 heures de gradient ont été conservés pour la suite. L'ensemble de nos échantillons a donc été analysée avec le gradient de 4 heures.

Cet effet a été par la suite confirmé indirectement avec l'évolution technologique des spectromètres de masse. Le développement de nouvelles configurations permettant de dissocier sélection et fragmentation du précurseur a permis d'augmenter d'un facteur 4 à 5 (Kocher et al. 2011) le nombre de précurseurs pouvant être sélectionnés en un temps donné. Ceci équivaut à réaliser plus rapidement l'analyse par MS/MS et peut être comparé à ce que nous obtenons en ralentissant la séparation chromatographique à fréquence de balayage constante. Dans ce cas aussi une augmentation de la couverture de l'échantillon a été décrite (Kocher et al. 2011).

Au cours de notre étude il faut de la même façon souligner que nous avons modifié notre spectromètre de masse en augmentant le volume de piégeage utile des ions dans la cellule FTICR. Ceci nous a permis d'augmenter la sensibilité de la détection des précurseurs en conservant une bonne précision de mesure (1 ppm en routine après étalonnage, 5ppm utiles pour la recherche dans les banques).

### **IV.8.3 Identification des protéines**

Dans le cadre de notre étude nous cherchons à identifier les protéines partenaires de l'A $\beta$  1-42

Nous avons réalisé nos expériences avec 6 rats. Pour chaque expérience, un témoin négatif (fibrilles de cristalline) a été utilisé. L'utilisation de ce témoin négatif nous permettra d'identifier les protéines spécifiques à l'A $\beta$ . Comme illustré dans le schéma de notre stratégie expérimentale en Figure 33, la même quantité d'échantillon est utilisée pour les deux expériences A $\beta$  et  $\beta$ -cristalline

L'analyse des différents échantillons en utilisant les gradients longs de 4 heures nous a permis d'identifier un total de 518 protéines, identifiées dans au moins un des triplicats. L'ensemble des identifications est présenté dans le Tableau de l'annexe 4, avec le score et la répétabilité pour chacun des rats.

Ces 518 protéines comprennent les protéines spécifiques à l'A $\beta$  et les protéines spécifiques à la  $\beta$ -cristalline. Chacune des protéines identifiées est validée avec un minimum de 2 peptides avec un score de 30. La Figure 35 nous montre la répartition des protéines identifiées en fonction de la présence d'A $\beta$  ou de  $\beta$ -cristalline. La classification de ces protéines est reprise dans le tableau de l'Annexe 5. Une protéine est définie commune si elle est vue au moins une fois dans les échantillons A $\beta$  et  $\beta$ -cristalline.

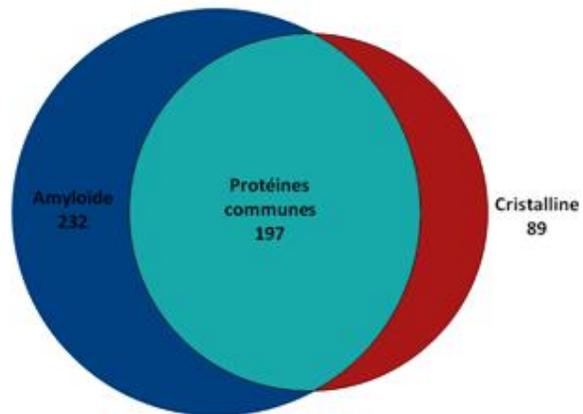


Figure 35 : Ensemble des protéines identifiées en association avec A $\beta$  et  $\beta$ -cristalline au cours de cette étude

La Figure 35 représente la répartition des protéines identifiées dans chacun des cas sans tenir compte du nombre de rats dans lesquels elles ont été identifiées ni des répétats techniques. Nous pouvons remarquer 232 protéines co-précipitent uniquement en présence d'A $\beta$  1-42, alors que 89 sont spécifiques de la  $\beta$ -cristalline et 197 sont des protéines en interaction non-spécifique.

Dans une première approche, l'ensemble des protéines identifiées a été confronté à la liste des 40 protéines spécifiques décrites en 2005. La comparaison est présentée dans la Tableau 3

Tableau 3 : Liste des 40 protéines identifiées uniquement en présence d'Aβ d'après (Verdier et al. 2005)

PROTEINES	DESCRIPTION ORGANISME	Aβ	βC
VATB2_RAT	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform <i>Rattus norvegicus</i>	X	
A4_RAT	amyloïd bêta precursor <i>Rattus norvegicus</i>	X	
SYN3_RAT	Synapsin-3 <i>Rattus norvegicus</i>	X	
RAC1_RAT	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 <i>Rattus norvegicus</i>	X	
CNTP1_RAT	Contactin-associated protein 1 <i>Rattus norvegicus</i>	X	
RP3A_RAT	Rabphilin-3A <i>Rattus norvegicus</i>	X	
CXA1_RAT	Gap junction alpha-1 protein <i>Rattus norvegicus</i>	X	
MAP2_RAT	Microtubule-associated protein 2 <i>Rattus norvegicus</i>	X	
SYN1_RAT	Synapsin-1 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
BSN_RAT	Protein bassoon <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
SYN2_RAT	Synapsin-2 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
TBB2B_RAT	Tubulin beta-2B chain <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
MBP_RAT	Myelin basic protein S <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
VPP1_RAT	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
SRCN1_RAT	SRC kinase signaling inhibitor 1 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
TBA1_RAT	Tubulin alpha-1C chain <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
CN37_RAT	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
AT1A3_RAT	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
EF1A1_RAT	Elongation factor 1-alpha 1 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
BASP1_RAT	Brain acid soluble protein 1 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
SEPT7_RAT	Septin-7 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
VAMP2_RAT	Vesicle-associated membrane protein 2 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
COF1_RAT	Cofilin-1 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
SUCA_RAT	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
ATPA_RAT	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
PCLO_RAT	Protein piccolo <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
SYGP1_RAT	Ras GTPase-activating protein SynGAP <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
ATP5L_RAT	ATP synthase subunit e, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
COX4L_RAT	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
DLG4_RAT	Disks large homolog 4 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
ERC2_RAT	ERC protein 2 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
KCC2A_RAT	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
ENOG_RAT	Gamma-enolase <i>Rattus norvegicus</i>		X
RIMS1_RAT	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1 <i>Rattus norvegicus</i>		
CA2D1_RAT	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1 <i>Rattus norvegicus</i>		
NTRI_RAT	Neurotrimin <i>Rattus norvegicus</i>		
FLOT1_RAT	Flotillin-1 <i>Rattus norvegicus</i>		
OPCM_RAT	Opioid-binding protein/cell adhesion molecule <i>Rattus norvegicus</i>		
CNTN2_RAT	Contactin-2 <i>Rattus norvegicus</i>		

Les premières et secondes colonnes donnent la référence et la description de la protéine, les troisième et quatrième colonnes donnent la localisation obtenue dans notre étude et le score le plus élevé (moyen de cette protéine dans les échantillons A $\beta$  et  $\beta$ -cristalline ( $\beta$ C) respectivement. Dans ce tableau sont indiquées les protéines décrites comme spécifiques des interactions d'A $\beta$  d'après (Verdier et al. 2005). Les deux dernières colonnes indiquent dans quel type d'échantillon elles ont été identifiées au moins une fois dans cette étude. En fond blanc les protéines spécifiques à A $\beta$  dans les deux études, en fond gris clair les protéines non spécifiques retrouvées aussi dans les échantillons  $\beta$ -cristalline, en fond gris foncé les protéines identifiées uniquement dans les échantillons  $\beta$ -cristalline dans cette étude, et en fond gris moyen les protéines jamais identifiées dans cette étude.

A la suite de la comparaison réalisée entre nos protéines et les protéines présentées dans la liste de 2005, nous avons pu identifier 34 protéines sur les 40 protéines appartenant à la liste. Parmi ces 34 protéines seules 8 sont identifiées comme étant spécifiques et partenaires de l'A $\beta$ . Les 26 protéines restantes sont identifiées dans les deux types d'échantillons.

La différence de résultats obtenus entre les deux types d'approches est vraisemblablement due à une meilleure sensibilité de l'étude actuelle, ce qui permet d'éliminer de nombreux faux négatifs. Nous pouvons supposer que certaines des protéines décrites à l'époque comme étant partenaires de l'A $\beta$ , pouvaient également montrer une affinité à la cristalline mais n'avaient pu être détectées. De plus l'étude publiée en 2005 portait sur une unique préparation réalisée à partir de 4 rats. Ici la préparation a été réalisée 6 fois avec un individu à la fois. Il faut donc tenir compte de la possibilité d'un effet inverse de pondération, qui peut favoriser des espèces abondantes dans un échantillon aberrant au détriment d'espèces mineures communes aux autres échantillons proches de la norme.

Afin de tenir compte de cette variabilité biologique nous allons donc considérer séparément les répliques biologiques.

Afin d'évaluer la robustesse de nos résultats et de diminuer le nombre de faux positifs nous avons pris en compte pour chaque protéine le nombre d'identifications en fonction des répliques biologiques et techniques. Cette distribution est représentée de façon matricielle dans la Figure 36.

		Nbre de protéines identifiées						
Nbre d'échantillons où la protéine est identifiée en interaction avec $\beta$ -crystalline	0	79	47	46	52	7	9	11
	1	12	9	8	12	4	6	14
	2	4	7	4	7	4	4	11
	3	27	2	0	7	4	2	14
	4	9	0	0	3	1	0	7
	5	3	0	0	1	4	0	15
	6	18	0	1	2	4	1	35
		0	1	2	3	4	5	6
		Nbre d'échantillons où la protéine est identifiée en interaction avec A $\beta$						

Figure 36 : Représentation matricielle des protéines identifiées en associées à A $\beta$  et /ou à la  $\beta$ -crystalline en fonction du nombre de rats dans lesquels elles sont identifiées

La matrice ci-dessus nous permet d'obtenir une vue globale des différentes protéines identifiées en fonction du nombre de rats dans lesquels elles ont été identifiées.

Nous avons premièrement tenu compte de la variabilité technique et considéré qu'une protéine est présente si elle est identifiée dans au moins 2 analyses LC-MS/MS sur 3 (correspondant aux triplicatas).

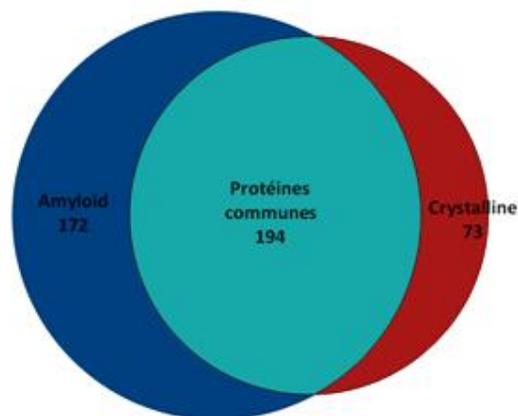


Figure 37 : Protéines identifiées après filtrage et présentes dans au moins 2 répliquas sur 3

Dans la Figure 37, nous avons repris les résultats en ne considérant que les 439 protéines identifiées deux fois sur les trois répliquas. Le nombre de protéines identifiées chute bien sûr en comparaison avec les

chiffres donnés par la Figure 35 : 79 protéines disparaissent. En revanche les scores d'identification minimum sont plus élevés : score le plus faible de 260 pour les 172 protéines spécifiques d'A $\beta$ , de 290 pour les protéines spécifiques de  $\beta$ -cristalline.

Pour évaluer si ces 439 protéines pouvaient être impliquées dans les mécanismes pathologiques conduisant à la maladie d'Alzheimer, nous avons réalisé 3 types d'études :

Nous avons cherché lesquelles de ces protéines avaient déjà été proposées comme pouvant interagir avec l'A $\beta$  1-42 ;

Nous avons réalisé une étude fonctionnelle de l'ensemble de ces protéines ;

Enfin nous avons regroupé ces protéines en fonction de leur localisation subcellulaire et de l'implication possible de celle-ci dans la maladie d'Alzheimer.

#### IV.8.4 Protéines déjà décrites comme pouvant interagir avec l'A $\beta$

Parmi les 439 protéines que nous avons identifiées lors de nos différentes expériences nous avons retrouvé 34 des 40 protéines de référence décrites dans la publication de 2005 comme étant des protéines partenaires de l'A $\beta$ . Cependant parmi ces protéines nous retrouvons des protéines à la fois liée à l'A $\beta$  mais également à la  $\beta$ -cristalline, ce qui remet en cause la spécificité de certaines protéines.

Afin de confronter notre identification aux données décrites dans la littérature nous avons soumis l'ensemble des protéines identifiées sans *a priori* à l'outil de recherche DAVID (Huang et al. 2009). Cet outil permet de réaliser une étude fonctionnelle des protéines dans un mélange complexe et de donner des informations telles que le type de tissu dans lequel sont retrouvées ces protéines, la localisation cellulaire et le type de pathologie dans lesquelles ces protéines sont impliquées.

Pour vérifier la probabilité des résultats une p-value est indiquée et permet de discriminer les informations proposées, plus la valeur de cette p-value sera faible et plus la « certitude » de l'information donnée sera importante. Cependant comme toute valeur statistique cette valeur ne peut être considérée fiable à 100 % mais ceci nous permet de classer les protéines en différents groupes.

La première étude consiste à soumettre l'ensemble des protéines à la base de données **KEGG pathway** (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Cette base de données créée en 1995 lors du programme japonais du génome humain représente les différentes voies métaboliques et biochimiques des systèmes biologiques décrits dans la littérature.

L'analyse de 439 protéines identifiées avec la base de données KEGG nous a permis d'identifier quatre pathologies possédant une p-value comprise entre  $10^{-18}$  et  $10^{-16}$ . Ces quatre pathologies sont décrites dans le tableau suivant (Tableau 4) :

Tableau 4: Pathologies ou métabolismes identifiées avec l'ensemble des protéines identifiées

Pathologie ou Métabolisme	Nombre de Protéines	Pourcentage	P-Value
Parkinson	37	8,5	1,50E-18
Huntington	42	9,7	2,90E-18
Phosphorylation oxydative	34	7,8	2,40E-16
Alzheimer	40	9,2	5,80E-16

Nous retrouvons parmi ces pathologies la maladie de Parkinson en premier candidat avec une p-value de  $1,5 \cdot 10^{-18}$  et 37 protéines identifiées, en deuxième candidat la maladie d'Huntington avec une p-value de  $2,9 \cdot 10^{-18}$  et 42 protéines identifiées.

Il s'agit de deux maladies neurodégénératives et il n'est pas étonnant de les trouver à ce niveau d'identification de plus des similitudes protéiques existent entre ces maladies (Sharma et al. 2010) ce qui entraîne une certaine concordance entre ces valeurs.

Concernant la phosphorylation oxydative ou chaîne respiratoire (P-value  $2,4 \cdot 10^{-16}$  et 34 protéines identifiées) il s'agit du mécanisme de production d'ATP au sein de la mitochondrie. Ce mécanisme a un rôle très important dans le cadre de la production d'énergie ainsi que dans le contrôle de l'apoptose (Sharma et al. 2011).

La maladie d'Alzheimer est présente en quatrième position avec 40 protéines et une P-value de  $5,6 \cdot 10^{-16}$ .

Nous allons dans un premier temps nous intéresser aux 40 protéines identifiées comme étant présente dans la voie métabolique de la maladie d'Alzheimer

Nous allons nous focaliser sur les différentes protéines identifiées dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

#### IV.8.5 Classification des protéines identifiées

##### IV.8.5.1 Protéines liées à la voie métabolique de la maladie d'Alzheimer.

Si nous nous intéressons au pathway de la MA comparée à l'ensemble des protéines que nous avons identifiées lors de nos analyses nous pouvons remarquer la présence de 40 protéines présente de façon significative au sein du pathway de la MA (KEGG Pathway) Ces différentes protéines ont été identifiées comme étant partenaires de l'amyloïde- $\beta$ , de la cristalline ou les deux à la fois. Cependant le fait que ces protéines soient parfois identifiées en absence du peptide amyloïde ne signifie pas une non-implication de celles ci dans le cadre de la maladie mais une affinité moindre pour ce peptide. Le tableau suivant définit dans quel type d'échantillon (amyloïde ou cristalline) ces protéines ont été identifiées.

Tableau 5 Protéines présentes dans le pathway de la maladie d'Alzheimer (KEGG Pathway). Les croix représentent le type d'échantillon dans lequel la protéine a été identifiée dans notre étude.

Sur fond blanc les protéines identifiées comme spécifiques à A $\beta$ , sur fond gris les protéines identifiées comme associées à A $\beta$  et à la  $\beta$ -cristalline fibrillaires ( $\beta$ C), sur fond gris clair les protéines identifiées dans notre étude comme associées à  $\beta$ C et pas à A $\beta$  fibrillaire.

PROTEINES	DESCRIPTION ORGANISME	A $\beta$	$\beta$ C
ATPD_RAT	ATP synthase subunit delta, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	
AT2A2_RAT	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 <i>Rattus norvegicus</i>	X	
NDUA5_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5 <i>Rattus norvegicus</i>	X	
NDUS6_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	
COX5B_RAT	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	
CX6A1_RAT	Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	
CX6C2_RAT	Cytochrome c oxidase subunit 6C-2 <i>Rattus norvegicus</i>	X	
HCD2_RAT	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 <i>Rattus norvegicus</i>	X	
TAU_RAT	Microtubule-associated protein tau <i>Rattus norvegicus</i>	X	
PLCB1_RAT	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1 <i>Rattus norvegicus</i>	X	
PP2BA_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform <i>Rattus norvegicus</i>	X	
NDUV3_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	
ATP5J_RAT	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	
DHSA_RAT	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	
DHSB_RAT	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	
A4_RAT	amyloid beta (A4) precursor protein <i>Rattus norvegicus</i>	X	
QCR6_RAT	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	
UCR1_RAT	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	
AT5F1_RAT	ATP synthase subunit b, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
ATPO_RAT	ATP synthase subunit O, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
ATPA_RAT	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
ATPB_RAT	ATP synthase subunit beta, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
NDUAA_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
NDUA9_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
NDUS1_RAT	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
NDUS2_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
NDUS4_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
NDUV2_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
CALM_RAT	Calmodulin <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
COX4I_RAT	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
NMDE2_RAT	Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-2 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
ATP5H_RAT	ATP synthase subunit d, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
QCR1_RAT	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
QCR8_RAT	Cytochrome b-c1 complex subunit 8 <i>Rattus norvegicus</i>	X	X
QCR2_RAT	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial <i>Rattus norvegicus</i>		
MK01_RAT	Mitogen-activated protein kinase 1 <i>Rattus norvegicus</i>		X
MK03_RAT	Mitogen-activated protein kinase 3 <i>Rattus norvegicus</i>		X
SYUA_RAT	Alpha-synuclein <i>Rattus norvegicus</i>		X

L'ensemble des protéines présentées ci-dessus peut être classé en fonction de leur localisation cellulaire. L'outil présent dans le site DAVID permet de visualiser les différentes localisations subcellulaires pour chacune des protéines proposées (voir Figure ci-dessous).

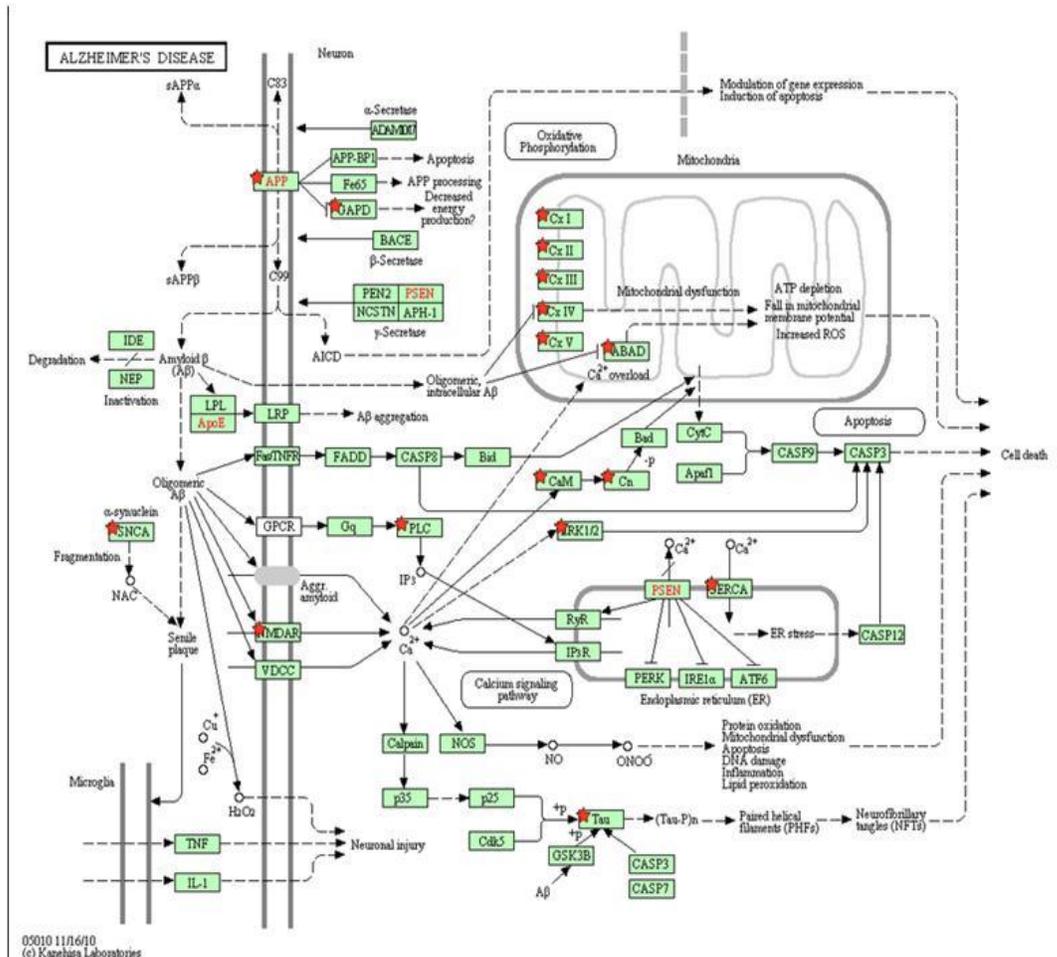


Figure 38 : Représentation subcellulaire des protéines identifiées dans la voie métabolique de la maladie d'Alzheimer

Cette représentation nous permet d'observer la localisation des protéines connues dans la littérature comme ayant un rôle dans la MA.

Le schéma ci-dessus représente les différentes protéines ou groupes de protéines connus à ce jour comme étant impliqués dans le pathway de la MA. Chacune de ces protéines est représentée selon la localisation subcellulaire et de sa fonction dans la cellule. Les différentes protéines portant une étoile rouge correspondent aux protéines que nous avons identifiées dans le cadre de notre étude. Il faut remarquer que certaines de ces protéines ont été aussi identifiées comme associées à la β cristalline dans notre étude et n'ont pas une spécificité Aβ. Nous reviendrons sur ces protéines dans la discussion, tout d'abord intéressons nous aux protéines identifiées exclusivement en présence d'Aβ.

#### IV.8.5.2 Protéines identifiées uniquement en présence du peptide amyloïde

Comme décrit précédemment dans la Figure 37 nous avons pu identifier après un premier tri un total de 172 protéines présentes exclusivement en présence du peptide amyloïde. Si nous utilisons uniquement les protéines identifiées en présence d'A $\beta$  1-42 pour l'étude dans le logiciel DAVID nous obtenons le tableau suivant :

Tableau 6 : Métabolisme ou pathologie présenté en fonction des protéines soumises à DAVID.

Pathologie ou Métabolisme	Nombre de Protéines	Pourcentage	P-Value
Phosphorylation oxydative	15	8,9	2,30E-06
Alzheimer	16	9,5	1,80E-05
Dégradation de Valine, Leucine	9	5,3	1,60E-05
Huntington	14	8,3	1,90E-04

L'utilisation des protéines uniquement identifiées en présence d'A $\beta$  permet de faire spécifiquement ressortir la maladie d'Alzheimer en deuxième position toujours derrière la phosphorylation oxydative. Dans ce cas précis 16 protéines sont comptabilisées dans le pathway de la MA. Ceci montre que la stratégie employée est bien cohérente avec les résultats obtenus dans la littérature. Les 16 protéines identifiées sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 7 Protéines identifiées en présence d'amyloïde  $\beta$  et présentes dans la voie métabolique de la maladie d'Alzheimer d'après le KEGG Pathway intégré à DAVID.

PROTEINE ID.	Maladie d'Alzheimer
UCRI_RAT	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1
HCD2_RAT	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10
COX5B_RAT	cytochrome c oxidase subunit Vb
TAU_RAT	microtubule-associated protein tau
CX6A1_RAT	cytochrome c oxidase, subunit VIa, polypeptide 1
NDUA5_RAT	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 5
CX6C2_RAT	cytochrome c oxidase, subunit VIc
PLCB1_RAT	phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)
DHSA_RAT	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
ATP2A2_RAT	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, cardiac muscle, slow twitch 2
DHSB_RAT	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip)
NDUFS6_RAT	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6
NDUFV3_RAT	similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase 9 kDa subunit, mitochondrial
ATP5J_RAT	similar to mitochondrial ATP synthase coupling factor 6; ATP synthase, H+
PP2BA_RAT	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform
QCR6_RAT	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein

Ce nombre de 16 protéines impliquées directement dans la maladie d'Alzheimer d'après les données du KEGG Pathway intégré à DAVID semble modeste, comparé aux 172 protéines identifiées au total

comme étant en interaction avec l'amyloïde  $\beta$  fibrillaire. En effet outre les 16 protéines citées ci-dessus, 156 protéines pourraient interagir directement ou indirectement avec le peptide amyloïde d'après nos résultats. Nous allons classer ces différentes protéines en fonction de leur localisation cellulaire et décrire leur rôle et leur activité au sein de la cellule.

Nous pouvons classer ces différentes protéines en fonction de leur localisation cellulaire. Ces différents groupes cellulaires sont les suivants :

- La mitochondrie
- Le réticulum endoplasmique
- Le cytoplasme
- La membrane plasmique
- Le milieu extracellulaire

La présence de ces différents groupes cellulaires n'est pas normalement attendue, en effet notre préparation devait contenir uniquement les membranes synaptosomales. La présence d'éléments mitochondriaux et autres compartiments cellulaires reflète une contamination. Cependant il est tout de même intéressant d'observer les interactions de ces différentes protéines avec l'A $\beta$  1-42.

#### IV.8.5.3 Protéines mitochondriales

Au total nous avons identifié 83 protéines mitochondriales associées exclusivement à l'A $\beta$ . Ces protéines sont présentées dans le tableau 8

Tableau 8 : Protéines mitochondriales identifiées exclusivement en présence du peptide amyloïde.

UNIPROT	Mitochondrie	RATS	SCORE
LETM1_RAT	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	6	601
ODO2_RAT	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)	6	208
AOFB_RAT	monoamine oxidase B	6	141
CX6C2_RAT	cytochrome c oxidase, subunit VIc	6	95
TOM70_RAT	translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> ); similar to translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A	6	502
UCRI_RAT	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	6	402
DHSA_RAT	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	6	641
USMG5_RAT	up-regulated during skeletal muscle growth 5 homolog (mouse)	6	211
HCD2_RAT	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10	6	494
OPA1_RAT	optic atrophy 1 homolog (human)	6	926

AOFA_RAT	monoamine oxidase A	5	345
SCPDH_RAT	saccharopine dehydrogenase (putative)	5	162
KAD4_RAT	adenylate kinase 3-like 1	5	229
SAM50_RAT	sorting and assembly machinery component 50 homolog (S. cerevisiae)	5	410
CX6A1_RAT	cytochrome c oxidase, subunit VIa, polypeptide 1	5	135
NDUA5_RAT	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 5	5	210
ATP5J_RAT	similar to mitochondrial ATP synthase coupling factor 6; ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F6	5	148
NDUV3_RAT	similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase 9 kDa subunit, mitochondrial precursor (Complex I-9KD) (CI-9KD); NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3, pseudogene 1; NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3	4	121
MFN2_RAT	mitofusin 2	4	511
GSTK1_RAT	glutathione S-transferase kappa 1	4	180
DHSB_RAT	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip)	4	229
ACSL6_RAT	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	4	621
THTR_RAT	thiosulfate sulfurtransferase, mitochondrial	4	255
ETFA_RAT	electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	3	399
FKBP8_RAT	FK506 binding protein 8, 38kDa	3	244
TIM44_RAT	translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog (yeast)	3	285
LONM_RAT	lon peptidase 1, mitochondrial	3	515
HS90A_RAT	similar to heat shock protein 1, beta; similar to Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84); heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	3	241
FAHD2_RAT	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2A	3	163
EAA1_RAT	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3	3	246
ACSF2_RAT	acyl-CoA synthetase family member 2	3	220
PHB_RAT	similar to prohibitin; prohibitin	3	78
AP2M1_RAT	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	3	150
NLRX1_RAT	NLR family member X1	3	165
PCCB_RAT	propionyl-coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide	3	323
MIRO2_RAT	ras homolog gene family, member T2	3	109
RAB3D_RAT	RAB3D, member RAS oncogene family	3	194
MCCB_RAT	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 2 (beta)	3	324
STML2_RAT	stomatin (Epb7.2)-like 2	3	191
KPCA_RAT	protein kinase C, alpha	3	138
PYC_RAT	pyruvate carboxylase	3	422
MMSA_RAT	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	3	199
NDUAB_RAT	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11	3	101
MCCA_RAT	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha)	3	230
ETFA_RAT	electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide	3	399
DNM1L_RAT	dynamamin 1-like	2	122
ACSL1_RAT	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	2	87
ALDH2_RAT	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	2	131
OXR1_RAT	oxidation resistance 1	2	127

PCCA_RAT	propionyl coenzyme A carboxylase, beta polypeptide	2	394
AL1B1_RAT	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	2	269
ES1_RAT	homolog of zebrafish ES1	2	168
COX5B_RAT	cytochrome c oxidase subunit Vb	2	134
CXA1_RAT	gap junction protein, alpha 1	2	96
SCMC2_RAT	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 25	2	123
CISD1_RAT	CDGSH iron sulfur domain 1	2	130
NFS1_RAT	NFS1 nitrogen fixation 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	2	148
RAB1B_RAT	RAB1B, member RAS oncogene family, pseudogene 1; RAB1B, member RAS oncogene family	2	227
PDK1_RAT	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	2	114
TOM22_RAT	translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	2	206
COQ5_RAT	coenzyme Q5 homolog, methyltransferase ( <i>S. cerevisiae</i> ); similar to CG2453-PA	2	83
GHC2_RAT	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier), member 18	2	117
NDUS6_RAT	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6	2	123
ARM10_RAT	armadillo repeat containing 10	2	356
HSDL1_RAT	hydroxysteroid dehydrogenase like 1	2	146
VATE1_RAT	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V1 subunit E1	1	64
MOSC2_RAT	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2	1	132
IVD_RAT	isovaleryl coenzyme A dehydrogenase	1	66
TMM11_RAT	transmembrane protein 11	1	91
QCR6_RAT	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	1	81
THTM_RAT	mercaptopyruvate sulfurtransferase	1	127
ATAD1_RAT	ATPase family, AAA domain containing 1	1	62
RMD3_RAT	family with sequence similarity 82, member A2	1	143
ADCK4_RAT	aarF domain containing kinase 4	1	72
DHB8_RAT	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8	1	87
RAB8B_RAT	RAB8B, member RAS oncogene family	1	157
CATB_RAT	cathepsin B	1	77
SSDH_RAT	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	1	40
LDHA_RAT	lactate dehydrogenase A; similar to L-lactate dehydrogenase A chain (LDH-A) (LDH muscle subunit) (LDH-M)	1	84
PHB2_RAT	prohibitin 2	1	160
HSDL2_RAT	hydroxysteroid dehydrogenase like 2	1	96
RT07_RAT	mitochondrial ribosomal protein S7	1	98
PP2BA_RAT	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform	1	78

Chacune des protéines identifiées ci-dessus est retrouvée dans un ou plusieurs rats selon la répétabilité biologique. Ces protéines ont chacune un rôle précis dans la cellule avec des fonctions qui leur sont propres. Nous pouvons classer ces différentes protéines mitochondriales selon leur fonction.

#### IV.8.5.3.1 Les protéines de la phosphorylation oxydative

Tableau 9: Différentes protéines de la phosphorylation oxydative et partenaires du peptide amyloïde

PROTEINES	Phosphorylation Oxydative	RATS	SCORE
DHSA_RAT	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	6	641
UCRI_RAT	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	6	402
CX6C2_RAT	Cytochrome c oxidase subunit 6C-2	6	95
CX6A1_RAT	Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial	6	135
NDUA5_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	5	210
ATP5J_RAT	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	5	148
DHSB_RAT	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	4	229
NDUV3_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial	4	121
NDUAB_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11	3	101
COX5B_RAT	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	2	134
COX2_RAT	Cytochrome c oxidase subunit 2	2	195
NDUS6_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	2	123
QCR6_RAT	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	1	81

#### IV.8.5.3.2 Les protéines du complexe d'importation des protéines mitochondriales

Tableau 10: Protéines des complexes d'importation des protéines mitochondriales

UNIPROT ID.	Transport mitochondrial	RATS	SCORE
TOM70_RAT	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	6	502
SAM50_RAT	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	5	410
TIM44_RAT	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	3	285
TOM22_RAT	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	2	206

#### IV.8.5.3.3 Les protéines de fusion mitochondriale

Tableau 11: Protéines de fusion mitochondriale

UNIPROT ID.	Transport mitochondrial	RATS	SCORE
OPA1_RAT	Dynamin-like 120 kDa protein	6	926
MFN2_RAT	Mitofusin-2	4	511

#### IV.8.5.3.4 Les protéines dégradant la valine, la leucine et l'isoleucine

Tableau 12 Protéines dégradant la valine, la leucine et l'isoleucine

UNIPROT ID.	Dégradation Leucine Valine Isoleucine	RATS	SCORE
HCD2_RAT	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10	6	494
MCCB_RAT	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 2 (beta)	3	324
MMSA_RAT	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	3	199
MCCA_RAT	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha)	3	230
PCCB_RAT	propionyl-coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide	3	323
AL1B1_RAT	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	2	269
PCCA_RAT	propionyl coenzyme A carboxylase, beta polypeptide	2	394
ALDH2_RAT	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	2	131
IVD_RAT	isovaleryl coenzyme A dehydrogenase	1	66

#### IV.8.5.3.5 Protéines liant le calcium

Tableau 13 : Protéines liant le calcium

UNIPROT ID.	Liaison du calcium	RATS	SCORE
SCMC2_RAT	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2	2	123
MICU1_RAT	Calcium uptake protein 1	2	146

#### IV.8.5.3.6 Protéine du métabolisme médicamenteux

Tableau 14 : Protéines du métabolisme médicamenteux

UNIPROT ID.	Métabolisme médicamenteux	RATS	SCORE
AOFB_RAT	monoamine oxidase B	6	141
AOFA_RAT	monoamine oxidase A	5	345
GSTK1_RAT	glutathione S-transferase kappa 1	4	180

#### Autres protéines

Tableau 15 Autres protéines mitochondriales également identifiées en présence d'A $\beta$

UNIPROT ID	Phosphorylation Oxydative	RAT S	SCOR E
LETM1_RAT	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	6	601
USMG5_RAT	up-regulated during skeletal muscle growth 5 homolog (mouse)	6	211
ODO2_RAT	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)	6	208
KAD4_RAT	adenylate kinase 3-like 1	5	229

#### IV.8.5.4 Les protéines du réticulum endoplasmique.

Une seule protéine du réticulum endoplasmique a pu être identifiée, il s'agit de la **Calcium transporting ATPase** ou **SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase**.

Tableau 16 : Protéine du réticulum endoplasmique identifiée en présence d'amyloïde

UNIPROT ID	Protéine du réticulum endoplasmique	RATS	SCORE
AT2A2_RAT	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	2	256

#### IV.8.5.5 Les protéines du cytoplasme

Tableau 17 : Protéines du cytoplasme identifiées en présence d'amyloïde

UNIPROT	Protéine du cytoplasme	RATS	SCORE
<b>PP2BA_RAT</b>	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	1	78
	<b>Organisation des microtubules</b>	RATS	SCORE
<b>TAU_RAT</b>	Microtubule-associated protein tau Rattus norvegicus	1	70
<b>MAP2_RAT</b>	Microtubule-associated protein 2 Rattus norvegicus	3	528

#### IV.8.5.5.1 Les protéines de la membrane plasmique

Tableau 18 : Protéines de la membrane plasmique identifiées en présence d'amyloïde.

UNIPROT ID	Protéines de membrane	RATS	SCORE
RALA_RAT	Ras-related protein Ral-A	6	143
RAC1_RAT	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	5	202
RP3A_RAT	Rabphilin-3A	5	327
RAB14_RAT	Ras-related protein Rab-14	3	190
PLCB1_RAT	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1	3	185
RAB3C_RAT	Ras-related protein Rab-3C	3	271
RAP1A_RAT	Ras-related protein Rap-1A	3	183
RAP1B_RAT	Ras-related protein Rap-1b	3	189
RAB3B_RAT	Ras-related protein Rab-3B	3	213
RAB7A_RAT	Ras-related protein Rab-7a	2	166
RAB1B_RAT	Ras-related protein Rab-1B	2	227
RAB18_RAT	Ras-related protein Rab-18	2	128
RAP2B_RAT	Ras-related protein Rap-2b	2	150
RAB1A_RAT	Ras-related protein Rab-1A	2	172
RAB8B_RAT	Ras-related protein Rab-8B	1	112

#### IV.8.6 Conclusion

L'utilisation du spectromètre de masse ESI-LIT-FTICR nous a permis d'identifier 172 protéines. Cependant ces protéines ne représentent qu'une partie des protéines détectées au total. En effet certaines protéines n'ont été identifiées que dans 1 seul rat alors que d'autres ont été identifiées dans au moins 3 rats sur les 6 rats analysés. Ceci nous pose un problème de l'interprétation des résultats et de leur reproductibilité biologique. Associées au problème de répétabilité technique ces paramètres conditionnent la validation des protéines identifiées.

Afin d'augmenter la couverture des séquences identifiées et d'augmenter la couverture du protéome des partenaires protéique du peptide amyloïde, nous avons développé au laboratoire le couplage LC-MALDI afin d'obtenir un autre mode d'ionisation des peptides. En effet la complémentarité entre l'ionisation MALDI et l'ionisation ESI a déjà été évoquée (Bodnar et al. 2003) il nous est paru intéressant de développer cette approche afin d'augmenter la couverture peptidique et la couverture du protéome.

Ce développement sera présenté dans la suite.

## IV.9 Optimisation du système LC-MALDI TOF/TOF

Remarque préliminaire : Les optimisations sur les échantillons de protéines co-précipitées avec l'A $\beta$  sont inenvisageables car les peptides très hydrophobes composant ces échantillons ne permettent pas de réaliser simplement des analyses et nécessitent un entretien des colonnes très poussé. Avant toute application à A $\beta$  nous avons donc travaillé sur d'autres échantillons complexes mais plus simples de mise en œuvre.

### IV.9.1 Spécificité du couplage LC-MALDI

Le couplage LC-MALDI contrairement au couplage LC-ESI n'est pas en ligne et se décompose en trois étapes : 1) la séparation chromatographique des peptides à travers la colonne analytique, 2) le dépôt de l'éluât réalisé grâce à un automate et 3) l'analyse avec le spectromètre de masse en ionisation MALDI. Le temps de séparation chromatographique est donc indépendant du temps de l'acquisition MS. Cette indépendance des temps entraîne une différence fondamentale pour une optimisation des différents paramètres d'analyse qui seront détaillés par la suite.

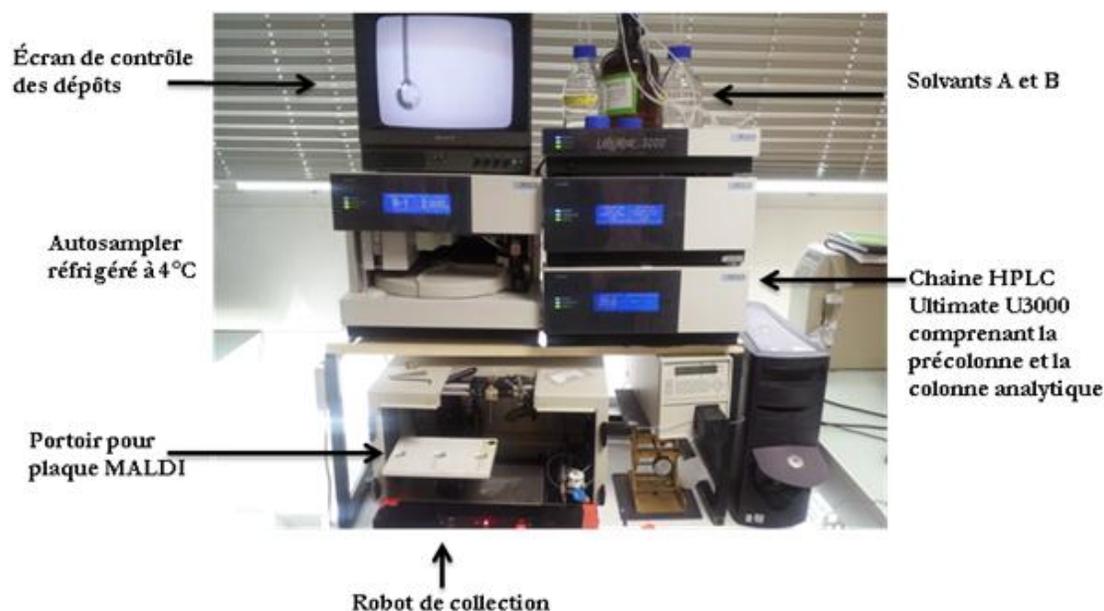


Figure 39 Système LC-MALDI utilisé au laboratoire comprenant la chaîne HPLC (modèle marque) et le système de collecte de fractions Probot (marque)

#### IV.9.1.1 Optimisation des dépôts MALDI

La concentration de matrice CHCA (cf. Matériels et Méthodes) utilisée pour les dépôts MALDI classiques au laboratoire est de 5 mg/mL. Cette concentration permet d'obtenir une cristallisation homogène. Cependant cette concentration peut ne pas être adaptée au système LC-MALDI. Plusieurs études en LC MALDI ont montré que la concentration de matrice peut varier entre 3 et 8 mg/mL. (Bodnar et al. 2003) (Zhen et al. 2004)

Afin d'obtenir le plus grand nombre de dépôts sur la plaque MALDI sans altérer leur qualité, nous avons dû adapter le rapport entre le débit de la chromatographie et le débit d'arrivée de matrice. Cette optimisation a eu pour but de pouvoir augmenter la capacité d'échantillonnage permettant le dépôt d'un grand nombre d'échantillons sur la plaque MALDI. Cette optimisation a également été pensée pour la réalisation de la 2D-LC MALDI. En effet le temps de collecte entre deux fractions étant très important nous avons réalisé plusieurs essais avec 3 temps de collecte différents, 5 secondes, 10 secondes et 30 secondes.

Les collectes toutes les 5 secondes permettent d'obtenir un bon échantillonnage des peptides mais nécessitent de nombreux dépôts ce qui malheureusement n'était pas compatible avec une analyse de multiples échantillons car elle nécessite beaucoup trop de points de collecte et n'est pas compatible avec nos formats de plaque ou une analyse 2D –LC MALDI. Les collectes de 30 secondes permettent d'obtenir un grand nombre de dépôts mais cette fréquence d'échantillonnage beaucoup trop longue entraîne une baisse de la résolution beaucoup trop importante ce qui perturbe la sélection des précurseurs et l'analyse MS/MS. L'échantillonnage de 10 secondes semble être le meilleur compromis entre la taille des spots, le nombre de spots pouvant être déposés sur la plaque et la largeur des pics ne dépassant pas la minute.

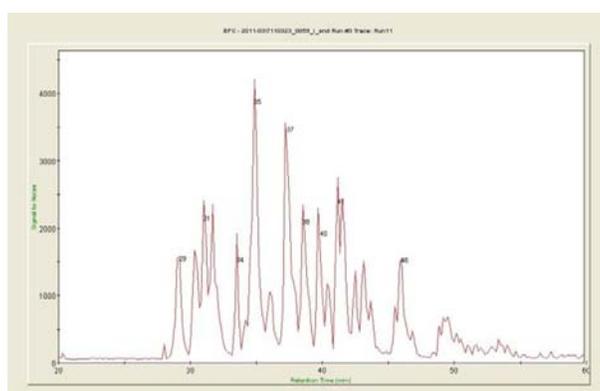


Figure 40 : Chromatogramme d'un échantillon standard de 20 fmol

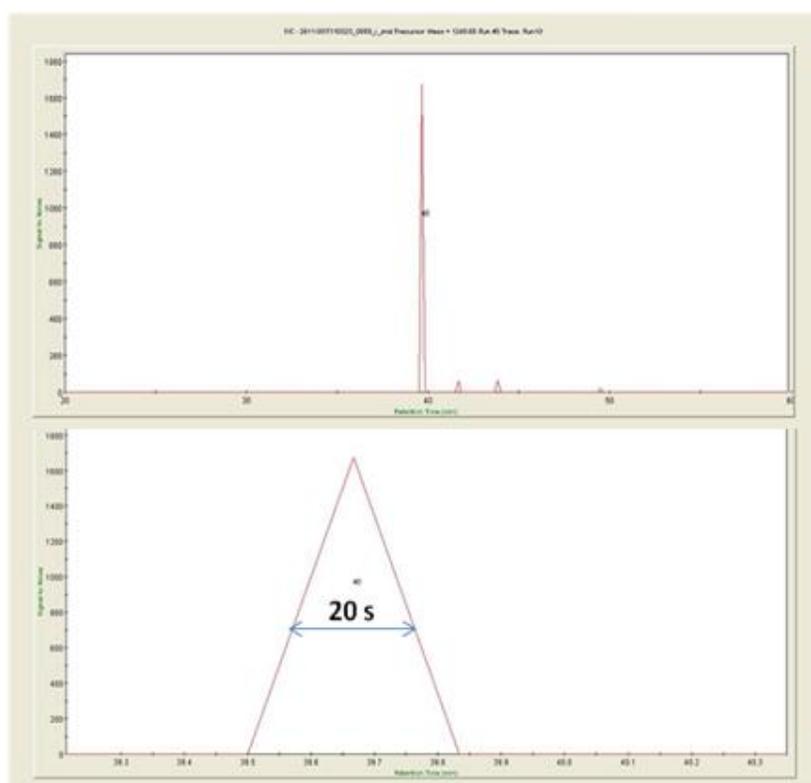


Figure 41 Largeur de pic à mi hauteur pour la masse 1249,68 Da identifiée en LC-MALDI-TOF/TOF

Nous avons également décidé d'utiliser la même concentration de 5 mg/mL afin de procéder à nos tests de dépôts. Le tableau ci-dessous présente les différentes concentrations.

Tableau 19: Les différentes conditions de collecte et de préparation des dépôts MALDI

Rapport Echantillon/Matrice	Débit Total Matrice + Colonne (µL/min)	Concentration Matrice (mg/ml)	Volume (µL)
1/1	0.440	2.5	0.07
1/2	0.660	3.33	0.1
1/3	0.880	3.75	0.14
1/4	1.100	4	0.18

Après de nombreux essais en réalisant divers dépôts sur la plaque MALDI, nous avons décidé de garder le rapport échantillon/matrice de 1/2. Ce rapport nous permet d'éviter une cristallisation en bout d'aiguille qui peut empêcher la bonne formation des dépôts. De plus les dépôts obtenus après collecte avec une concentration finale de 3.3 mg/mL nous permettent d'obtenir des dépôts d'une taille relativement faible (0,1 µL) ce qui permet une cristallisation de la matrice plus homogène. Cette homogénéité est indispensable pour une bonne analyse avec le spectromètre de masse car les tirs lasers étant aléatoires sur le MALDI-TOF/TOF une bonne répartition des cristaux de matrices est nécessaire.

#### IV.9.1.2 Optimisation du plan de plaque

Les premiers essais réalisés sur une plaque MALDI-TOF/TOF permettaient d'analyser uniquement 2 échantillons. Ceci était dû à l'utilisation d'un plan de plaque permettant le dépôt de 480 spots correspondant à deux séparations chromatographiques (*Tableau 20*). L'analyse de plusieurs échantillons sur une même plaque nous a contraints de créer un plan de plaque compatible avec l'analyse de nombreux échantillons mais également compatible avec une séparation de plusieurs fractions dans le cadre de la deuxième dimension d'une 2DLC (*Tableau 21*)

Tableau 20: Caractéristiques du plan de plaque comprenant 480 spots

Taille des spots	1,4 mm
nombres de colonnes en x	20
distance entre les centres de spots en x	3,2 mm
nombres de colonnes en y	24
distance entre les centres de spots en y	4 mm
nombre de spots totaux	480

Tableau 21: Caractéristiques du plan de plaque comprenant 2880 spots

Taille des spots	1 mm
nombres de colonnes en x	40
distance entre les centres de spots en x	1.56
nombres de colonnes en y	72
distance entre les centres de spots en y	1.37
nombre de spots totaux	2880

La réduction des espaces entre les spots nous a permis d'augmenter de 6 fois la capacité du nombre de spots déposé sur la plaque : avec cette optimisation de l'espace de la plaque MALDI nous pouvons désormais déposer 2880 spots ce qui correspond au dépôt de 12 échantillons différents.

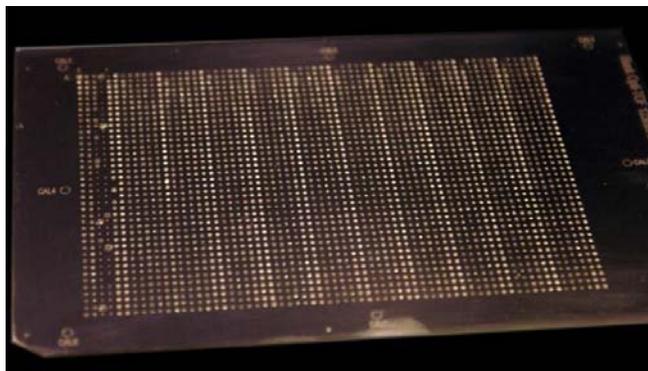


Figure 42 Photo d'une plaque MALDI-TOF/TOF avec 12 runs LC déposés.

Les schémas de plans de plaques présentés permettent de nous rendre compte de l'intérêt d'une telle optimisation.

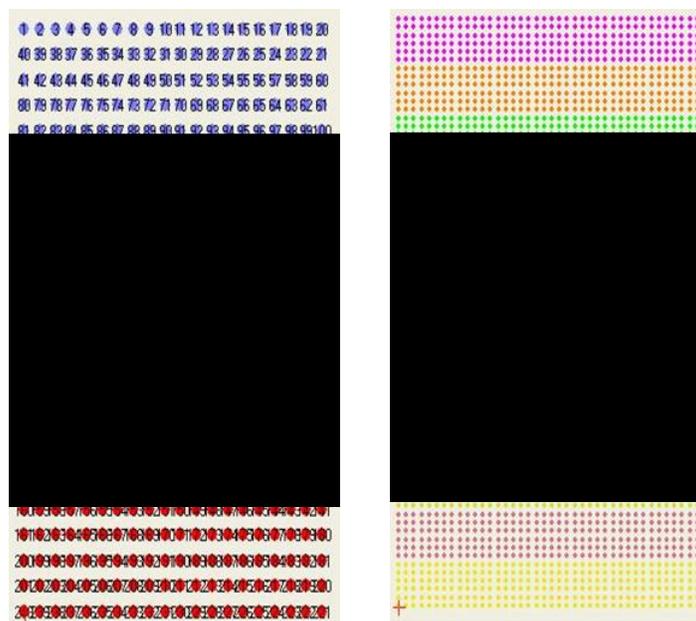


Figure 43 : Représentation des deux plans de plaque *utilisée au laboratoire*

*A gauche le plan de plaque permettant le dépôt de 480 spots soit 2 échantillons, à droite le plan de plaque permettant le dépôt de 2880 spots soit 12 échantillons*

L'ensemble des tests permettant l'optimisation du couplage LC-MALDI-TOF/TOF a été réalisé avec un mélange standard de 6 protéines. (cf. Matériels et Méthodes). Ce mélange utilisé en routine au laboratoire nous permet de comparer les résultats obtenus

#### IV.9.1.3 Détermination du nombre de précurseurs par spots

Un des points cruciaux de l'analyse MS/MS en LC-MALDI est la détermination du nombre de précurseurs par spots. En effet le choix du nombre de précurseurs va jouer un rôle déterminant pour l'identification des peptides et des protéines.

Deux problèmes se posent :

- Définir un nombre de précurseurs par spot trop faible ce qui aura pour incidence une mauvaise identification

- Définir un nombre de précurseurs trop élevé ce qui aura pour incidence une consommation rapide de la matrice.

Afin de déterminer le nombre de précurseurs par spot idéal nous avons réalisé plusieurs analyses avec 5, 7 et 12 précurseurs par spot. Le score moyen d'identification pour chacune des 6 protéines a été calculé pour les trois conditions. Les résultats obtenus à la suite de ces analyses nous permettent de déterminer le nombre de précurseurs idéal pour une analyse LC-MALDI.

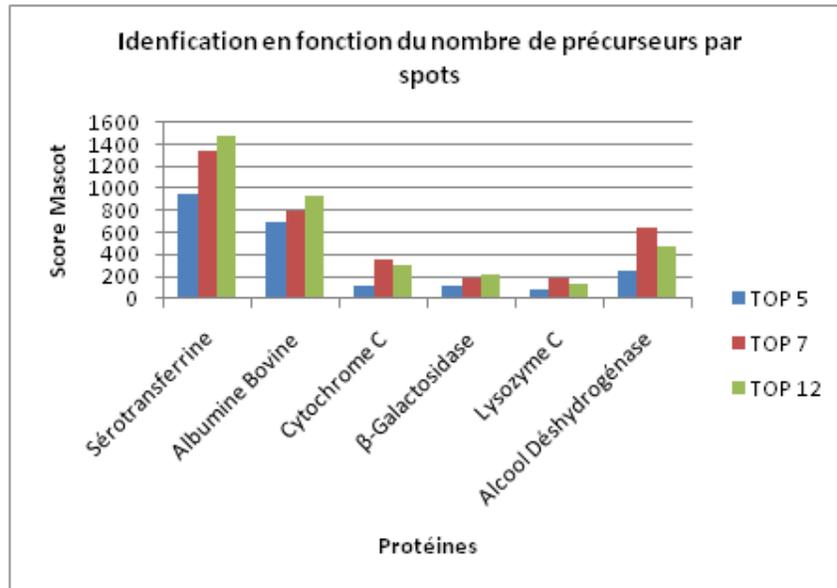


Figure 44: Score Mascot des différentes protéines du mélange standard en fonction du nombre de précurseurs par spot

Les résultats présentés ci-dessus nous montrent que le nombre de 5 précurseurs par spots semble insuffisant pour obtenir une identification comparable à une analyse avec 7 ou 12 précurseurs.

En revanche l'utilisation de 7 ou 12 précurseurs peut soulever le débat au regard des scores obtenus avec chacune des deux méthodes. En effet on remarque un score très élevé pour les premiers candidats avec la méthode à 12 précurseurs cependant pour les autres protéines on observe un score beaucoup plus faible, alors que la méthode à 7 précurseurs présente des résultats similaires mais avec un temps d'analyse moindre.

#### IV.9.1.4 Analyse PSD ou CID ?

Une des particularités du MALDI-TOF/TOF réside dans la possibilité de réaliser deux modes de fragmentation une fragmentation de type PSD (Post Source Decay) et une fragmentation CID (Collision Induced Dissociation). La fragmentation de type PSD repose sur la fragmentation dans la source des ions métastables à la suite d'une énergie du laser importante. Les ions produits avec ce type de fragmentation sont essentiellement des ions  $-b$  et  $-y$  rendant l'identification plus simple.

Contrairement à la fragmentation PSD, le CID permet d'obtenir des fragments dans les basses masses où sont visibles les ions ammoniums. Pour certains peptides cette information de séquence peut être importante et permettre de valider l'identification de certaines séquences.

Toujours dans l'optique de définir une méthode unique d'analyse en LC-MALDI-TOF/TOF nous avons décidé d'analyser notre mélange standard en utilisant la fragmentation de type CID et la fragmentation de type PSD. Les résultats obtenus avec les différents modes de fragmentations nous permettront de choisir le mode de fragmentation pour nos analyses. Sur la *Figure 45* on observe le nombre de peptides uniques identifiés pour chacune des protéines en fonction du mode de fragmentation.

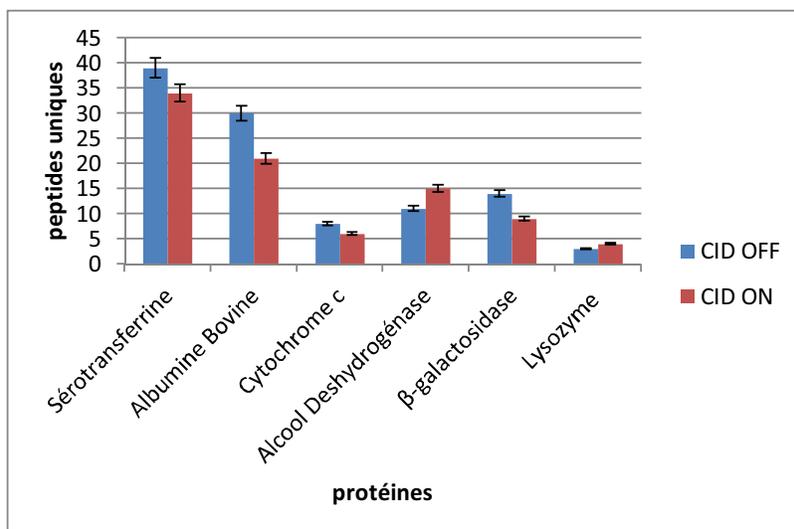


Figure 45: Nombre de peptides uniques identifiés pour chacune des protéines présentes dans le mélange standard LCP

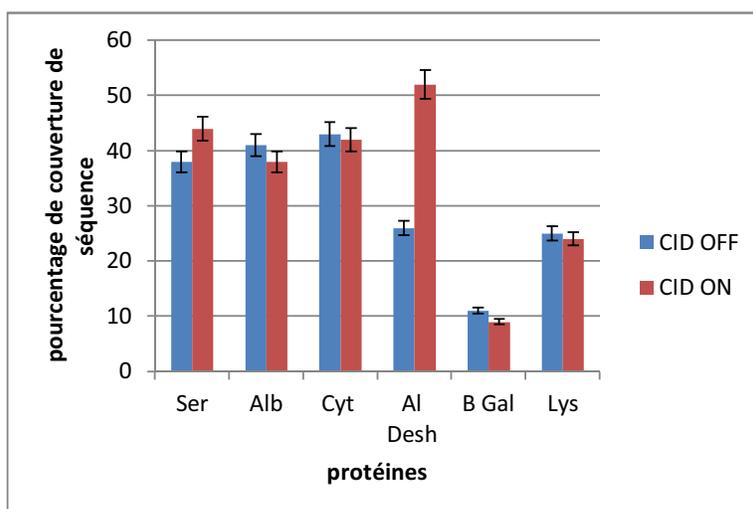


Figure 46: Pourcentage de couverture de séquence pour chacune des protéines présentes dans le mélange standard LCP

L'analyse d'échantillons en CID et PSD est relativement comparable, même si la tendance penche légèrement pour une analyse en mode PSD (CID off). Le nombre de peptides uniques et le pourcentage de couverture de séquence est légèrement supérieur en mode PSD, cela peut s'expliquer avec la présence de nombreux fragments b et y dans ce type de spectres contrairement au mode CID où les ions de basse masse sont majoritaires.

#### IV.9.1.5 Test de sensibilité de la LC-MALDI-TOF/TOF

Une concentration de 10 fmol/ $\mu$ L de LCP est utilisée au laboratoire pour valider l'ensemble des échantillons analysés en spectrométrie de masse. Pour cela 2  $\mu$ L sont injectés afin de déterminer la sensibilité de l'approche LC-MALDI-TOF/TOF nous avons réalisé des dilutions successives afin d'obtenir une concentration minimale de 187 amol/ $\mu$ L à 10 fmol/ $\mu$ L.

##### IV.9.1.5.1 Nombre de MS/MS par échantillons

Le MALDI-TOF/TOF présent au laboratoire utilise un système de sélection des précurseurs automatique. Cette sélection est réalisée post MS ce qui permet au logiciel de sélectionner les précurseurs les plus intenses en évitant toute redondance.

Les différentes caractéristiques permettant la sélection des précurseurs sont les suivantes :

- Le nombre de précurseurs par spot analysé
- L'intensité du rapport signal/bruit (dans notre cas le rapport minimum est de 40)
- L'exclusion dynamique entre 2 spots

Le dernier point est très important car il permet d'éviter la fragmentation d'un précurseur plusieurs fois ; en effet si un précurseur est fragmenté dans un spot donné il ne pourra pas être fragmenté dans les 2 spots suivants. Ceci permet la discrimination entre 2 précurseurs identiques et 2 précurseurs de masses très proches.

En fonction des différentes concentrations analysées nous avons pu observer le nombre de précurseurs sélectionnés pour la fragmentation en MS/MS.

Tableau 22: Nombre de MS/MS réalisée pour chacune des concentrations de LCP déposées sur la plaque MALDI

LCP (6protéines digérées)							
Concentration fmol/ $\mu$ L	0.187	0.375	0.75	1.25	2.5	5	10
Volume injecté $\mu$ L	2						
Nombre de MS/MS	87	97	196	182	201	216	248

Nous remarquons que le nombre de MS/MS réalisées augment sensiblement en fonction de la concentration de LCP déposée. Ceci semble normal car le critère de sélection des précurseurs pour la MS/MS dépend du rapport signal/bruit détecté.

Plus la concentration du mélange protéique augmente et plus les différents peptides auront tendance à acquérir un rapport signal /bruit élevée pouvant conduire à une sélection pour une MS/MS.

L'analyse de chacun des échantillons de LCP nous permet de déterminer le nombre de peptides uniques identifiés par Mascot. Le nombre de peptides identifiés nous donnera dans un premier temps un rapport entre le nombre de précurseurs sélectionnés et la validité des spectres obtenus en MS/MS

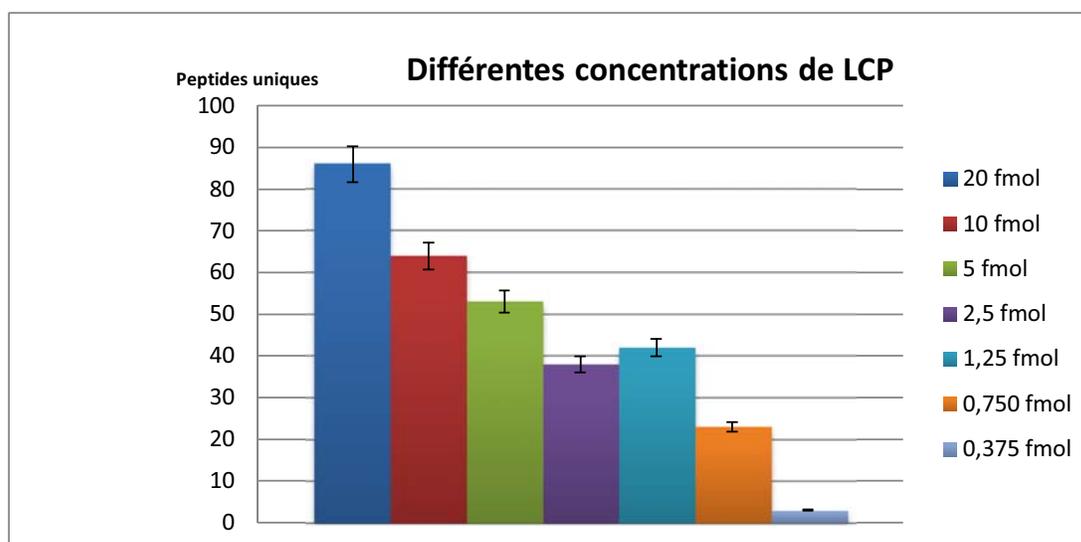


Figure 47: Nombre de peptides uniques identifiés par Mascot pour les différentes concentrations du mélange standard LCP déposé sur la plaque MALDI

Comme prévu le nombre de peptides uniques identifiés par Mascot augmente en fonction de la quantité de LCP déposé sur la plaque MALDI. Cependant le nombre de peptides uniques présentés correspond uniquement aux peptides totaux validés par Mascot sans seuil.

Le seuil de validation des peptides au laboratoire dépend du score calculé par Mascot l'ensemble des peptides identifié par Mascot n'est validé que si son score est supérieur ou égal à 30. Cette valeur nous permet de supprimer les MS/MS n'ayant pas un nombre de fragments b ou y suffisant pour obtenir un séquençage correct.

La détermination réelle de la sensibilité de l'approche LC-MALDI-TOF/TOF pour l'échantillon standard de LCP se fera après la validation des peptides ayant un score supérieur à 30. De par ce fait le nombre de peptides uniques pour chacune des quantités et la validation définitive pourra être établie.

Pour chacune des quantités analysées en LC-MALDI-TOF/TOF nous déterminons la validité de l'analyse si les 6 protéines présentes dans le mélange standard LCP sont identifiées.

Le tableau 23 représente chacune des analyses avec le nombre de protéines identifiées ainsi que le score de la première protéine. Le score de la première protéine identifiée nous sert de valeur référence pour la validation du système HPLC + Spectrométrie de masse.

Tableau 23: Nombre de protéines identifiées après validation pour chacune des quantités déposées.

Quantités	Nombre de protéines identifiées	Score du 1er candidat
20 fmol	6	1123
10 fmol	6	636
5 fmol	6	422
2,5 fmol	5	286
1,25 fmol	5	209
0,75 fmol	3	256
0,375 fmol	0	0

Sous la barre des 5 fmol de LCP déposé les 6 protéines contenues dans le mélange ne sont plus identifiées. Ceci ne signifie pas une absence de la protéine, mais un score insuffisant pour nos critères de validation. En effet sans tenir compte des critères de validation imposés au laboratoire nous parvenons à identifier les 6 protéines du LCP avec une quantité de 1,25 fmol.

#### IV.9.1.6 Mesure de la stabilité de la précision de masse dans le temps.

La communauté scientifique recommande de réaliser 3 essais consécutifs pour valider une expérience. Ce type d'analyse est également valable pour la spectrométrie de masse. Sachant que nous avons adapté notre plan de plaque afin qu'il puisse contenir jusqu'à 12 échantillons il était donc nécessaire de vérifier la stabilité de la précision de masse de l'appareil dans le temps.

Comme décrit dans le chapitre précédent (matériel et méthodes), pour l'ensemble des données LC-MALDI-TOF/TOF la tolérance de masse appliquée est de 50 ppm. Cette tolérance de masse est la valeur maximum acceptable pour ce type d'appareil, il est essentiel de garder tout au long de l'analyse LC-MALDI une valeur inférieure à celle-ci.

Pour observer la stabilité nous avons analysé trois échantillons standards successivement avec une seule calibration au préalable. Le but de cette expérience est de vérifier qu'une seule calibration est nécessaire pour lancer trois analyses consécutives sans dépasser le seuil critique des 50 ppm.

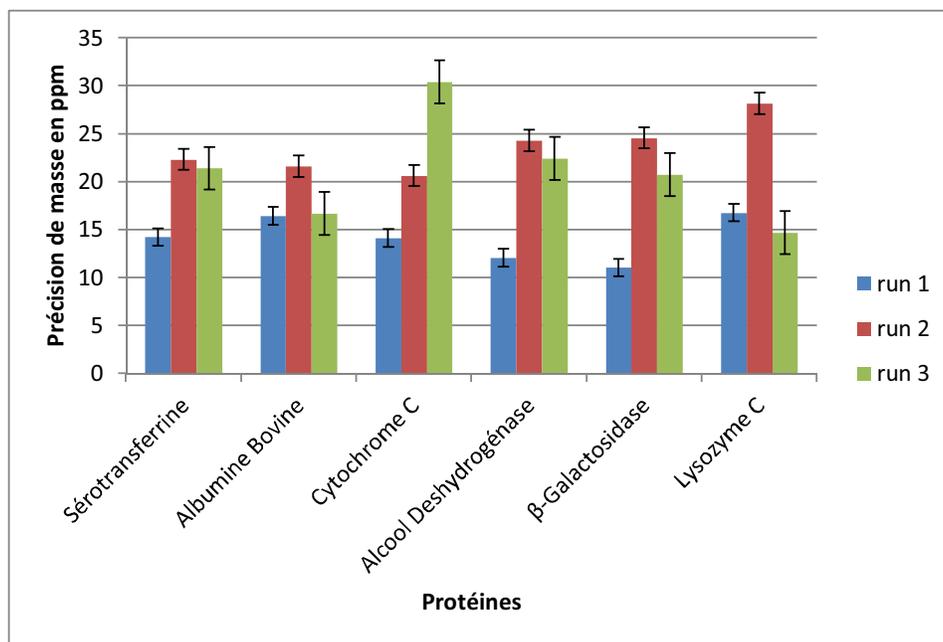


Figure 48: Variation de la précision de masse au cours du temps.

Le temps est représenté par le nombre de runs LC, dans le cas précis il s'agit de 3 runs

La première analyse représentée en bleu a démarré quelques minutes après la calibration par défaut réalisée sur l'appareil. On remarque une précision de masse moyenne de 15 ppm pour l'ensemble des protéines du mélange. La deuxième analyse qui a débuté environ 1 heures 40 plus tard présente une perte de précision de l'ordre de 10 ppm. Cette diminution de la précision de masse est normale car elle diminue avec le temps, cependant comme nous pouvons le remarquer il n'y a pas de grandes différences de variations entre le run 2 et le run 3 dans certains cas la précision de masse obtenu pour le run 3 se rapproche de la précision de masse du run 1.

Cette expérience nous montre que nous pouvons réaliser 3 analyses consécutives sans dépasser la valeur critique de 50 ppm. Toutefois pour des expériences plus longues de type LC2D MALDI ou pour l'analyse de plus de 3 échantillons une nouvelle calibration s'impose. La solution la plus adaptée pour obtenir une précision de masse plus importante et constante au cours du temps reste l'utilisation d'un calibrant interne présente dans la matrice.

#### IV.9.1.7 Analyse multiple d'un même échantillon

Un des intérêts majeurs de la LC-MALDI est la possibilité d'analyser plusieurs fois le même échantillon contrairement au couplage électrospray où l'échantillon est définitivement perdu.

Cet intérêt est un avantage énorme car il permet dans un premier temps d'économiser de précieux  $\mu\text{L}$  ou  $\text{mL}$  d'échantillons qui parfois sont longs et fastidieux à obtenir. De plus cette approche permet de revenir sur une ou plusieurs MS ou MS/MS pour la validation d'une séquence particulière.

Les créations de listes d'exclusions directement réalisées à partir de la première analyse est également possible. L'ensemble de ces avantages font du couplage LC-MALDI une technique de choix.

Afin de vérifier si cette analyse multiple est possible nous avons analysé 4 fois le même échantillon standard en réalisant pour chaque analyse le cycle MS + MS/MS.

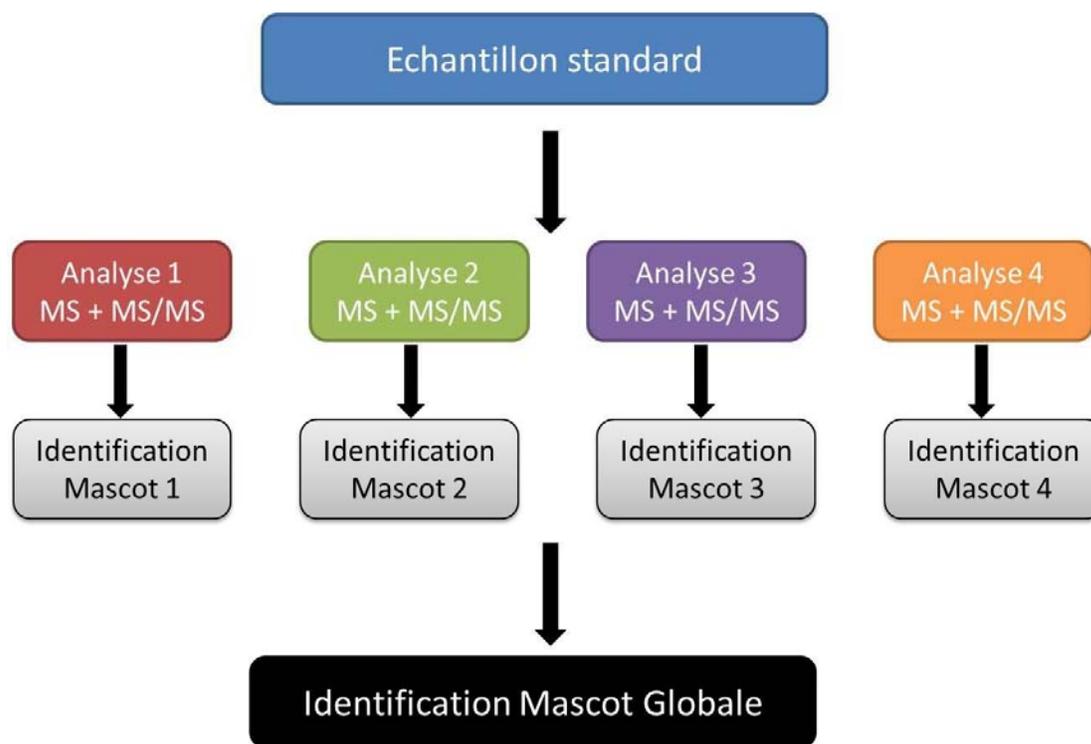


Figure 49 : Stratégie de l'analyse multiple. L'échantillon est séparé par LC et collecté sur une plaque MALDI. Puis il est analysé successivement quatre fois. Chaque analyse est traitée en parallèle en effectuant les recherches dans les banques avec Mascot pour identification des protéines.

Cette stratégie d'analyse porte un double intérêt, dans un premier temps elle nous permet de valider la possibilité d'analyser plusieurs fois le même échantillon, elle permet également d'observer si un gain de peptides est obtenu en multipliant les analyses.

Dans cette étude nous nous baserons uniquement sur le nombre de peptides identifiés avec nos critères de sélection (2 peptides avec un score minimum de 30) pour chacune des 6 protéines du mélange standard. Les résultats de chaque analyse sont présentés figure 50.

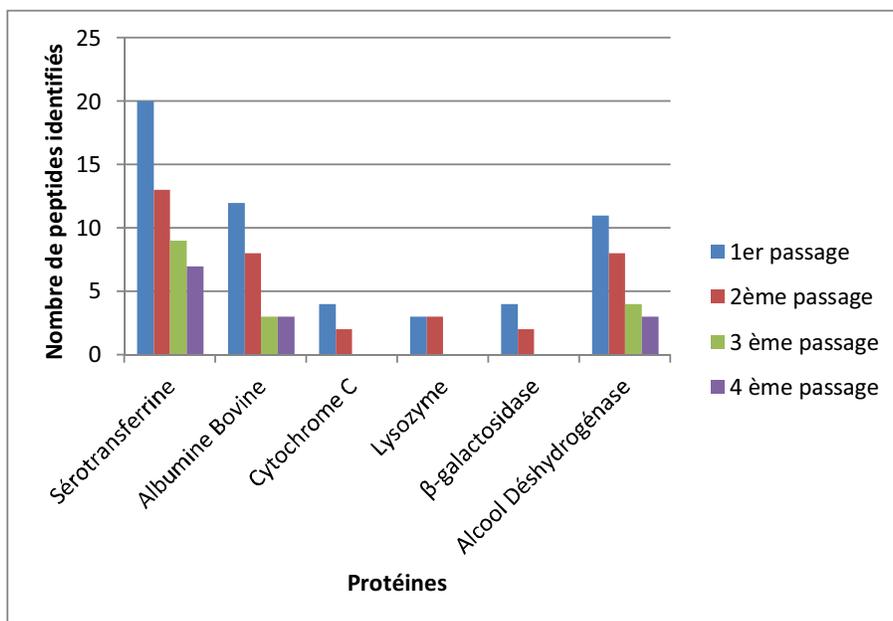


Figure 50 : Analyse des peptides identifiés après 4 passages successifs.

Nous pouvons observer dans un premier temps une diminution du nombre de peptides identifiés au fur et à mesure des passages. Cette diminution normale est due à la consommation de l'échantillon à la suite de l'analyse MS et des nombreuses analyses MS/MS réalisées sur chaque spot.

Sur les 4 analyses réalisées avec l'échantillon standard seules les deux premiers passages permettent d'identifier les 6 protéines. En revanche trois protéines (La sérot transferrine, l'albumine bovine et l'alcool déshydrogénase) sont identifiées lors des 4 passages. La limite de détection des 6 protéines du mélange est de 2 passages successifs, cependant 4 passages successifs ne sont pas suffisant pour consommer la totalité de l'échantillon.

A la suite de ces analyses nous avons également décidé de combiner les recherches Mascot des 4 passages afin d'observer une probable augmentation du nombre de peptides total comparé au premier passage.

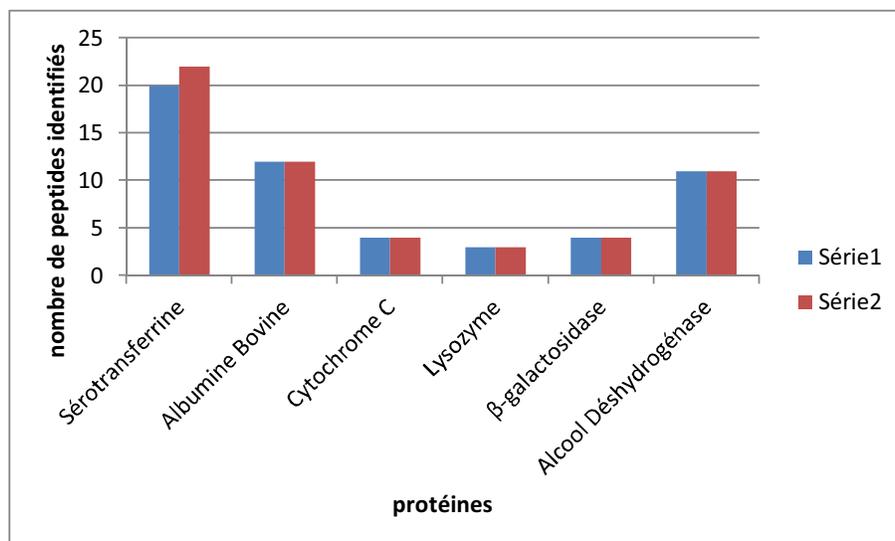


Figure 51 : Comparaison entre le nombre de peptides identifiés pour le 1er passage (série 1) contre les 4 passages combinés (série 2)

Nous pouvons remarquer une légère amélioration du nombre de peptides identifiés en associant les 4 analyses ensemble. Cette amélioration est visible uniquement pour la sérotransferrine où 20 peptides sont identifiés pour une analyse unique et 22 peptides avec les 4 analyses. Le 21<sup>ème</sup> peptide fut identifié dans la troisième analyse et le 22<sup>ème</sup> peptide dans la quatrième analyse. Ce type d'analyse nous montre la possibilité de réaliser des analyses basées sur des listes d'exclusion à partir du même échantillon et des mêmes dépôts.

Ces résultats ne sont pour autant pas surprenants car la méthode d'analyse du MALDI-TOF/TOF est basée sur des tirs lasers aléatoires ce qui rend l'ionisation de certains peptides comparable à une étude statistique. En effet les analyses multiples d'un même échantillon nous montrent le caractère aléatoire de certaines identifications de plus le score de certains peptides se voit augmenter avec le nombre d'analyses réalisées.

#### IV.9.2 Marquage au dansyle et amélioration du signal en LC-MALDI

Comme souligné dans l'introduction, l'évolution technologique des spectromètres de masse de type MALDI-TOF/TOF a favorisé le développement de la LC-MALDI car il est possible d'obtenir un grand nombre de MS/MS en fragmentation PSD ou CID. Ce type d'approche permet de réaliser des stratégies d'analyses complémentaire ESI versus MALDI pour augmenter la couverture du protéome (Mollé et al.2009).

Bien que les mécanismes d'ionisation du MALDI ne soient pas encore tout à fait compris, il est reconnu que l'efficacité d'ionisation MALDI dépend de la nature des peptides, et est plus particulièrement favorable à l'ionisation des peptides possédant des groupes hydrophobes. Nous pouvons citer l'exemple des groupements aromatiques qui favorisent l'ionisation en facilitant le transfert d'énergie laser à l'analyte (Valero et al. 1999). Afin d'améliorer l'ionisation des peptides en MALDI, de nombreuses expériences de

dérivation chimique ont été réalisées. Il a été montré que la lysine en position C-terminale donne un rendement beaucoup plus faible qu'une arginine en position C-terminale en raison de la basicité du groupe ε-amine. Afin d'obtenir une ionisation plus forte la lysine peut être convertie en homoarginine (Brancia et al. 2000). Cette conversion a permis une augmentation relative des peptides marqués accompagnée d'un affaiblissement des rendements de fragmentation. Au contraire un acide fort en position N-terminale n'est pas particulièrement favorable à l'ionisation, mais contribue à une amélioration de la fragmentation en PSD. L'utilisation des deux approches combinées a été réalisée et montre l'intérêt de ce type de fragments dans le transfert d'énergie (Pashkova et al. 2005)

En 2005 Park (Park et al. 2005) présenta des travaux permettant une augmentation du rapport signal/bruit dans le cadre d'analyse en PMF en utilisant le chlorure de dansyle. Ce réactif fluorescent largement utilisé en biochimie modifie le groupement amine primaire des protéines et des peptides pour le séquençage en N-terminal. Dans notre étude nous avons utilisé le chlorure de dansyle afin d'étudier les caractéristiques de fragmentation des peptides dansylés, mais également de confirmer les observations de Park concernant l'amélioration du rapport signal/bruit dans un mélange complexe (Park et al. 2005).

#### IV.9.2.1 Validation de l'augmentation du signal MS après marquage au dansyl sans chromatographie.

Dans un premier temps nous avons utilisé l'albumine de sérum bovin (BSA) pour valider le marquage et reproduire les résultats des travaux de Park (Park et al. 2005). Nous avons pu remarquer un gain du signal MS pour certains peptides et l'identification de peptides non visibles dans l'échantillon contrôle (Tableau 24)

Tableau 24 : Comparaison des identifications peptidiques de la BSA contrôle et BSA dansylée en MS/MS. Les peptides sans score représentent les peptides fragmentés manuellement.

	<i>Masse</i>	<i>Sequence</i>	<i>Score</i>	<i>Masse</i>	<i>Sequence (Peptides Dansylés)</i>	<i>Score</i>
<b>Peptides Communs</b>	712.3	SEIAHR	-	945.4	SEIAHR	21.3
	927.4	YLYEIAR	37	1160.5	YLYEIAR	22
	1001.5	ALKAWSVAR	40	1234.6	ALKAWSVAR	36
	1419.7	SLHTLFGDELCK	48.3	1652.6	SLHTLFGDELCK	-
	1439.7	RHPEYAVSVLLR	42	1672.7	RHPEYAVSVLLR	-
	1479.8	LGEYGFQNALIVR	54	1712.8	LGEYGFQNALIVR	76
	1567.7	DAFLGSFLYEYSR	52	1800.7	DAFLGSFLYEYSR	58
	1639.8	KVPQVSTPTLVEVSR	32	1957.8	MPCTEDYLSLILNR	44
	1724.8	MPCTEDYLSLILNR	51	2105.9	*KVPQVSTPTLVEVSR	38
	2004.8	VASLRETYGDMADCEK	28	2237.9	VASLRETYGDMADCEK	36
					K	

<i>Peptides Uniques</i>	1305.7	HLVDEPQNLIK	41	714.3	FGER	29
	1795.7	DDPHACYSTVFDKLLK	-	778.3	VASLR	-
	1880.9	RPCFSALTPDETYVPK	27	805.3	QRLR	-
	1907.9	LFTFHADICTLPDTEK	36	842.3	AFDEK	-
	1927.7	CCAADDKEACFAVEGPK	-	882.3	IETMR	-
	2045.0	RHPYFYAPELLYYANK	-	891.3	QEPER	-
	2113.9	VHKECCHGDLLCADDR	23	939.3	CASIQK	26
	2148.0	LKPDPNTLCDEFKADEKK	-	922.3	AWSVAR	-
	2247.9	ECCHGDLLCADDRADLAK	-	1022.4	LVTDLTK	-
	2277.1	LFTFHADICTLPDTEKQIK	29	1051.4	ATEEQLK	34
	2487.1	YNGVFQECQAEDKGACLLPK	-	1139.5	IETMREK	-
	2492.2	GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	-	1301.4	QNCDQFEK	28
	2541.2	QEPERNECFLSHKDDSPDLPK	28	1371.4	CCTESLVNR	18
	2612.2	VHKECCHGDLLCADDRADLAK	19	1524.6	ECCDKPILLEK	-
				1659.8	DTH*KSEIAHR	-
				1632.7	CCT*KPESER	39
				1676.6	YICDNQDTISSK	40
			1696.8	TCVADESHAGCEK	45	

L'amélioration du signal en MS/MS est visible sur la Figure 52 avec une augmentation des signaux des fragments MS/MS. La série des fragments N-terminaux b apparaît clairement après dansylation. Elle est de plus décalée à cause de la modification dansyle.

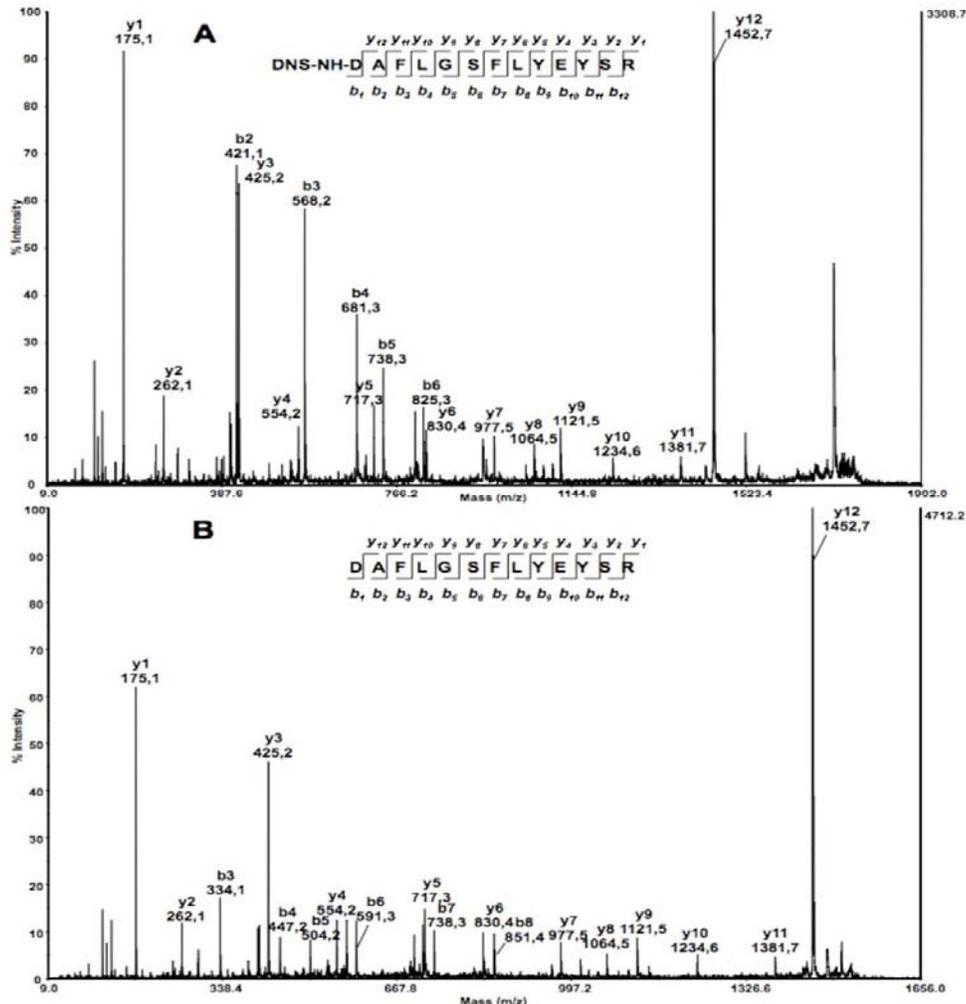


Figure 52 : Comparaison du spectre MS/MS du peptide DAFLGSLFLYEYSR. (A) spectre du peptide dansylé avec augmentation des fragments B. (B) spectre du peptide non dansylé.

La dansylation de la BSA permet d'obtenir un nombre plus élevé de peptides. Une amélioration MS et MS/MS est démontrée.

#### IV.9.2.2 Marquage au Dansyle d'échantillons d'*E.coli* pour l'analyse LC-MALDI-MS/MS

La stratégie de dansylation a été appliquée à un mélange de protéines plus complexe, d'extrait de protéines solubles d'*Escherichia coli*. Cet échantillon est marqué au dansyle et sera comparé au même échantillon sans marquage. Ceci nous permet de montrer que l'analyse d'échantillons complexes marqués en LC-MALDI-TOF/TOF permet d'augmenter la couverture du protéome grâce à l'amélioration des spectres MS/MS.

La recherche des analyses combinées a permis l'identification de 79 protéines, parmi ces protéines six sont identifiées exclusivement avec dansylation. Quinze protéines sont identifiées uniquement en cumulant les données des peptides non marqués et des peptides dansylés.

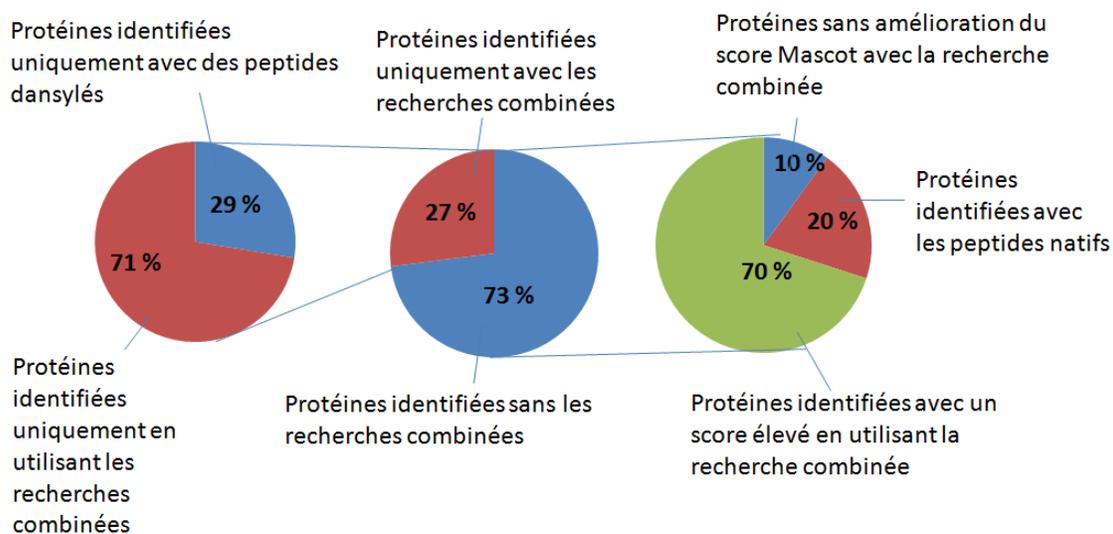


Figure 53 : Bilan de l'identification des 79 protéines en utilisant la dansylation afin d'augmenter la couverture du protéome.

L'utilisation du chlorure de dansyle permet d'augmenter sensiblement le nombre de protéines et de peptides d'un échantillon. L'augmentation des signaux des fragments b entraîne une meilleure identification des peptides sous Mascot. L'utilisation de ce type de réactif donne un intérêt supplémentaire à l'analyse LC-MALDI et permet de repousser les limites d'identifications des protéines et des peptides.

#### IV.9.3 Conclusion

L'intérêt de la dérivation avec le chlorure de dansyle a été démontré lors de cette étude son utilisation dans le cadre d'analyses en LC-MALDI permet d'obtenir des MS/MS de meilleures qualités sans entraîner une consommation excessive de l'échantillon. De plus la complémentarité de cette technique avec une analyse classique nous montre la possibilité d'augmenter l'identification peptidique et l'augmentation du protéome. L'utilisation de cette technique chimique avec la LC-MALDI s'avère donc très utile.

## IV.10 La configuration MALDI LTQ Orbitrap

L'arrivée au laboratoire d'une source MALDI pour le spectromètre de masse Orbitrap a offert la possibilité d'associer les avantages de l'ionisation MALDI et la précision de masse de l'analyseur Orbitrap.

La première idée a été de réaliser des analyses de cartographie peptidique, en effet la grande limitation des analyses de cartographie peptidique sur les appareils de type MALDI-TOF/TOF est la précision de masse. Une erreur de masse trop importante rend la cartographie délicate et la validation de protéines quasi impossible. La précision de masse de l'analyseur Orbitrap qui est inférieure à 5 ppm en routine rend l'identification de peptides en utilisant la cartographie peptidique beaucoup plus précise.

### IV.10.1 Le MALDI-Orbitrap et la cartographie peptidique

Nous avons dans un premier temps réalisé une cartographie peptidique à partir d'un échantillon standard de sérum albumine bovine Figure 54.

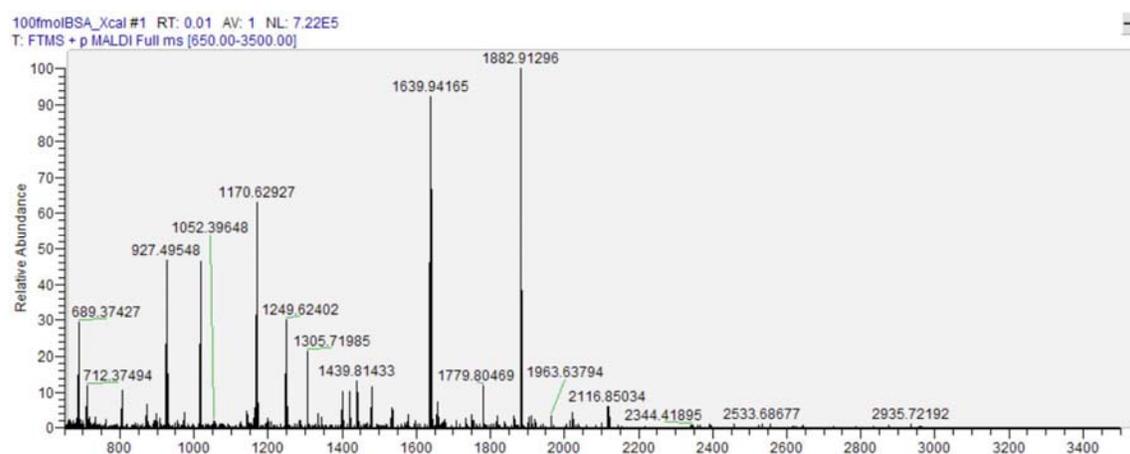


Figure 54: Spectre MALDI Orbitrap d'un échantillon de sérum albumine bovine pour une analyse en cartographie peptidique

Afin d'obtenir les masses les plus précises possible l'ensemble des peptides présents est analysé en FTMS en utilisant l'Orbitrap dans une gamme de masse comprise entre 650 et 3500 Da. Les différentes masses mesurées sont confrontées aux digestions *in silico* présentes dans les bases de données protéiques. Les résultats obtenus après analyse Mascot sont présentés en Figure 55.

## Protein View

Match to: ALBU\_BOVIN Score: 57 Expect: 0.84  
Serum albumin precursor - Bos taurus (Bovine)  
Found in search of New Text Document.txt  
Nominal mass (M<sub>0</sub>): 69248; Calculated pI value: 5.82  
NCBI BLAST search of **ALBU\_BOVIN** against nr  
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Bos taurus](#)

Variable modifications: Carboxymethyl (C), Oxidation (M)  
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
Number of mass values searched: 80  
Number of mass values matched: 19  
Sequence Coverage: 31%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MGVVTFISLL LFFSAYSARG VFRDRTHKSE IAHRFEDLGE EHFQGLVIA
51 FSQILQQCFP DEHVVLVNEL TEPARTCVAD ESHAGEKSL HTLFGDELCK
101 VASIRETYGD MADCCIQEFP EREKPLSRK DSDPLFLK DDFWLCDFP
151 KADEKFKNGK YLYEIAARHE FYAPPELLY ANKNGVFOE CCOAEDRGAC
201 LLPKIETHRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWVA RLSQKFFPAE
251 FVEVTKLVD LTRVHKECCM GDLLCADDR ADLAKYICDN QDTISSKLGE
301 CDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPELTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL
351 GSFLEYEYRR HPEYAVSVLL RLAKYEAIL EECCKDDPH ACYSTVFDKL
401 KHLVDEPQNL IKGNCDFEK LGEYFQNAL IYRTRVFO VSTPTLVEVS
451 RSLGKVGTRC CTFESEMFP CTEDYLSLIL NRLCVLHEK PVSEKVRCC
501 TESLVNRRPC FSALTFDETY VFGAFDEKLF IFHADICTLP DTEKQIKQT
551 ALVELLHKFP KATEEQLKTV MENFVAFVCK CCAADKKEAC FAVEGPKLVV
601 STQTALA
```

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
29 - 34	712.3749	711.3677	711.3664	2	0 K.SEIAHR.F
35 - 44	1249.6240	1248.6167	1248.6139	2	1 R.FDGLGEEHF.K
37 - 44	974.4576	973.4504	973.4505	-0	0 K.DLGEEHFK.G
66 - 75	1163.6315	1162.6242	1162.6234	1	0 K.LVHELTEFAK.T
89 - 100	1420.6787	1419.6714	1419.6704	1	0 K.SLHTLFGDELCK.V Carboxymethyl (C)
123 - 138	1902.8594	1901.8521	1901.8465	3	1 R.NECPFLSHKDDSPDLK.L Carboxymethyl (C)
139 - 151	1577.7550	1576.7477	1576.7443	2	0 K.LKFPDNTLCDEFK.A Carboxymethyl (C)
139 - 155	2020.9545	2019.9472	2019.9459	1	1 K.LKFPDNTLCDEFKDEK.K Carboxymethyl (C)
161 - 167	927.4955	926.4882	926.4861	2	0 K.YLYEIA.R
184 - 197	1749.6796	1748.6723	1748.6658	4	0 K.YNGVFQCCQAEDEK.G 2 Carboxymethyl (C)
236 - 241	689.3743	688.3670	688.3656	2	0 K.ANSVAR.L
298 - 309	1534.7534	1533.7461	1533.7418	3	1 K.LKECCDKPLLEK.S 2 Carboxymethyl (C)
360 - 371	1439.8143	1438.8071	1438.8045	2	1 R.RHPEYAVSVLLR.L
402 - 412	1305.7199	1304.7126	1304.7088	3	0 K.HLVDEPQNLK.Q
421 - 433	1479.7985	1478.7912	1478.7881	2	0 K.LGEYFQNALIVR.Y
437 - 451	1639.9417	1638.9344	1638.9305	2	1 R.KVPQVSTPTLVEVSR.S
483 - 489	899.4667	898.4594	898.4582	1	0 R.LCVLHEK.T Carboxymethyl (C)
499 - 507	1140.4654	1139.4582	1139.4587	-0	0 K.CCTESLVNR.R 2 Carboxymethyl (C)
508 - 523	1881.9105	1880.9032	1880.8978	3	0 R.RPCFSALTFDETYVFK.A Carboxymethyl (C)

Figure 55 : Peptide identifiés et erreur de masse pour chaque peptide

Comme le montre la figure ci-dessus pour l'ensemble des peptides identifiés l'erreur de masse est inférieure à 5 ppm : l'erreur maximale retrouvée est de 4 ppm. Ce type d'erreur de masse rend l'identification des peptides et des protéines en cartographie peptidique beaucoup plus fiable comparée à la même analyse en MALDI-TOF/TOF. Une fois l'analyse de standard validée nous avons pu adapter la cartographie peptidique pour de « vrais » échantillons.

### IV.10.1.1 Application

Nous avons réalisé la même stratégie de cartographie peptidique à haute résolution et haute précision de mesure de masse avec un échantillon de colza dans le cadre de la recherche de la cruciférine qui est une protéine responsable de certains cas d'allergie. Le spectre MS de cet échantillon présenté en Figure 56 a été réalisé dans une gamme de masse de 700 à 4000 Da.

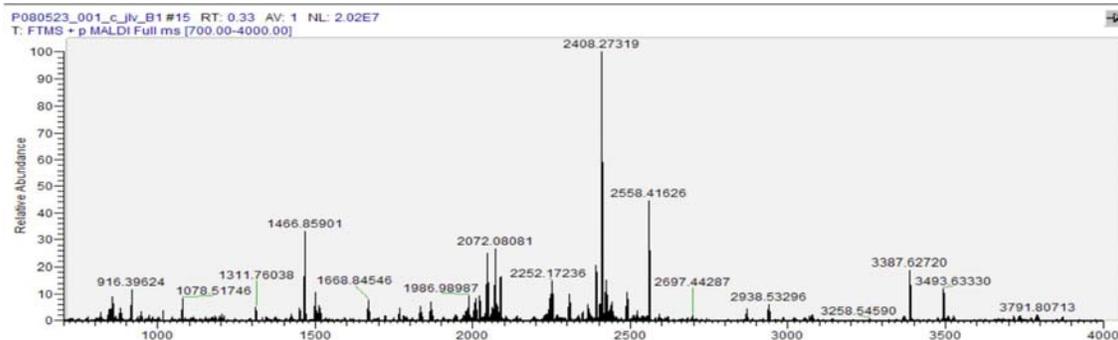


Figure 56 : Spectre MS de l'échantillon de colza pour la recherche de la cruciférine en cartographie peptidique.

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
46 - 62	1985.0048	1983.9975	1984.0027	-3	1	K.AEAGRIEVNDHHPQLR.C
51 - 62	1500.7677	1499.7604	1499.7633	-2	0	R.IEVNDHHPQLR.C
63 - 70	854.4178	853.4105	853.4116	-1	0	R.CSGVSPVR.Y
63 - 88	2984.5280	2983.5207	2983.5266	-2	2	R.CSGVSPVRYIESKGLYLPSPFFSTAR.L Carbamidomethyl (C)
277 - 289	1465.8611	1464.8538	1464.8565	-2	0	R.VQGPFSVIRPLR.S
309 - 341	3713.8137	3712.8065	3712.7930	4	0	R.CTDNLDDPSNADVYKPLGYISTLNSYDLPILR.F
389 - 410	2333.2494	2332.2421	2332.2427	-0	0	R.VFDGQVSQQQLSIPQGFVVK.R
389 - 411	2489.3489	2488.3416	2488.3438	-1	1	R.VFDGQVSQQQLSIPQGFVVKR.A
419 - 423	722.3892	721.3820	721.3799	3	0	R.WIEFK.T
424 - 436	1343.7027	1342.6954	1342.6953	0	0	K.TNANAQINTLAGR.T
442 - 460	2088.0944	2087.0871	2087.0898	-1	0	R.GLPLEVISNGYQISLEEAR.R
442 - 461	2244.1972	2243.1899	2243.1909	-0	1	R.GLPLEVISNGYQISLEEAR.V

Figure 57 : Identification des différents peptides de la cruciférine avec l'erreur de masse associée à chaque peptide.

Cette analyse nous montre une fois de plus la grande précision de l'analyseur Orbitrap et son utilité dans le cadre d'une cartographie peptidique. Le type d'application réalisable à l'aide de ce couplage entre la source MALDI et l'analyseur Orbitrap est multiple, la recherche de modifications post traductionnelles ainsi que la caractérisation de peptides de masses très proches sont des applications réalisables avec ce type de couplage.

Cependant la cartographie peptidique à haute précision et haute résolution ne permet pas de répondre à certaines problématiques ce qui rend toutefois son utilisation parfois limitée. Pour cela l'utilisation de la MS/MS reste indispensable.

#### IV.10.2 Le MALDI-Orbitrap et la MS/MS

Le MALDI Orbitrap est un appareil hybride possédant deux analyseurs, une trappe ionique linéaire et un Orbitrap. La fragmentation des ions peut être réalisée dans la trappe ionique ou dans l'Orbitrap.

Dans le cadre de l'étude de la cruciférine nous avons décidé de réaliser les MS/MS dans l'Orbitrap afin d'obtenir une grande précision de masse sur les fragments de la MS/MS (Figure 58)

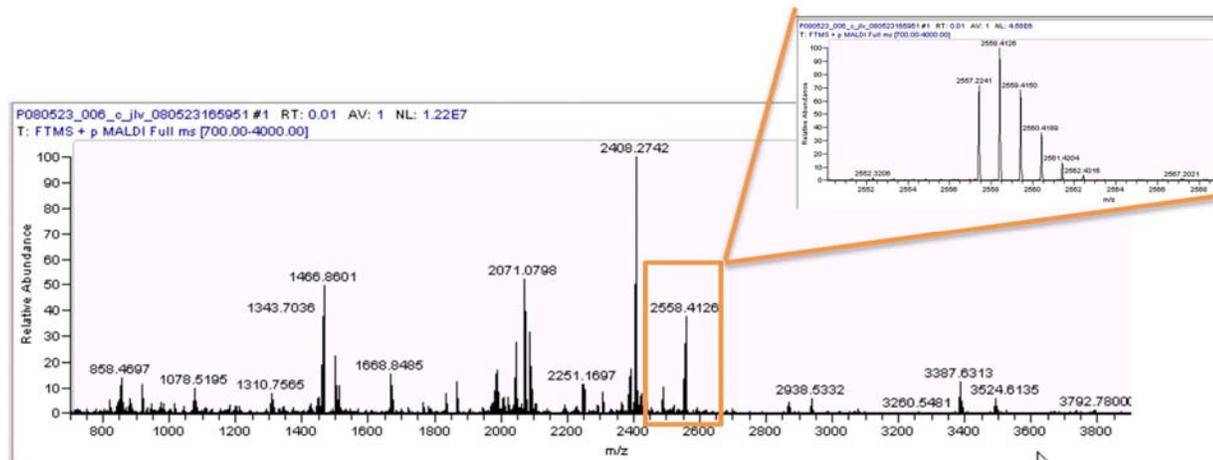


Figure 58 : Spectre MS et sélection du précurseur pour l'analyse MS/SMS

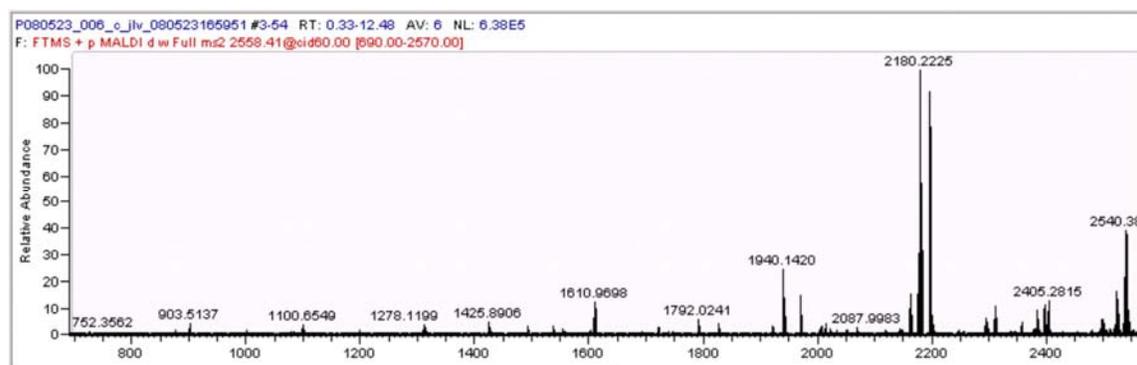


Figure 59 : Analyse MS/MS en Orbitrap de l'ion 2557 Da

L'analyse MS/MS en utilisant l'Orbitrap nous permet d'obtenir des identifications globales avec une précision de masse inférieure à 5 ppm. (Figure 60).

1. CRU4 BRANA Mass: 51345 Score: 190 Queries matched: 25  
 Cruciferin CRU4 precursor - Brassica napus (Rape)  
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 2	916.3985	915.3912	915.3909	0.37	0	12	0.15	1	R.CSGFAFER.F
<input checked="" type="checkbox"/> 3	916.3987	915.3914	915.3909	0.59	0	(5)	0.77	1	R.CSGFAFER.F
<input checked="" type="checkbox"/> 5	1500.7700	1499.7627	1499.7633	-0.41	0	52	0.00017	1	R.IEVVDHHAPQLR.C
<input checked="" type="checkbox"/> 6	1500.7700	1499.7627	1499.7633	-0.41	0	(41)	0.002	1	R.IEVVDHHAPQLR.C
<input checked="" type="checkbox"/> 7	1500.7700	1499.7627	1499.7633	-0.41	0	(45)	0.00091	1	R.IEVVDHHAPQLR.C
<input checked="" type="checkbox"/> 8	1500.7700	1499.7627	1499.7633	-0.41	0	(30)	0.025	1	R.IEVVDHHAPQLR.C
<input checked="" type="checkbox"/> 9	1500.7700	1499.7627	1499.7633	-0.41	0	(32)	0.015	1	R.IEVVDHHAPQLR.C
<input checked="" type="checkbox"/> 10	1500.7710	1499.7637	1499.7633	0.26	0	(52)	0.00021	1	R.IEVVDHHAPQLR.C
<input checked="" type="checkbox"/> 11	1668.8480	1667.8407	1667.8420	-0.75	1	19	0.52	1	K.RATSQQFQWIEFK.S
<input checked="" type="checkbox"/> 13	1986.9870	1985.9797	1985.9820	-1.14	1	26	0.071	1	K.SEGGRIEVVDHHAPQLR.C
<input checked="" type="checkbox"/> 15	1986.9880	1985.9807	1985.9820	-0.64	1	(8)	5.9	3	K.SEGGRIEVVDHHAPQLR.C
<input checked="" type="checkbox"/> 22	2071.0790	2070.0717	2070.0745	-1.36	0	59	4.4e-005	1	R.GLPLEVISNGYQISPQEAR.S
<input checked="" type="checkbox"/> 23	2071.0790	2070.0717	2070.0745	-1.36	0	(41)	0.0031	1	R.GLPLEVISNGYQISPQEAR.S
<input checked="" type="checkbox"/> 24	2071.0790	2070.0717	2070.0745	-1.36	0	(38)	0.0061	1	R.GLPLEVISNGYQISPQEAR.S
<input checked="" type="checkbox"/> 25	2071.0800	2070.0727	2070.0745	-0.88	0	(23)	0.15	1	R.GLPLEVISNGYQISPQEAR.S
<input checked="" type="checkbox"/> 26	2071.0800	2070.0727	2070.0745	-0.88	0	(18)	0.51	1	R.GLPLEVISNGYQISPQEAR.S
<input checked="" type="checkbox"/> 37	2407.2700	2406.2627	2406.2669	-1.73	0	23	0.14	2	R.NLRPFLLAGNHPQGQWLQGR.Q
<input checked="" type="checkbox"/> 38	2407.2710	2406.2637	2406.2669	-1.31	0	(15)	0.85	1	R.NLRPFLLAGNHPQGQWLQGR.Q
<input checked="" type="checkbox"/> 39	2407.2710	2406.2637	2406.2669	-1.31	0	(11)	2	1	R.NLRPFLLAGNHPQGQWLQGR.Q
<input checked="" type="checkbox"/> 40	2407.2710	2406.2637	2406.2669	-1.31	0	(11)	1.9	1	R.NLRPFLLAGNHPQGQWLQGR.Q
<input checked="" type="checkbox"/> 41	2407.2710	2406.2637	2406.2669	-1.31	0	(21)	0.19	1	R.NLRPFLLAGNHPQGQWLQGR.Q
<input checked="" type="checkbox"/> 42	2407.2720	2406.2647	2406.2669	-0.89	0	(14)	1.2	1	R.NLRPFLLAGNHPQGQWLQGR.Q
<input checked="" type="checkbox"/> 45	2557.4090	2556.4017	2556.4064	-1.84	2	58			R.VFDQEISKGQLLVPPQGFAVVKR.A + [-0.0364 at K22]
<input checked="" type="checkbox"/> 46	2557.4100	2556.4027	2556.4064	-1.45	2	(30)			R.VFDQEISKGQLLVPPQGFAVVKR.A + [-0.0364 at K8]
<input checked="" type="checkbox"/> 48	2557.4100	2556.4027	2556.4064	-1.45	2	(56)			R.VFDQEISKGQLLVPPQGFAVVKR.A + [-0.0364 at K8]

Figure 60 : Résultats Mascot après analyses des MS et MS/MS en Orbitrap

L'analyse MS et MS/MS en utilisant l'Orbitrap rend l'identification des peptides et des protéines lors d'analyse en cartographie peptidique beaucoup plus fiable que ce qu'elle était avec des appareils de moins bonne précision comme le MALDI-TOF/TOF. Cette identification est possible grâce à un analyseur de dernière génération permettant de faire des mesures de masse exacte.

Ce type d'analyse et de stratégie est réalisable uniquement dans le cadre d'analyse de protéine unique ou de quelques protéines. L'analyse de mélanges plus complexes nécessite une séparation chromatographique au préalable d'où le développement de l'analyse LC-MALDI-Orbitrap.

#### IV.10.3 LC-MALDI-Orbitrap

Tout comme pour le couplage LC-MALDI-TOF/TOF, nous avons dû tester certains paramètres de l'Orbitrap afin de rendre le couplage LC-MALDI fonctionnel.

Avant l'installation de la source MALDI de nombreux paramètres d'analyse de l'Orbitrap en mode ESI avaient déjà été validés au laboratoire comme

- le seuil de détection minimal pour la sélection du précurseur : 1000.
- l'énergie de collision : 35,
- le temps d'exclusion dynamique : 45 secondes
- la tolérance de masse de sélection du précurseur 10 ppm.

Le paramètre principal sur lequel nous avons travaillé est le nombre de microscans ( $\mu$ s) pour la MS/MS.

Lors des analyses de cartographie peptidique le nombre de microscans défini était par défaut très élevé pour obtenir le maximum d'informations sachant que nous travaillons sur une seule protéine. Dans le cas d'une analyse LC MALDI il faut tenir compte du fait que les spots sont plus petits que pour une analyse classique.

En réalisant nos analyses nous avons très vite remarqué que la faiblesse de l'Orbitrap était le mode MS/MS, en effet pour la MS le nombre de microscans nécessaires varie entre 1 et 8 en fonction de la quantité de matériel déposé. En ce qui concerne la MS/MS le nombre de microscans nécessaires est beaucoup plus élevé pour obtenir des spectres MS/MS corrects et identifiables par Mascot.

#### IV.10.3.1 Détermination du nombre de microscans pour la MS/MS

Afin de déterminer le nombre de microscans nécessaires pour obtenir une analyse LC-MALDI comparable au MALDI-TOF/TOF nous avons réalisé une série d'analyses faisant varier le nombre de microscans de 5 à 40 (Figure 61)

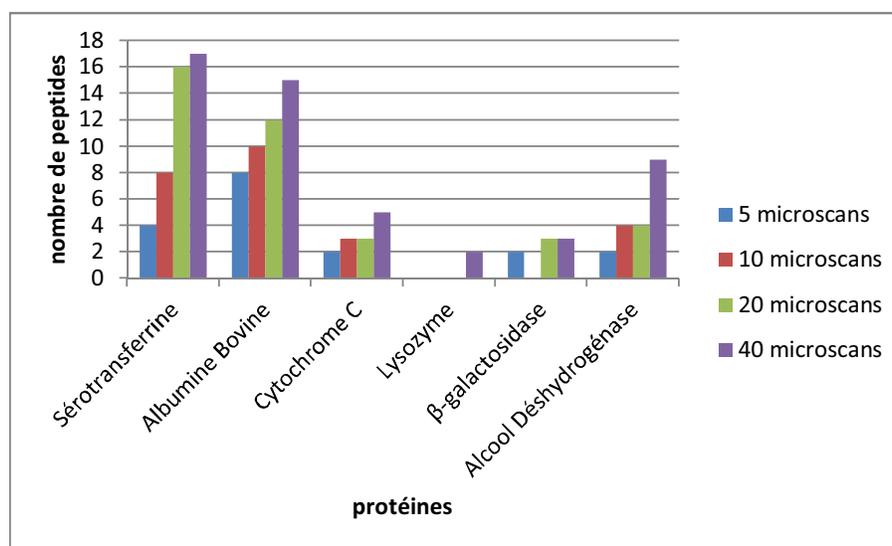


Figure 61 : Identification peptidique en fonction du nombre de microscans utilisés pour la MS/MS à partir de 20fmol de LCP standard.

Comme nous pouvons le remarquer sur le diagramme ci-dessus le nombre de peptides identifiés en utilisant nos critères de validation de 2 peptides avec un seuil de 30 augmente avec l'augmentation du nombre de microscans. L'utilisation de 40 microscans est nécessaire pour obtenir un nombre de peptides suffisants et comparables à une analyse LC-MALDI-TOF/TOF.

Cette tendance est confirmée en supprimant notre seuil de validation le nombre de peptides identifiés par Mascot se retrouve augmenté comme le montre la Figure 61. Supprimer le seuil de validation de la valeur de score minimale à 30 est bien évidemment à proscrire dans une analyse d'échantillon inconnu.

Ici nous connaissons nos protéines standards et il s'agit de retrouver les masses des précurseurs malgré une qualité de spectres MS/MS insuffisante (mode pseudo PMF).

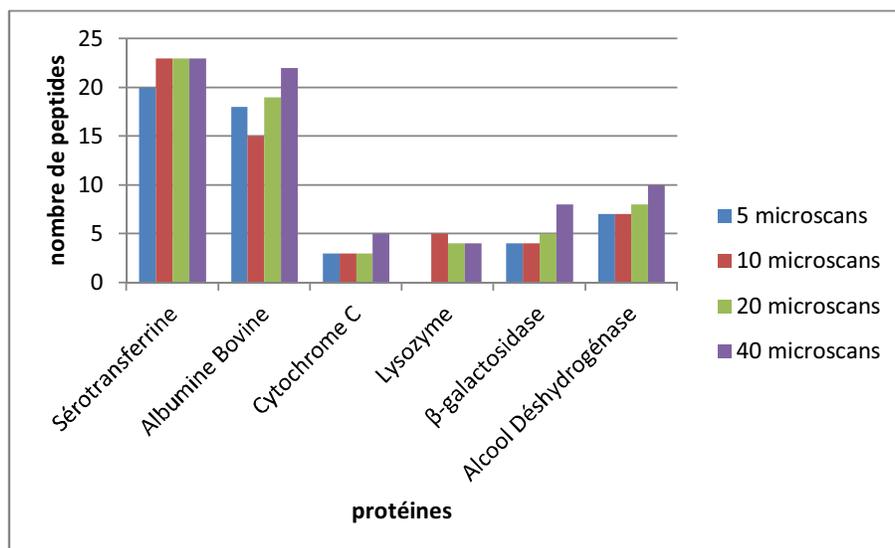


Figure 62 : Peptides identifiés sans seuil de validation par Mascot en fonction du nombre de microscans utilisé

La variation du nombre de peptides est beaucoup moins marquée que dans le premier cas où nous avons utilisé notre seuil de validation. Ceci confirme qu'un nombre de microscans insuffisant ne permet pas de valider l'ensemble des peptides de façon robuste. Pour l'ensemble de nos analyses nous utiliserons un nombre de 40 microscans pour réaliser les MS/MS.

En ce qui concerne la MS le nombre de 5 microscans semble amplement suffisant pour obtenir une MS d'une intensité correcte.

#### IV.10.3.2 Analyse multiple d'un même échantillon

Tout comme l'analyse en LC-MALDI-TOF/TOF nous avons voulu déterminer si une analyse multiple d'un même échantillon était possible.

Pour la LC-MALDI-TOF/TOF, la limite de détection des 6 protéines du mélange standard est de 2 analyses successives, 3 protéines étant encore identifiables avec nos critères de validation après 4 analyses successives. Afin d'observer la possibilité de cette analyse multiple et de la comparer à l'analyse LC-MALDI-TOF/TOF nous avons analysé 4 fois de suite dans les mêmes conditions 20fmol de mélange standard en LC-MALDI-Orbitrap. Pour chacune des analyses le nombre de peptides identifiés en utilisant nos critères de validation est comptabilisé sur la Figure 63.

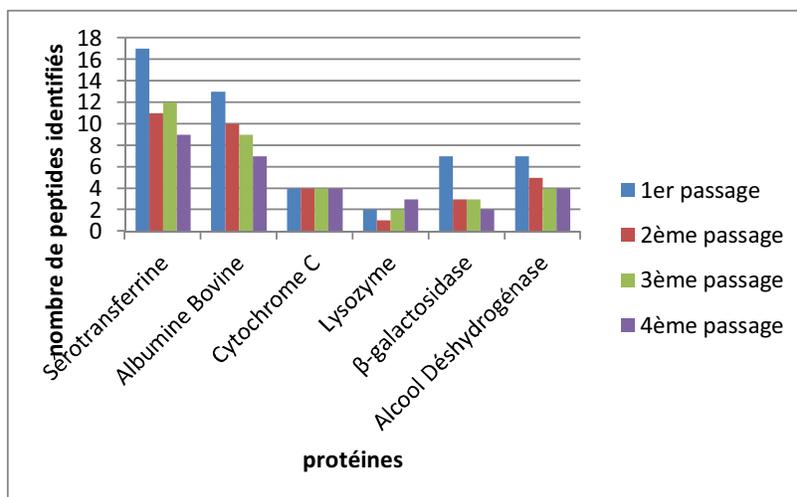


Figure 63 : Analyse multiple d'un même échantillon et analyse du nombre de peptides identifiés après 4 passages successifs.

Comme prévu après 4 passages successifs le nombre de peptides identifiés décroît sensiblement. Cette diminution du nombre de peptides identifiés est due à la consommation de l'échantillon lors des impacts laser. Cependant les 6 protéines du mélange standard restent identifiables après les 4 passages avec pour chacune des protéines au moins 2 peptides avec un score minimum de 30.

Ces résultats diffèrent de l'analyse MALDI-TOF/TOF où seulement deux analyses successives ont permis d'identifier les 6 protéines. Une différence logicielle peut expliquer cette différence d'identification entre les deux appareils :

- Pour le MALDI-TOF/TOF les tirs lasers sont aléatoires, le laser peut tirer plusieurs fois sur le même cristal de matrice. La fréquence du laser est plus importante et le nombre de tirs laser aussi. L'efficacité de l'analyse repose sur une répartition statistique des impacts laser sur la surface du dépôt. Cette possibilité entraîne une consommation plus importante de l'échantillon.
- Le MALDI-Orbitrap est équipé d'un système optique de détection automatique des cristaux (CPS) ce système permet de tirer une seule fois sur un cristal de matrice. Chaque cristal « consommé » ne peut être analysé une seconde fois, la consommation de l'échantillon est mieux gérée.

La combinaison des 4 passages permet d'obtenir un gain de 3 peptides par rapport au premier passage. Ce gain de peptides nous montre une nouvelle fois qu'une seule analyse MALDI ne permet pas toujours d'identifier la totalité des peptides présents dans le cristal (Figure 64)

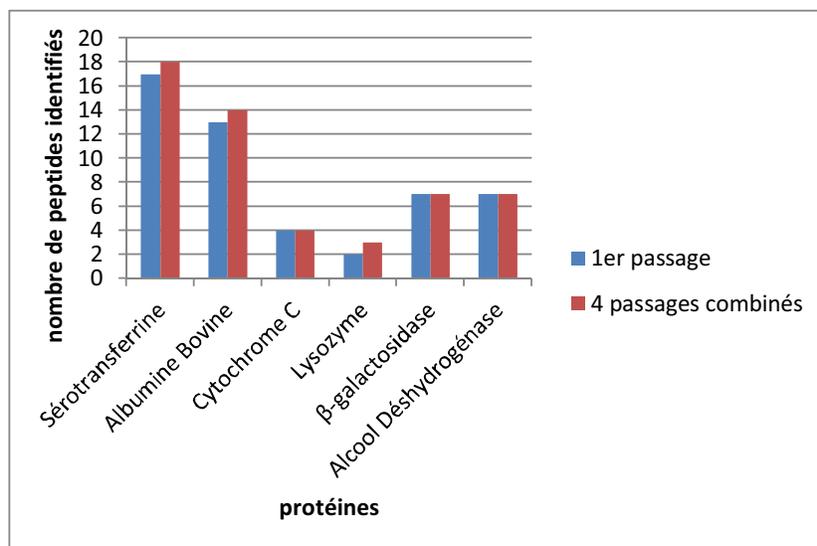


Figure 64 : Comparaison entre le premier passage et la combinaison des 4 passages en LC-MALDI-Orbitrap

La consommation de l'échantillon étant mieux gérée sur l'Orbitrap il est intéressant d'observer si une variabilité inter-expérience LC existe entre 4 échantillons identiques déposés. Pour cela nous avons déposé 4 échantillons identiques d'un extrait brut d'*E. coli*. Les résultats obtenus sont les suivants :

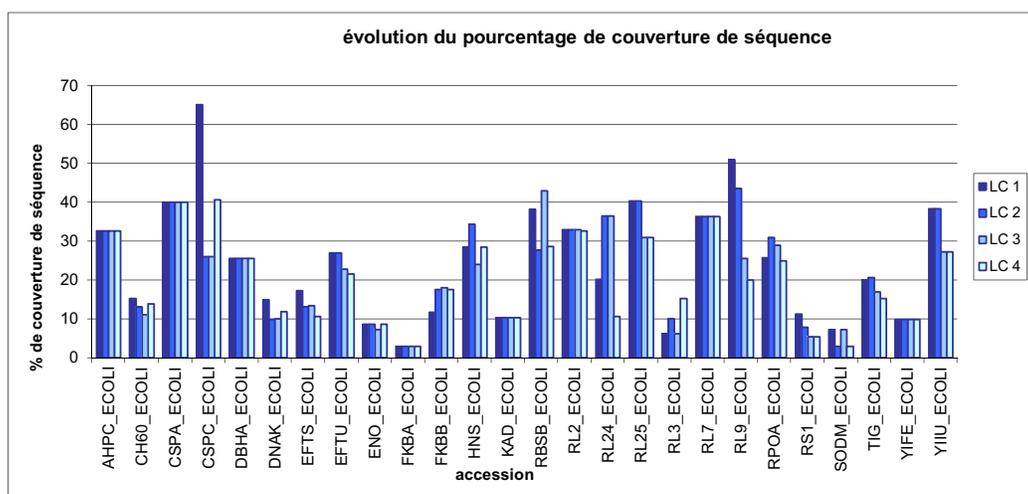


Figure 65 : Variabilité du pourcentage de couverture inter échantillons

Le pourcentage de couverture de séquence entre chaque échantillon ne change pas de façon significative, mis à part quelques points aberrants, pour chacune des protéines analysées. Nous avons d'une part une bonne homogénéité des dépôts en LC MALDI et d'autre part une bonne répétabilité d'analyse en spectrométrie de masse qui nous permet d'obtenir une couverture reproductible. Ceci est cohérent avec les résultats précédents qui montrent que les analyses successives d'un mélange simple ne permettent pas de gagner en couverture plus de quelques peptides.

L'efficacité de l'analyse est par ailleurs directement liée au nombre de MS/MS réalisées et identifiées et non pas au nombre de MS/MS réalisées. Certaines analyses MS/MS peuvent en effet ne pas être informatives. La Figure 66 décrit la variation du nombre de MS/MS identifiées pour chaque protéine du mélange d'*E. Coli*.

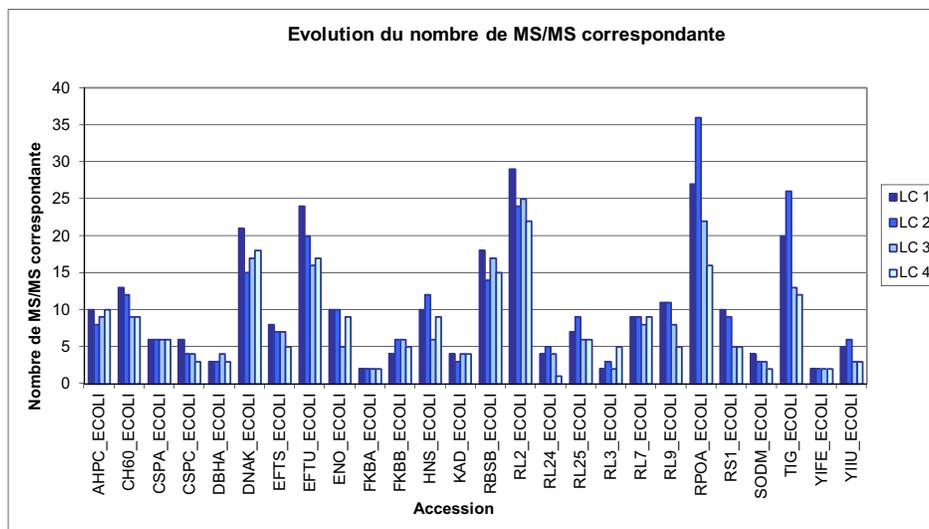


Figure 66 : Evaluation inter LC du nombre de MS/MS correspondante à chaque protéine identifiée pour chaque analyse LC-MS/MS

Au contraire du pourcentage de couverture de séquence, le nombre de MS/MS identifiées diminue. Ceci illustre l'usure des dépôts MALDI au cours des analyses successives d'une même séparation LC. Le signal s'affaiblit et la qualité des spectres obtenus chute avec le rapport S/B. Ceci indique aussi que nombre des MS/MS réalisées sont redondantes. C'est l'illustration de la mauvaise gestion de la sélection des précurseurs puisque dans le cas de l'Orbitrap les précurseurs sont sélectionnés au-dessus d'un certain seuil aussitôt qu'ils sont détectés (mode de sélection analogue à l'électrospray) et ne sont pas sélectionnés à l'apex du pic correspondant comme c'est le cas dans la configuration TOF/TOF.

L'ensemble des résultats présentés précédemment montrent la robustesse du système LC MALDI Orbitrap. L'apport du CPS semble être un véritable avantage dans la gestion de la consommation d'échantillon comparé au MALDI-TOF/TOF. La fréquence du laser est également responsable de cette faible consommation : en effet la fréquence de laser du MALDI Orbitrap (60Hz) est 3 fois inférieure à celle du MALDI-TOF/TOF (200 Hz). La possibilité de réaliser 4 analyses successives d'un même échantillon sans la perte notable des protéines identifiées est un avantage majeur qui ouvre la possibilité de réaliser des analyses avec l'utilisation de listes d'exclusion.

Le MALDI-Orbitrap et le MALDI-TOF/TOF possédant tous les deux une source MALDI mais des analyseurs différents, il est intéressant d'observer les similarités et les différences entre ces deux appareils.

## IV.10.4 LC MALDI-Orbitrap versus LC-MALDI-TOF/TOF

### IV.10.4.1 Protéines et peptides identifiés

La mise au point des deux techniques étant faite, nous pouvons désormais réaliser une étude comparative entre les deux appareils équipés d'une source MALDI au laboratoire. Pour cela nous allons dans un premier temps analyser 20 fmol de la solution standard LCP en parallèle sur les deux appareils. Les deux analyses sont réalisées dans les mêmes conditions avec 7 précurseurs par spot afin que le nombre de MS/MS par échantillon soit comparable. Les protéines identifiées avec le nombre de peptides associés pour chacune des deux machines sont présentées en Figure 67.

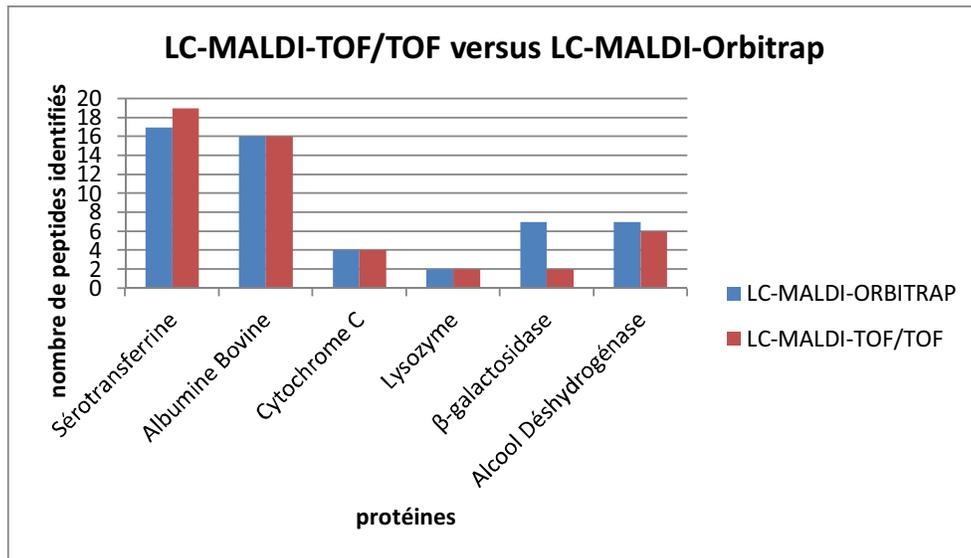


Figure 67 : Comparaison du nombre de spectres MS/MS identifiés pour chacune des protéines en fonction du spectromètre utilisé

Le nombre de spectres MS/MS identifiés pour chaque appareil est relativement similaire, avec un nombre légèrement supérieur pour la LC-MALDI-Orbitrap. Une analyse plus en détail (Figure 68) de la première protéine identifiée (Sérotransferrine) sous Mascot nous permet de vérifier la tolérance de masse et le score de chaque peptide identifié pour cette protéine.

1. **TFPE BOVIN** Mass: 77703 Score: 1136 Matches: 19(15) Sequences: 19(15) enPAI: 1.44  
 Serotransferrin OS=Bos taurus GI=TF PF=2 SV=1

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calcd)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<a href="#">35</a>	852.4497	851.4424	851.4825	46.9	0	40	0.014	1	1	V K.DSRDGLK.I
<a href="#">44</a>	888.4330	887.4257	887.3920	38.0	0	67	0.00019	1	1	V K.SCHTGLGR.S
<a href="#">52</a>	919.6010	918.5937	918.5530	43.4	0	32	0.2	1	1	V K.CYLAVAVYK.T
<a href="#">55</a>	936.5435	935.5362	935.4937	45.5	0	83	4e-06	1	1	V R.GPDKVYYSR.K
<a href="#">58</a>	946.4414	945.4341	945.3934	38.0	0	68	0.00012	1	1	V K.SCHTAVDR.T
<a href="#">73</a>	1000.4454	1007.4381	1007.4052	32.6	0	35	0.10	1	1	V K.TSRDQCIK.R
<a href="#">76</a>	1016.5307	1015.5234	1015.4869	36.0	1	67	0.00025	1	1	V K.KSCHTGLGR.S
<a href="#">80</a>	1039.5139	1038.5126	1038.4692	41.8	0	44	0.031	1	1	V K.KNTEVLCR.D
<a href="#">90</a>	1074.5519	1073.5446	1073.4924	40.6	1	55	0.0039	1	1	V K.KSCHTAVDR.T
<a href="#">127</a>	1216.6416	1215.6343	1215.5950	31.7	0	57	0.0025	1	1	V K.LLEACTYKSP.-
<a href="#">137</a>	1311.7071	1310.6999	1310.6466	40.6	0	55	0.0031	1	1	V K.KLPPQESTQR.R
<a href="#">149</a>	1355.6304	1354.6312	1354.5823	36.1	0	79	9.0e-06	1	1	V K.NYTELLCGNTR.K
<a href="#">169</a>	1413.6079	1412.6006	1412.6316	34.7	0	62	0.00063	1	1	V K.CLDGAGVYVYK.H
<a href="#">183</a>	1448.6047	1447.6794	1447.6361	28.5	1	76	2.6e-05	1	1	V K.GTGKCYPPSSNR.Y
<a href="#">193</a>	1466.6973	1465.6900	1465.6361	36.7	0	31	0.47	1	1	V K.TYDSTLGDVYR.R
<a href="#">198</a>	1483.7307	1482.7314	1482.6773	36.5	1	31	0.76	1	1	V R.NYTELLCGNTR.K
<a href="#">207</a>	1511.7706	1510.7634	1510.7190	28.0	0	103	5.4e-08	1	1	V R.KPVDANENLAR.G
<a href="#">216</a>	1604.8755	1603.8682	1603.7995	42.9	0	91	7.5e-07	1	1	V K.DNPTQRYAVYK.K
<a href="#">226</a>	1753.8148	1752.8075	1752.7546	30.2	1	60	0.00003	1	1	V R.EKPPSSSKDQVYK.W

1. **TFPE BOVIN** Mass: 77703 Score: 824 Matches: 27(24) Sequences: 17(15) enPAI: 2.07  
 Serotransferrin OS=Bos taurus GI=TF PF=2 SV=1

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calcd)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<a href="#">115</a>	919.5605	918.5532	918.5538	-0.68	0	38	0.0001	1	1	V K.CYLAVAVYK.T
<a href="#">132</a>	936.5005	935.4932	935.4937	-0.52	0	57	0.00028	1	1	V R.GPDKVYYSR.K <a href="#">133</a>
<a href="#">379</a>	1311.6530	1310.6457	1310.6466	-0.69	0	33	0.004	1	1	V K.KLPPQESTQR.R <a href="#">378</a>
<a href="#">391</a>	1336.6810	1335.6737	1335.6744	-0.53	0	39	0.029	1	1	V R.ILESPPVSYK.K
<a href="#">398</a>	1355.5890	1354.5817	1354.5823	-0.43	0	36	0.014	1	1	V K.NYTELLCGNTR.K <a href="#">397</a>
<a href="#">402</a>	1363.6920	1362.6847	1362.6853	-0.44	0	50	0.0022	1	1	V K.CGLVPLREYK.T
<a href="#">410</a>	1413.6390	1412.6317	1412.6316	0.09	0	42	0.0059	1	1	V K.CLDGAGVYVYK.H
<a href="#">433</a>	1448.6440	1447.6367	1447.6361	0.40	1	40	0.0040	1	1	V K.GTGKCYPPSSNR.Y <a href="#">432</a>
<a href="#">446</a>	1466.6430	1465.6357	1465.6361	-0.28	0	48	0.0007	1	1	V K.TYDSTLGDVYR.R
<a href="#">456</a>	1483.6840	1482.6767	1482.6773	-0.36	1	36	0.026	1	1	V R.NYTELLCGNTR.K
<a href="#">460</a>	1511.7270	1510.7197	1510.7190	-0.05	0	65	5.5e-05	1	1	V R.KPVDANENLAR.G <a href="#">459</a>
<a href="#">473</a>	1594.7300	1593.7307	1593.7311	-0.23	1	30	0.12	1	1	V K.NYTELLCGNTR.R
<a href="#">479</a>	1604.8060	1603.7987	1603.7995	-0.46	0	71	1.6e-05	1	1	V K.DNPTQRYAVYK.K <a href="#">478</a> <a href="#">480</a>
<a href="#">490</a>	1640.7670	1639.7597	1639.7590	0.41	0	40	0.014	1	1	V K.HSTVEDLPHDPRR.K <a href="#">491</a>
<a href="#">493</a>	1645.6960	1644.6887	1644.6879	0.52	0	79	4.4e-07	1	1	V K.FDEEFSAGAGSPR.H <a href="#">492</a>
<a href="#">507</a>	1757.8600	1756.8527	1756.8533	-0.32	0	78	2.4e-06	1	1	V K.DKPDNQLQSPKIK.D <a href="#">508</a>
<a href="#">515</a>	1846.8510	1845.8437	1845.8435	-0.94	0	46	0.0024	1	1	V K.GENRHSLSGLGYYLIRK.C

Figure 68 : Identification Mascot du premier candidat, la Sérotransferrine avec le nombre de peptides identifiés le score et la tolérance de masse.

A droite le résultat pour la LC-MALDI-Orbitrap à gauche le résultat pour la LC-MALDI-TOF/TOF

Le premier point de comparaison entre ces deux approches concerne la précision de masse. Comme décrit précédemment la précision de masse de l'Orbitrap est sans doute l'avantage majeur de cet appareil, avec une erreur de mesure de masse inférieure à 1 ppm permettant une analyse d'une grande fiabilité. En revanche pour la LC-MALDI-TOF/TOF nous avons une précision de masse de l'ordre de 35 ppm ce qui est loin de la précision de l'Orbitrap, cependant ce problème peut être corrigé par l'ajout d'un étalon interne dans la matrice. Le deuxième point de comparaison concerne le score des peptides identifiés, c'est-à-dire la qualité des spectres MS/MS obtenus.

#### IV.10.4.2 Types de fragmets identifiés

Pour chacun des peptides communs aux deux approches, on remarque des scores d'identification de peptide plus élevés en LC-MALDI-TOF/TOF. Pour comprendre ce phénomène et comment une telle différence peut avoir lieu nous avons analysé l'ensemble des peptides du mélange standard identifiés afin d'extraire l'ensemble les différents fragments présents. La Figure 69 présente le détail des fragments proposés par Mascot pour l'identification des peptides.

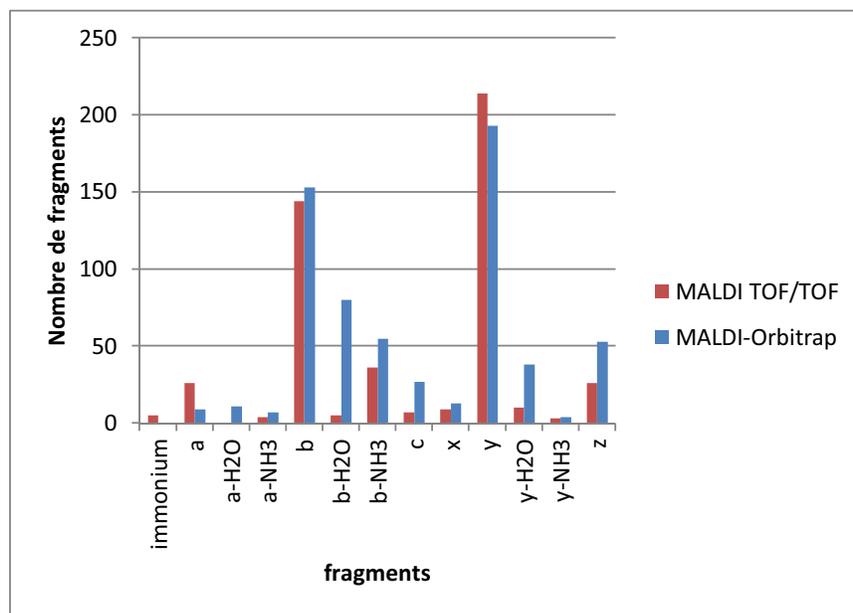


Figure 69: Comparaison des fragments obtenus en MS/MS pour chaque spectromètre de masse.

Le nombre de fragments b et y permettant le séquençage des peptides est relativement similaire pour les deux spectromètres de masse. Nous pouvons remarquer un nombre de fragments y et b légèrement supérieur pour le MALDI TOF/TOF. Concernant les autres fragments, le MALDI Orbitrap en MS/MS entraîne la production de nombreuses pertes de neutres tels que b-H<sub>2</sub>O, b-NH<sub>3</sub> nous pouvons également remarquer de nombreux fragments complémentaires tel que les fragments c, x et z.

La présence de nombreux fragments autres que les fragments b et y peut entraîner une chute du score calculé par l'algorithme Mascot. Afin de vérifier cette tendance nous avons comparé le nombre de fragments proposés par rapport au nombre de fragments identifiés.

## Comparaison du taux d'identification en TOF/TOF et en Orbitrap MS/MS

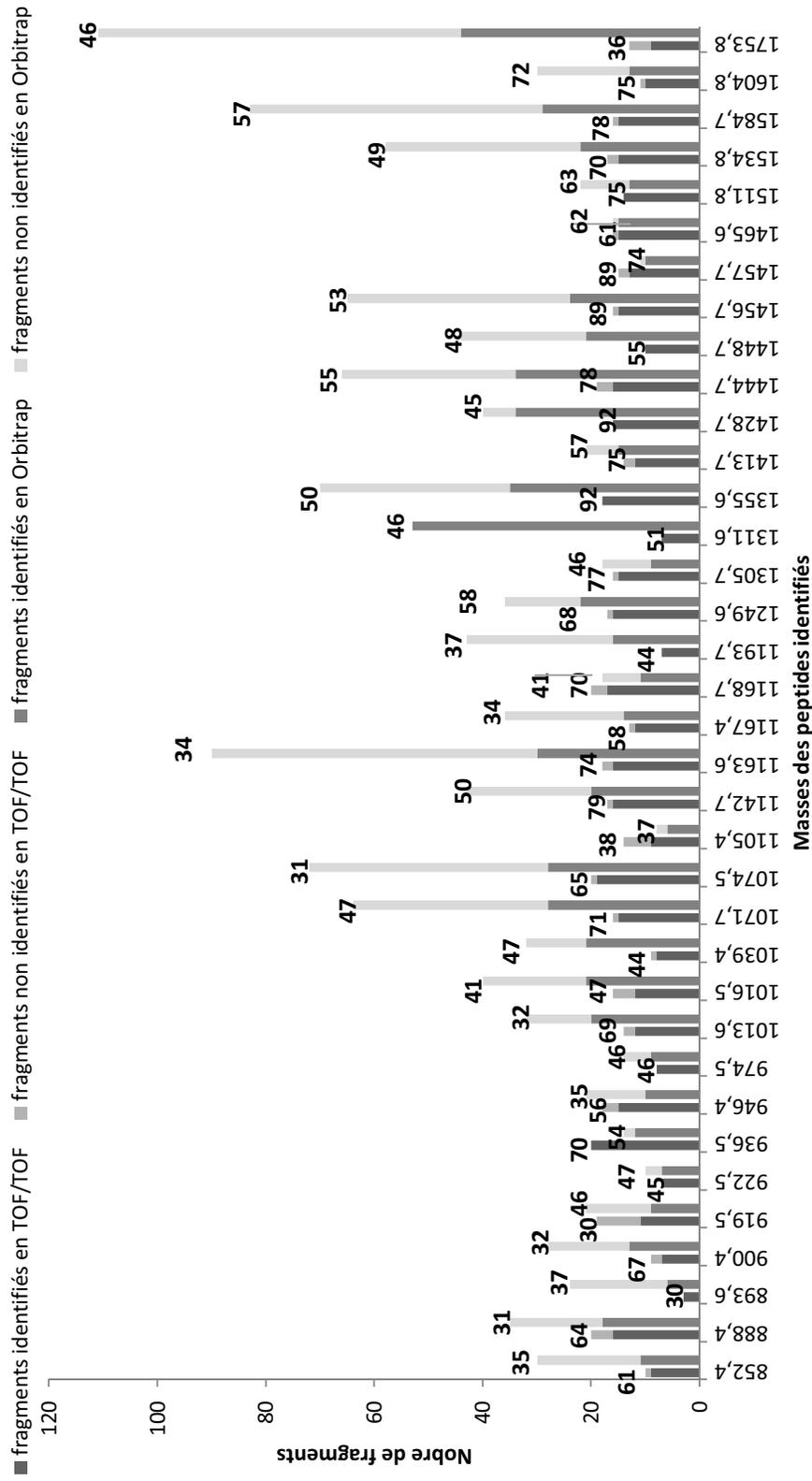


Figure 70: Comparaison des scores de plusieurs peptides en fonction du nombre de fragments proposés à l'algorithme de recherche. Le diagramme est réalisé pour les peptides protéolytiques des différentes protéines du mélange standard

Les résultats ci-dessus montrent pour la plupart des peptides sélectionnés, des scores plus élevés pour les peptides analysés en MALDI-TOF/TOF. En effet le nombre de fragments soumis pour la recherche est très proche du nombre de fragments interprétés par Mascot. En revanche pour le MALDI Orbitrap le nombre de fragments identifiés est largement sous évalué par l'algorithme de recherche. Nous pouvons citer l'exemple du peptide de masse 946,4 Da, qui est identifié dans les deux cas. Il présente un score de 35 pour une identification en LC-MALDI-Orbitrap et de 56 pour une identification en LC MALDI-TOF/TOF. Une telle différence s'explique par le fait que le nombre de fragments utilisés par Mascot pour réaliser l'identification est différent. En effet la fragmentation en MALDI-TOF/TOF a généré 17 fragments tandis que pour le même peptide la fragmentation dans la trappe pour l'Orbitrap a généré près de 60 fragments soit près de 3 fois plus. Le score tenant compte du taux d'identification, il sera donc plus faible.

La comparaison avec le mélange standard peu complexe n'étant pas suffisante pour déterminer de l'efficacité du couplage LC-MALDI, nous avons également décidé de comparer les analyses d'échantillons complexes. Dans notre cas nous avons utilisé dans un premier temps un mélange de protéines d'*Escherichia coli* et un échantillon complexe extrait de biopsies de poumons. Ces extraits sont analysés en triplicatas sur chaque appareil.

L'analyse de l'échantillon d'*Escherichia coli* est réalisée dans les mêmes conditions avec un échantillonnage toutes les 10 secondes et l'analyse MS/MS des 7 précurseurs les plus intenses. Le nombre de protéines identifiées avec plus de 2 peptides et un score minimum de 30 est présenté sur la figure 71.

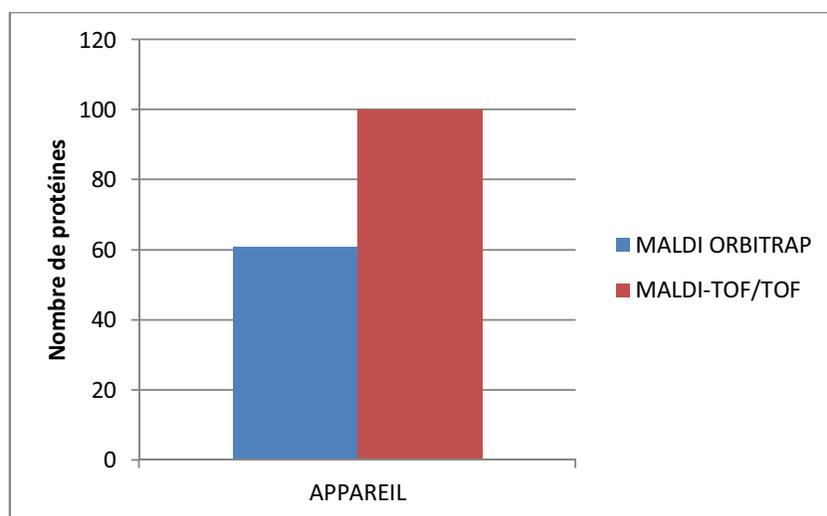


Figure 71: Protéines identifiées avec notre seuil de validation. En rouge le MALDI TOF/TOF et en bleu le MALDI-Orbitrap

Au total près de 100 protéines furent identifiées en LC-MALDI-TOF/TOF contre 60 en LC-MALDI-Orbitrap

Une telle différence semble assez surprenante à la vue des résultats observés précédemment. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet écart de valeur :

- Une mauvaise interprétation des MS/MS
- Un nombre de précurseurs insuffisants

Pour répondre à ces hypothèses nous avons décidé de réaliser la même analyse LC-MALDI-Orbitrap en sélectionnant 12 et 40 précurseurs afin de vérifier si le nombre de précurseurs sélectionnés a une incidence sur le nombre de protéines identifiées. En effet la fréquence laser étant plus faible pour l'Orbitrap l'échantillonnage de notre dépôt est moins importante.

L'analyse en LC-MALDI Orbitrap avec une sélection plus importante de précurseurs permet d'obtenir de meilleurs résultats en revanche le temps d'acquisition nécessitant à la fois un nombre élevé de microscans pour obtenir des MS/MS interprétables et un nombre de précurseurs important est beaucoup trop long.

Ceci est principalement du au mode d'analyse du spectromètre de masse qui réalise de façon successive les analyses MS et MS/MS à la manière d'un système électrospray.

Une optimisation est en cours avec l'utilisation d'un logiciel développé par le constructeur permettant de sélectionner les analyses MS/MS après retraitement de l'ensemble des données MS.

#### **IV.10.5 Conclusion**

Le couplage LC-MALDI s'avère être un outil puissant pour l'analyse protéomique, la sensibilité de cette approche associée à une analyse multiple d'un même échantillon est très intéressante dans le cadre de nos analyses. En effet elle permet d'effectuer a posteriori une recherche poussée de modifications post traductionnelles et de valider certaines MS/MS.

L'utilisation du MALDI-Orbitrap permet de gagner en résolution et en précision ce qui donne un intérêt supplémentaire au couplage LC-MALDI. Toutefois une optimisation logicielle est nécessaire pour réaliser des analyses LC-MS/MS à la fois rapide et comparables à la LC-MALDI-TOF/TOF. Tout comme le montre les travaux de Karas (Karas et al. 2011) seule une analyse combinée entre la MS de l'Orbitrap et la MS/MS du MALDI-TOF/TOF permet de tirer bénéfice des capacités du MALDI-Orbitrap pour une analyse LC-MS/MS.

#### IV.11 Etude de la complémentarité des modes d'ionisation ESI et MALDI

La mise au point des deux techniques de couplages LC-MALDI-TOF/TOF et LC-MALDI-Orbitrap est réalisée. Nous avons décidé de nous intéresser à l'étude de la complémentarité entre les modes d'ionisation MALDI et ESI afin d'évaluer l'intérêt d'une étude complète de nos protéines en association avec A $\beta$ . Pour cela nous avons réalisé différentes analyses permettant d'étudier les peptides communs et spécifiques de chaque approche.

La stratégie développée pour l'étude est la suivante :

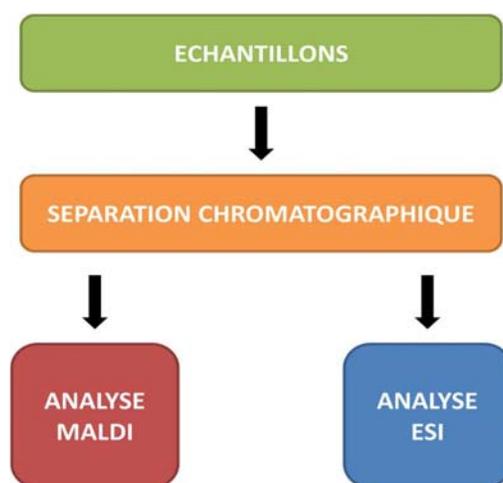


Figure 72: Stratégie de l'étude comparative des échantillons et analyse en ESI ou en MALDI

Un des points cruciaux de cette stratégie réside dans l'utilisation du même système chromatographique pour éviter tout biais lié à la séparation chromatographique des peptides. Pour cela nous avons utilisé un montage placé sur une paillasse mobile permettant le déplacement de celle-ci vers les différents appareils.

Comme pour l'ensemble des développements réalisés, les premières études sont réalisées à partir du mélange standard contenant 6 protéines (Sérum albumine bovine, serotransferrine bovine, ovalbumine de poulet, cytochrome c bovin, Alcool déshydrogénase Escherichia coli,  $\beta$ -Galactosidase Saccharomyces Cerevisiae). La description de ce mélange est donnée dans la partie Matériel et Méthodes. Vu la simplicité du mélange, les 6 protéines sont identifiées aussi bien en ESI qu'en MALDI, les différences ou similitudes seront observées au niveau peptidique. Vingt fmol de ce mélange standard furent analysées en parallèle en LC-MALDI-TOF/TOF et LC-ESI-LIT-FTICR. Les expériences furent réalisées en triplicatas permettant de tenir compte du biais lié à la répétabilité. Pour faciliter le tri des peptides nous fusionnons les 3 analyses en MALDI d'une part et en ESI d'autre part, afin d'obtenir 1 jeu de peptides pour chacune des conditions d'ionisation.

Chaque protéine du mélange standard est validée avec un minimum de 2 peptides, de score minimum de 30. Nous avons pu obtenir un total de 114 peptides répartis en 3 groupes : les peptides communs (54), les peptides spécifiques identifiés en MALDI (30) et les peptides spécifiques identifiés en ESI (30).



Figure 73 : Répartition des peptides standards identifiés lors d'une analyse en triplicata selon le spectromètre de masse utilisé (MALDI= MALDI-TOF/TOF, ESI = ESI-LIT-FTICR)

En observant le résultat de cette première étude nous pouvons remarquer une répartition assez équilibrée des peptides en fonction du mode d'ionisation utilisé. Cela confirme les premières études de Bodnar traitant de la complémentarité entre l'ESI et le MALDI (Bodnar et al. 2003). Nous reviendrons par la suite sur la nature de chaque sous groupe. La liste détaillée est donnée en IAnnexe 7

#### IV.11.1 Comparaison MALDI-TOF/TOF, l'ESI-FTICR, l'ESI-Orbitrap et MALDI Orbitrap

Nous avons voulu aller plus loin dans la comparaison des sous groupes de peptides en utilisant le même échantillon standard. Pour cela nous avons comparé les 4 jeux de peptides identifiés avec les 4 spectromètres de masse disponibles au laboratoire (le MALDI-TOF/TOF, l'ESI-LTQ/FTICR, l'ESI-LTQ/Orbitrap et le MALDI-LTQ/Orbitrap). Avec l'ensemble des données issues des quatre appareils et toujours en analysant notre mélange de 6 protéines standard nous obtenons un total de 123 peptides.

Le Tableau 25 dresse le bilan de la répartition des peptides en fonction des spectromètres dans lequel le peptide a été identifié.

Tableau 25: Peptides identifiés selon le spectromètre et le type d'ionisation à partir de 20 fmol du mélange des 6 protéines standard.

Peptides communs aux quatre spectromètres	38
Peptides communs MALDI/ESI	23
Peptides uniques ESI (2 appareils)	13
Peptides uniques MALDI (2 appareils)	13
Peptides uniques 1 appareil	36

L'analyse différentielle du mélange standard utilisé au laboratoire nous permet d'observer une complémentarité peptidique entre les spectromètres de masse de type ESI et les spectromètres de masse de type MALDI. Sur l'ensemble des peptides identifiés 38 peptides sont communs aux quatre spectromètres de masse, et 23 sont communs dans les deux modes d'ionisation avec au moins un appareil.

Le résultat intéressant concerne les peptides uniques pour chaque type d'ionisation. En effet pour chaque mode d'ionisation certains peptides sont spécifiques ; 13 peptides sont identifiés uniquement en ESI-FTICR et ESI-Orbitrap et 13 sont identifiées uniquement en MALDI-TOF/TOF et MALDI-Orbitrap.

Au vu de ces premiers résultats traitant de la complémentarité ESI-MALDI il est intéressant de noter qu'a priori le mode d'ionisation est un élément discriminant clé dans l'identification des peptides et que la nature de l'analyseur semble moins importante.

En effet, dans cette analyse nous observons également une complémentarité au niveau peptidique avec un grand nombre de peptides uniques pour chaque type d'ionisation. Une meilleure visualisation de la complémentarité peptidique au sein des séquences des protéines est réalisée avec l'outil de validation MyProms (Proteome Analysis using Mass Spectrometry with MySQL Database, Institut Curie Paris France) (Pouillet et al. 2007). Cet outil permet la gestion et la validation des échantillons.

Nous avons choisi l'exemple de deux protéines du mélange standard pour observer la complémentarité peptidique.

### Exemple de l'albumine bovine :

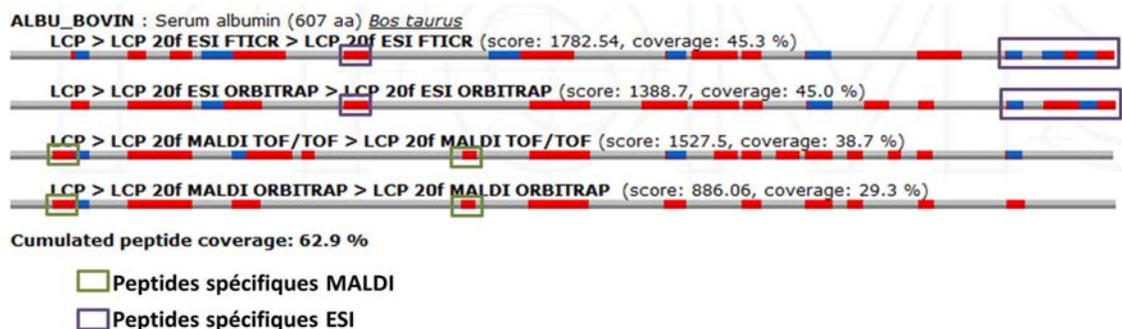


Figure 74 : Comparaison des séquences peptidiques ESI et MALDI pour les quatre spectromètres de masse.

Les peptides encadrés en vert représentent les peptides identifiés uniquement en MALDI et les peptides encadrés en violet les peptides identifiés uniquement en ESI. Nous observons de nouveau la complémentarité entre ESI MALDI indépendante de l'analyseur utilisé. La séquence de chaque peptide spécifique est présentée dans le tableau 26.

Cependant un mélange de 6 protéines ne représente en aucun cas un échantillon de choix pour développer ce type de comparaison car il n'est pas assez complexe. De plus nous n'avons pas encore établi de profil

protéique permettant de confirmer les hypothèses et les études sur la complémentarité des deux types d'approches au niveau de l'analyse d'un protéome. Pour cela l'utilisation de différents mélanges plus complexes s'avère nécessaire. Dans notre cas nous avons utilisé plusieurs types d'échantillons qui sont présentés dans la suite.

#### IV.11.2 Comparaison LC- MALDI-TOF/TOF vs. LC-ESI-FTICR d'un échantillon de protéines d'*Escherichia coli*

Les analyses précédentes réalisées à partir d'un échantillon standard nous ont permis d'observer une complémentarité au niveau peptidique de l'approche d'analyse parallèle MALDI/ESI. Pour travailler au niveau protéique, nous avons analysé en triplicata sur chacune des configurations, un échantillon protéique plus complexe extrait d'*E. coli*. Dans ce cas l'analyse a été réalisée sur les peptides validés selon nos critères de validation afin d'obtenir uniquement les peptides détectés, fragmentés et validés par Mascot.

Les résultats obtenus au niveau protéique sont présentés Figure 75.

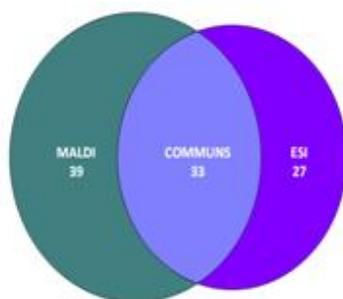


Figure 75 : Nombre de protéines identifiées pour chaque ionisation utilisée dans le cas de l'analyse d'un mélange de protéine soluble *E. Coli*. Les protéines indiquées ont été identifiées en triplicata avec le mode d'ionisation indiqué (MALDI TOF/TOF ou ESI LIT-FTICR).

La complémentarité est également retrouvée au niveau du protéome avec

- 27 protéines spécifiques à l'ionisation ESI
- 39 spécifiques à l'ionisation MALDI
- 33 protéines identifiées avec les deux modes d'ionisation

Une complémentarité du protéome implique obligatoirement une complémentarité peptidique. Pour étudier spécifiquement la complémentarité peptidique de cet échantillon nous avons considéré l'ensemble des peptides identifiés et validés pour chaque mode d'ionisation pour chacune des 3 analyses.

Les deux jeux de peptides (détectés en ESI et en MALDI) sont ensuite comparés afin de déterminer les peptides communs et les peptides uniques à chaque mode d'ionisation. Comme illustré en Figure 76 une bonne répartition est également observée avec cet échantillon, comme nous l'avions montré avec

l'échantillon standard LCP. Ceci suggère qu'au-delà de la complémentarité des résultats au niveau protéique, la combinaison des deux modes d'ionisation nous permet aussi d'augmenter la couverture de séquence des protéines identifiées.



Figure 76 : Nombre de peptides identifiés pour chaque mode d'ionisation utilisé dans le cas de l'analyse d'un mélange de protéine soluble *E. Coli*.

Les peptides indiquées ont été identifiés en triplicata avec le mode d'ionisation indiqué (MALDI TOF/TOF ou ESI LIT-FTICR).

Dans le cadre de notre étude, une analyse différentielle des peptides a été réalisée entre un échantillon d'*E. coli* analysé en triplicata par LC-MALDI-Orbitrap et en LC-ESI-FTICR. A titre d'exemple nous nous sommes intéressés à une protéine en particulier : la DNA-directed RNA polymerase subunit alpha (RPOA).

À partir des résultats obtenus pour chacune des analyses nous avons pu obtenir une représentation graphique des pourcentages de séquences, des peptides identifiés pour chaque type d'ionisation. Cette représentation nous permet de déterminer les peptides en commun pour chacun des modes d'ionisations.

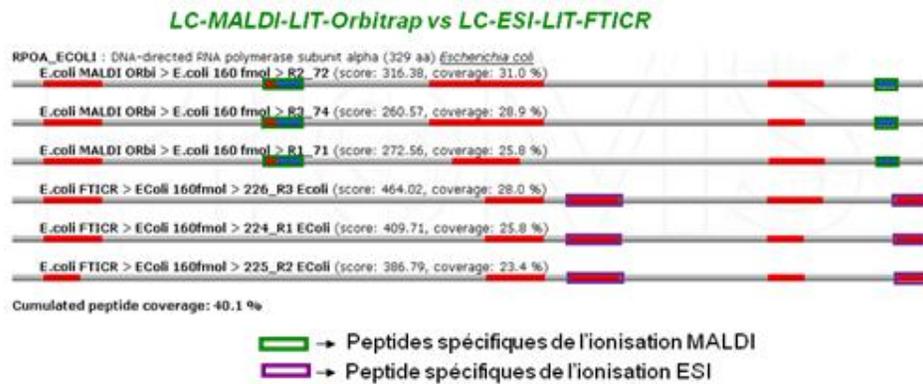


Figure 77 : Comparaison des couvertures de séquence protéique en fonction du mode d'ionisation illustrant la reproductibilité des résultats

L'analyse différentielle des peptides démontre l'intérêt d'analyser un échantillon avec deux modes d'ionisation. Dans le cas de la protéine RPOA, l'identification avec un seul mode d'ionisation permet d'obtenir en moyenne une couverture de séquence de 27,15%, alors que le pourcentage cumulé atteint 40,1 % en tenant compte des peptides différents identifiés avec les deux modes d'ionisation.

Nous pouvons également citer l'exemple de l'enolase avec le graphique présenté ci-dessous, nous montrant les peptides spécifiques à l'ionisation MALDI et ESI. Comme pour l'exemple précédent l'accumulation des deux séquences ESI et MALDI augmente la couverture totale de la protéine.



Figure 78 : Comparaison des couvertures de séquence protéique (enolase) en fonction du mode d'ionisation illustrant la reproductibilité des résultats.

Le tableau 26 présente la séquence en acides aminés de chacun des peptides spécifiques à chaque mode d'ionisation dans le cadre de l'analyse d'*E. Coli*

Tableau 26: Séquence en acides aminés de chaque peptide identifié de façon reproductible selon le mode d'ionisation (enolase)

Séquences spécifiques ESI	Séquences spécifiques MALDI
AVAAVNGPIAQALIGK	MGSEVFHHLAK
DITLAMDCAASEFYK	YVLAGEGNK
FNQIGSLTETLAAIK	
IMIDLDTENK	
IQLVGDDLFTNTK	
SGETEDATIADLAVGTAAGQIK	

La même tendance est également observée pour d'autres protéines, nous pouvons prendre pour exemple la protéine ribosomale 50S L2 et la protéine chaperone dnaK présentant des peptides spécifiques pour chaque mode d'ionisation. Ces différents peptides sont visualisés sur la figure 78 et 79.

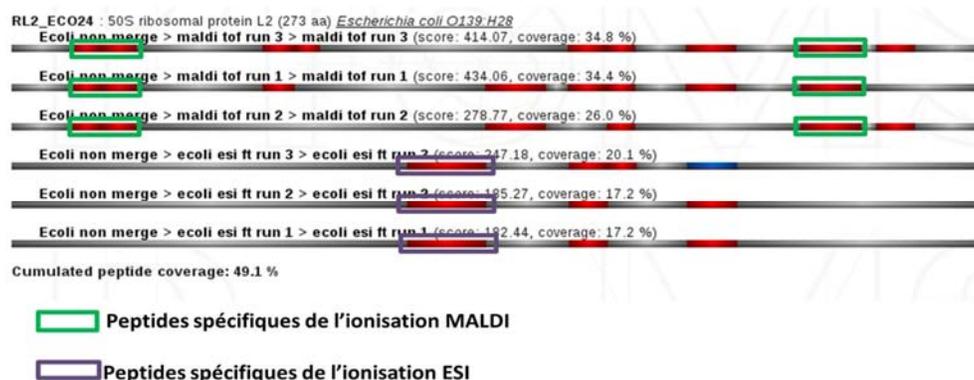


Figure 79 : Comparaison des couvertures de séquence protéique (50S ribosomal protein L2) en fonction du mode d'ionisation illustrant la reproductibilité des résultats.

Le tableau 27 nous donne la séquence des peptides observés dans les 3 runs LC et spécifique à chaque mode d'ionisation.

Tableau 27: Séquence en acides aminés de chaque peptide identifié de façon reproductible selon le mode d'ionisation (protéine ribosomale 50S L2)

Séquences spécifiques ESI	Séquences spécifiques MALDI
AGDQIQSGVDAAIKPGNTLPMR	GKPFAPLLEK
	GTAMNPVDHPPHGGGEGR
	VVNPELHK

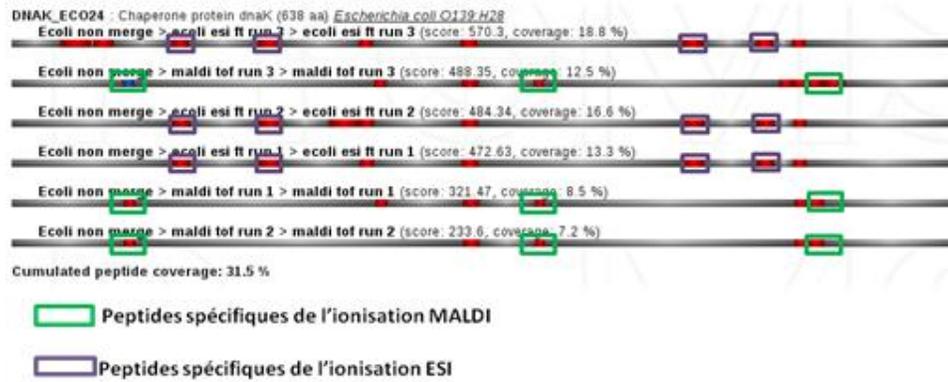


Figure 80 : Comparaison des couvertures de séquence protéique (50S ribosomal protein L2) en fonction du mode d'ionisation illustrant la reproductibilité des résultats.

Tableau 28: Séquence en acides aminés de chaque peptide identifié de façon reproductible selon le mode d'ionisation (protéine chaperone dnaK)

Séquences spécifiques ES	Séquences spécifiques MALDI
ASSGLNEDEIQK	FQDEEVQR
IINEPTAAALAYGLDK	NQGDHLLHSTR
LINYLVEEFK	VAEFFGK
MAPPQISAEVLK	
SLGQFNLDGINPAPR	

#### IV.11.3 Comparaison LC- MALDI-TOF/TOF vs. LC-ESI-FTICR de polygones de souris

Afin d'augmenter la couverture du protéome dans le cadre d'une collaboration, nous avons réalisé une étude parallèle pour identifier et analyser les polygones de cerveau de souris. L'analyse en triplicata pour chaque méthode d'ionisation nous a permis d'obtenir une identification protéique toujours marquée par la complémentarité des analyses LC-MALDI-MS/MS et LC-ESI-LIT-FTICR (voir Figure 81). Dans ce cas précis 17 protéines sont communes aux deux approches alors que 9 protéines sont exclusivement identifiées en électrospray et 3 en MALDI.

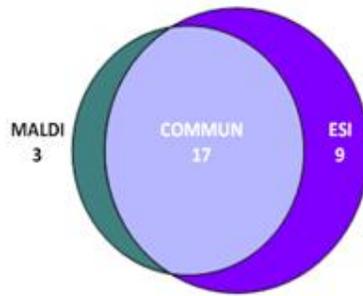


Figure 81 Identification du nombre de protéines des polygones de cerveau de souris après analyse LC-MALDI-TOF.TOF vs. LC-ESI-LIT-FTICR

Ici la complémentarité est moins marquée au niveau protéique. Ceci est dû sans doute à la plus faible complexité des échantillons. L'analyse des peptides va nous permettre de déterminer si cette tendance est également valable pour les peptides (Figure 82)

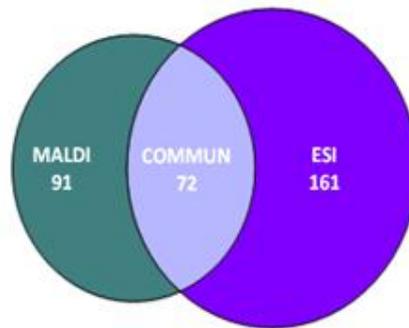


Figure 82 Identification du nombre de peptides des polygones de cerveau de souris après analyse LC-MALDI-TOF.TOF vs. LC-ESI-LIT-FTICR

On remarque également une complémentarité peptidique marquée par la présence de 161 peptides spécifiques de l'ionisation ESI et 91 spécifiques de l'ionisation MALDI.

Tout comme l'analyse des protéines d'*Escherichia coli* nous pouvons également visualiser les peptides spécifiques de chaque mode d'ionisation. Ces différents peptides sont présentés dans les figures et tableaux ci-dessous.

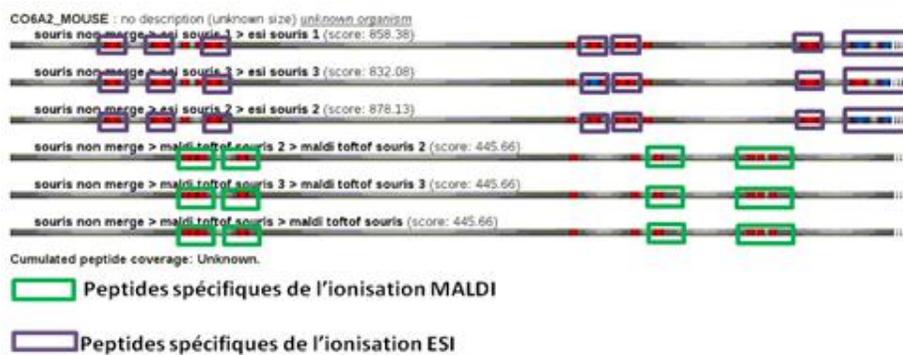


Figure 83 : Comparaison des couvertures de séquence protéique (Collagène-alpha-2 VI) en fonction du mode d'ionisation illustrant la reproductibilité des résultats.

Tableau 29: Séquence en acides aminés de chaque peptide identifié de façon reproductible selon le mode d'ionisation (Collagène-alpha-2 VI)

Séquences spécifiques ESI	Séquences spécifiques MALDI
ATYLNFSFHVGTGIVHAINNVVR	H DPRDDDLNLR
DFDSL AQP SFFDR	LGEQNFHK
EKDFDSL AQP SFFDR	NLNEQGLR
GVVNFAVVITDGHVITGSPCGGIK	RDDDPLNAR
NLEWIAGGTWTPSALK	RFVEDVSR
NNYATMRPDSTEIDQDTINR	VSCLEIPGPHGPK
QNVVPTVVAVGGDMDVLT K	
VFAVVITDGR	
VGVVQYSHEGTFEAIR	

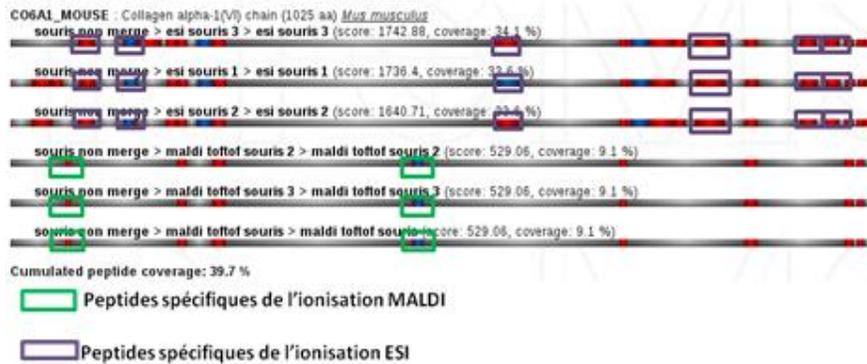


Figure 84 : Comparaison des couvertures de séquence protéique (Collagène-alpha-1 VI) en fonction du mode d'ionisation illustrant la reproductibilité des résultats.

Tableau 30: Séquence en acides aminés de chaque peptide identifié de façon reproductible selon le mode d'ionisation (Collagène-alpha-2 VI)

Séquences spécifiques ESI	Séquences spécifiques MALDI
AGIEIFVVVVG PQVNEPHIR	FIDNLR
CPDYTCPITFSSPADITILLDSSASVGS HNFETTK	GDEGPPGPEGLR
DAEEVISQTIDTIVDMIK	GYRGDEGPPGPEGLR
DTTPLSVLCGADIQVVSVGIK	
DVFGFVAGSDQLNVISCQGLSQGRP GISLVK	
GLEELLIGGSHLK	
GLEELLIGGSHLKENK	
GPEGPQGPPGHVGPDPDECEILDII MK	
GVLYQTVSR	
NLVWNAGALHYSDEVEIIR	
SDTQRDTTPLSVLCGADIQVVSVGIK	
VFSVAITPDHLEPR	
VLLFSDGNSQGATAEAIK	

La tendance est également confirmée (Il faut noter bien sûr que les 91 peptides identifiés uniquement en MALDI ne correspondent pas exclusivement aux 3 protéines identifiées uniquement en MALDI de la Figure 81 : Parmi ces 91 peptides on retrouve des peptides appartenant à des protéines identifiées en commun.

Ces différentes analyses LC-MS/MS avec deux sources d'ionisation différentes nous ont permis de mettre en évidence la complémentarité des sources ESI et MALDI. Ces analyses montrent également la capacité du couplage LC-MALDI TOF/TOF permettant d'obtenir des résultats de qualité proche au couplage LC-ESI LIT/FTICR.

#### **IV.11.4 Comparaison 2D-LC-MALDI TOF/TOF vs. 2D-LC-ESI-FTICR**

Afin de compléter cette série d'analyses nous avons voulu travailler sur des mélanges de plus haute gamme dynamique qui nécessitent d'optimiser la séparation en amont. Nous avons ajouté une dimension supplémentaire en réalisant une chromatographie bidimensionnelle SCX-RPLC (Echange de cation et polarité de phase reverse). Cette séparation chromatographique permettant la séparation d'un grand nombre de peptides va nous permettre d'identifier et de comparer les peptides et les protéines validées avec chaque mode d'ionisation.

Nous avons analysé en 2D-LC-MALDI-TOF/TOF et 2D-LC-ESI-FTICR un échantillon de *stratum corneum* plantaire (échantillon de peau de la corne de pied). Ce type d'échantillon est très riche en kératines, et pour lever le problème de gamme dynamique la séparation bidimensionnelle s'est avérée indispensable. En effet en 1DLC plus de la moitié des protéines identifiées sont du type kératine.

Afin d'être dans les mêmes conditions nous avons réalisé une séparation en mode « off-line », avec dans un premier temps une collecte des différentes fractions issues de la 1ère dimension correspondant à la séparation par échange de cations. Chaque fraction est ensuite réinjectée dans un système chromatographique RP soit pour une analyse en ESI, soit pour une analyse en MALDI.

Cette analyse nous a permis d'identifier et valider 99 protéines au total en électrospray et 76 protéines au total en MALDI avec 52 protéines en commun (voir Figure 85). Pour les peptides nous avons 487 peptides identifiés en électrospray et 415 peptides identifiés en MALDI avec 213 peptides communs (voir Figure 86). L'analyse différentielle des protéines nous permet de grouper les protéines exclusivement identifiées pour chaque mode d'ionisation.

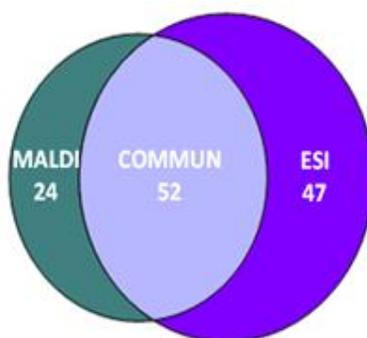


Figure 85 : Distribution des protéines identifiées en 2DLC MS/MS (MALDI = MALDI-TOF/TOF, ESI = ESI-LIT-FTICR)

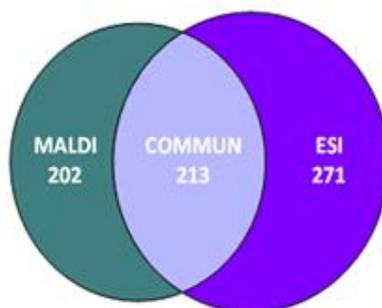


Figure 86: Distribution des peptides identifiées en 2DLC MS/MS (MALDI = MALDI-TOF/TOF, ESI = ESI-LIT-FTICR)

Ici aussi nous avons constaté une bonne répartition des identifications tant au niveau protéique qu'au niveau peptidique comme illustré par les diagrammes de Venn des Figure 85 et Figure 86, ce qui vient confirmer la complémentarité des deux approches.

#### IV.11.5 Analyses des caractères physico-chimiques dans le cadre de la comparaison ESI/MALDI

Les résultats présentés ci-dessus confirment la complémentarité des modes d'ionisation ESI et MALDI. Afin de comprendre quels paramètres physico chimiques pouvaient influencer l'ionisation des peptides, nous avons réalisé différentes comparaisons en fonction de paramètres tels que la longueur de séquence, la masse, le pI.

##### IV.11.5.1 Longueur de la séquence peptidique

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'influence du nombre d'acides aminés que comporte la séquence de chacun des acides aminés identifiés pour chacun des modes d'ionisation. Les deux graphiques suivants présentent la répartition des peptides en fonction du mode d'ionisation et du nombre d'acides aminés composant leur séquence, pour deux types d'échantillons : le mélange protéique *E. Coli* (Figure 87) et le mélange protéique de *stratum corneum* humain (Figure 88).

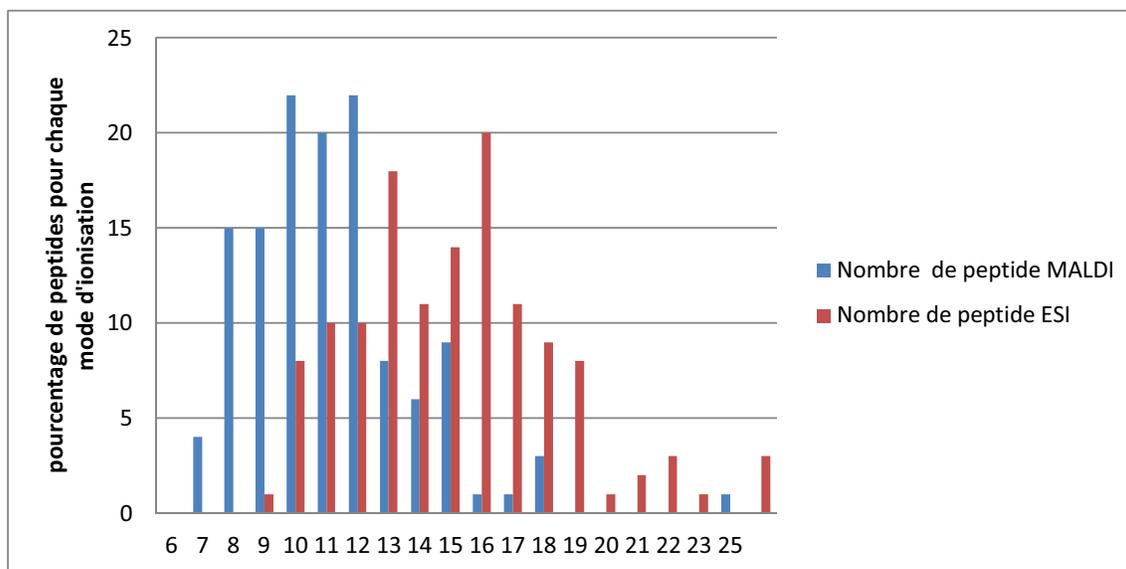


Figure 87: Distribution du nombre de peptides identifiés en fonction de la longueur de séquence de chaque peptide selon le mode d'ionisation. (Peptides issus du mélange *E.coli* en LC1D, MALDI = MALDI-TOF/TOF, ESI = ESI-LIT-FTICR)

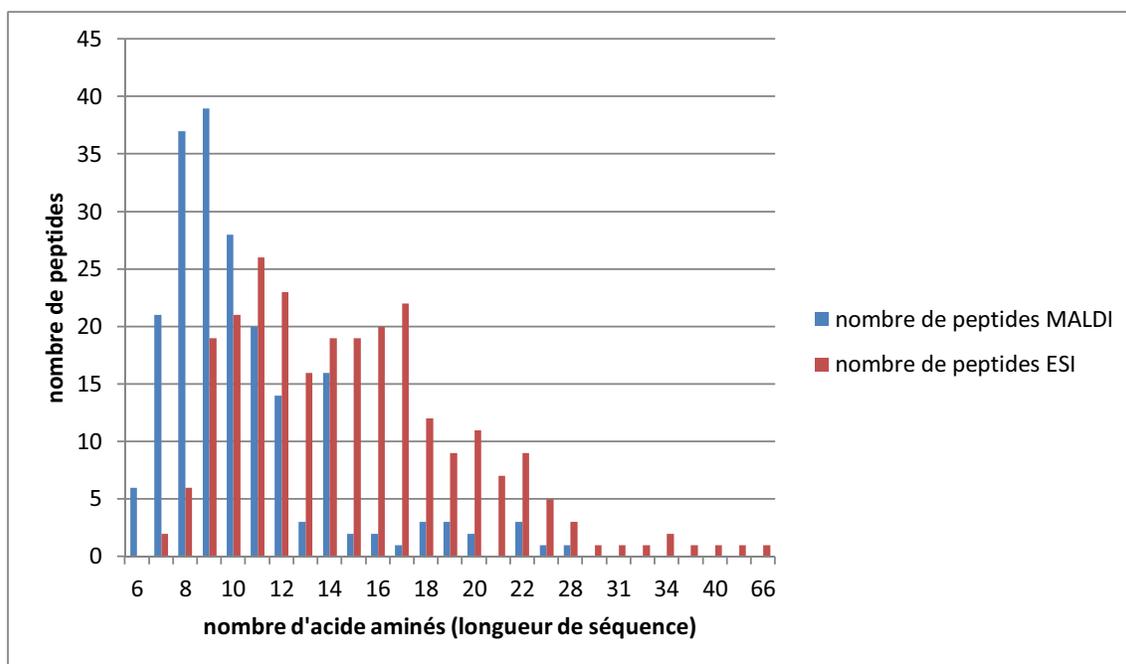


Figure 88 : Distribution du nombre de peptides identifiés en fonction de la longueur de séquence de chaque peptide selon le mode d'ionisation. (Peptides issus du mélange de *Stratum corneum* en LC2D, MALDI = MALDI-TOF/TOF, ESI = ESI-LIT-FTICR)

Les deux exemples ci-dessus nous montrent la distribution des peptides identifiés en ESI ou MALDI selon la taille de la séquence. Nous remarquons que la distribution des peptides est centrée sur des séquences plus longues en ESI. Seul l'ESI permet d'identifier les peptides comportant plus de 28 AA. A

l'inverse les peptides de petite taille mieux identifiés en MALDI. En dessous de 10 AA il y a une très forte proportion des peptides identifiés uniquement en MALDI : 131 peptides détectés en MALDI contre 48 en ESI, soit plus de 73%. Une première explication est la formation d'ions doublement ou triplement chargés en ESI, ce qui permet une efficacité de fragmentation supérieure car l'apport d'énergie nécessaire pour la fragmentation est inférieur. A l'inverse en MALDI les ions de petite taille peuvent être détectés plus facilement sous la forme d'ions monochargés. La gamme de masse sélectionnée pour chacun des appareils a également son importance dans la détection de certaines espèces. En effet la limitation minimale à 700 Da pour le MALDI permet d'éviter de saturer le détecteur avec les clusters de matrices et autres contaminants de basse masse. La limitation inférieure en ESI est fixée à 450 Da, pour éliminer les contaminants de type polydiméthylsiloxane qui pourraient saturer la trappe d'ions d'espèces sans intérêt, ce qui correspond à une limite inférieure plus grande en terme de masse moléculaire (900 uma en ESI et 700 uma en MALDI) et peut jouer un rôle pour la discrimination en basses masses dont il faut tenir compte.

#### IV.11.5.2 Acides aminés en position C-terminale

Afin de vérifier l'influence de la nature du résidu C-ter des différents peptides nous avons comparé pour chacun des modes d'ionisation le pourcentage de peptides possédant une lysine ou une arginine en position C-ter.

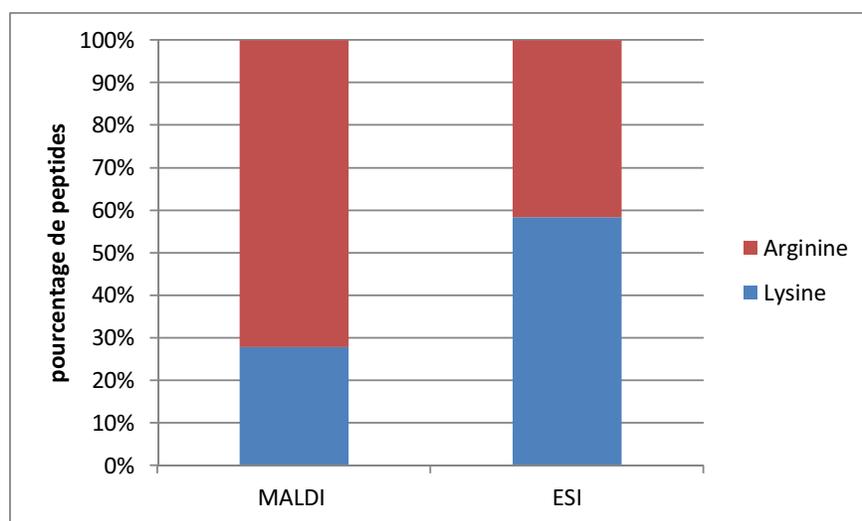


Figure 89 Pourcentage de peptides possédant une lysine ou d'arginine en position C-terminale en fonction du type d'ionisation (Combinaison de l'ensemble des peptides présentés lors des analyses précédentes *E.coli*, *Stratum corneum* et souris)

L'ionisation MALDI semble légèrement plus favorable pour les peptides ayant une arginine C-terminale (avec en moyenne 72% des peptides identifiés uniquement en MALDI contre 41% pour l'ESI)

contrairement à l'ESI qui semble plus sensible aux peptides ayant une terminaison lysine (avec en moyenne 58 % des peptides identifiés uniquement en ESI contre 28% en MALDI).

Cette observation est en accord avec les études publiées précédemment (Mollé et al. 2009 ; Bodnar et al. 2003)

#### IV.11.5.3 Point isoélectrique des différents peptides ESI et MALDI

La même comparaison a également été réalisée afin de déterminer l'influence du point isoélectrique des peptides détectés en MALDI et des peptides détectés en ESI.

Pour chacun des modes d'ionisation nous avons déterminé le pourcentage de peptides correspondant aux différents points isoélectriques des peptides.

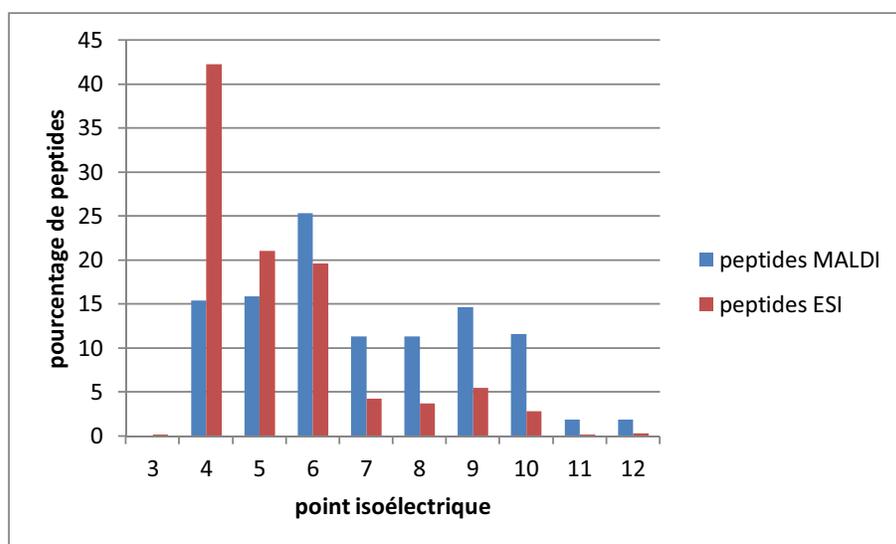


Figure 90 : Pourcentage de peptides ESI et MALDI en fonction du point isoélectrique calculé de l'ensemble des échantillons analysés.

Au vu des résultats des points isoélectriques des peptides identifiés selon le mode d'ionisation il semble que les peptides possédant un pI supérieur à 6 s'ionisent plus difficilement en ESI qu'en MALDI.

#### IV.11.5.4 Répartition des masses en fonction de l'ionisation

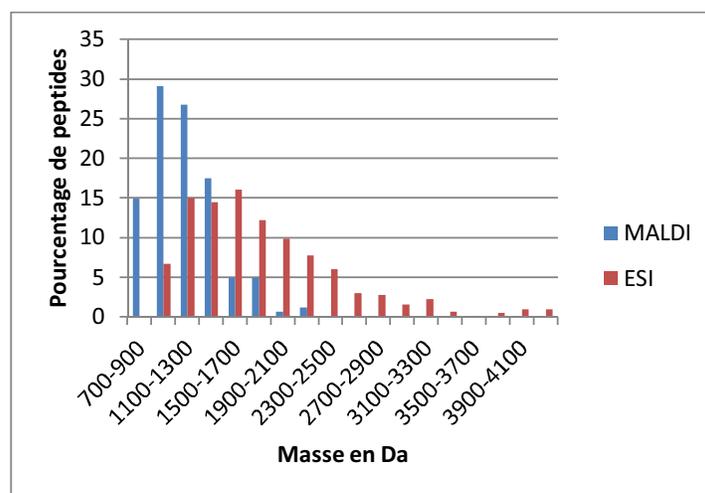


Figure 91: Pourcentage de peptides ESI et MALDI en fonction de la masse des peptides en Da.

Le graphique présenté ci-dessus nous montre le profil spécifique des peptides ESI et MALDI en fonction des masses des peptides. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en tenant compte du nombre de résidus inclus dans la séquence de chaque peptide. Ainsi, on y remarque une présence de hautes masses exclusivement pour les peptides identifiés en ESI. La gamme de masse pour ces peptides est de 900 à 4300 Da. Pour les peptides ionisés en MALDI on remarque une majorité de peptides dans les basses masses avec une gamme de masse allant de 700 à 2300. Cette différence notable de masse pour ces peptides peut s'expliquer par le mode d'ionisation, en effet la possibilité d'obtenir des ions multichargés permet d'obtenir des ions de haute masse contrairement à l'ionisation MALDI qui permet l'obtention majoritaire d'ions monochargés. Avec cette charge unique il est plus difficile d'obtenir une bonne fragmentation pour les « gros » peptide. Enfin il faut remarquer que la distribution ici est plus régulière et il semble que la masse plus que le nombre de résidus soit importante pour réaliser une discrimination ESI/MALDI.

#### IV.11.5.5 Répartition du nombre d'éléments basiques selon le mode d'ionisation.

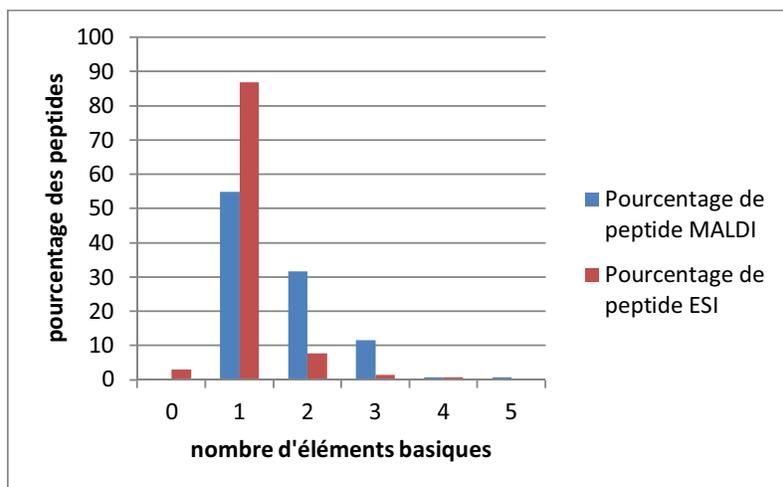


Figure 92: Pourcentage de peptides ESI et MALDI en fonction du nombre d'éléments basiques des peptides. (Etude des peptides d'*E. coli*)

L'influence des éléments basiques des peptides semble également jouer un rôle dans le phénomène d'ionisation des peptides. En effet on remarque un nombre d'éléments basiques plus faible en ESI et une tendance contraire en MALDI.

#### IV.11.5.6 Répartition de la charge nette positive et négative selon le mode d'ionisation

Dans le but de déterminer les différents facteurs entraînant une ionisation préférentielle en MALDI et ESI nous avons également calculé les charges nettes positives et négatives de chaque peptide spécifique des modes d'ionisation. Le résultat de cette analyse est présenté figures 92 et 93.

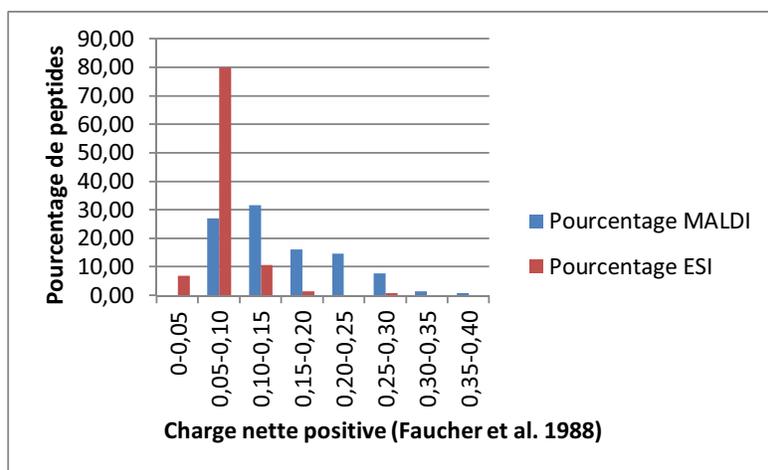


Figure 93: Pourcentage de peptides ESI et MALDI en fonction de la charge nette positive.

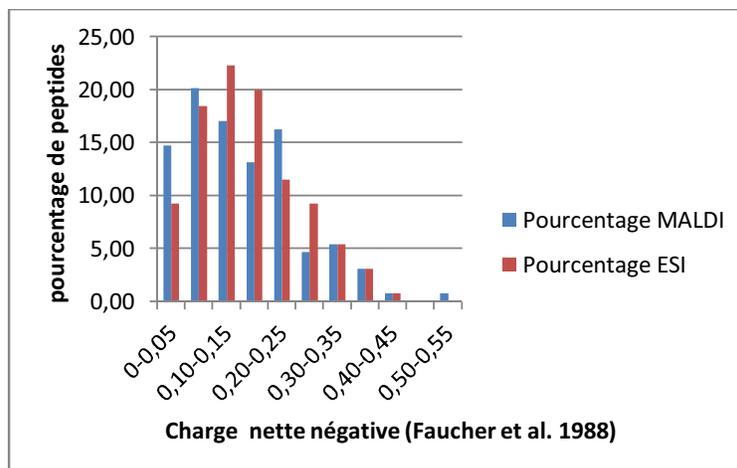


Figure 94: Pourcentage de peptides ESI et MALDI en fonction de la charge nette négative.

En observant ces deux graphiques nous remarquons que la charge nette positive a une influence nettement plus marquée sur l'ionisation des peptides ESI et MALDI à la différence de la charge nette négative qui présente une influence moindre sur la différence des peptides ESI/MALDI.

#### IV.11.5.7 Répartition de l'accessibilité aux solvants en fonction du mode d'ionisation.

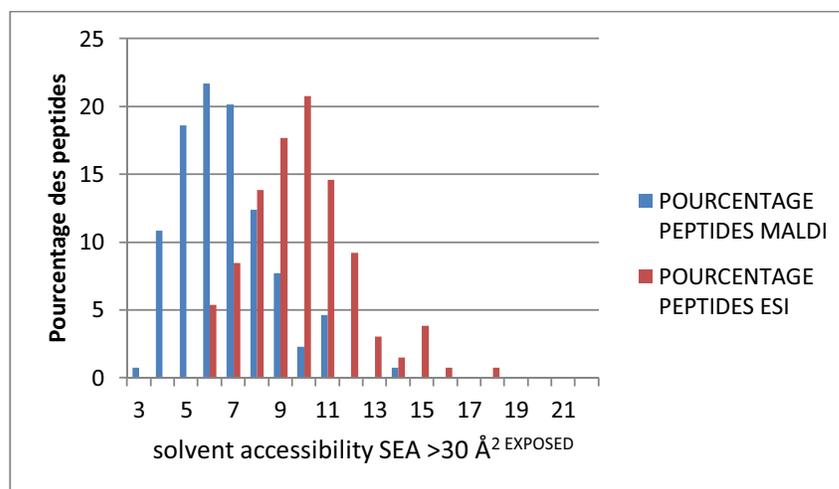


Figure 95: Pourcentage de peptides ESI et MALDI en fonction de l'accessibilité au solvant > 30 Å.

Les différents paramètres présentés ci-dessus confirment la présence de facteurs physico-chimiques discriminants et entraînant une ionisation préférentielle des peptides selon le mode d'ionisation utilisé. Les facteurs tels que la masse, le pI, le nombre d'éléments basiques, la charge nette positive et l'accessibilité au

solvant permettent d'observer une différence entre les peptides uniques spécifiques de l'ionisation MALDI et les peptides uniques spécifiques de l'ionisation ESI.

Outre ces paramètres, 545 paramètres restant sont calculés et vont conduire à une analyse statistique plus poussée.

# V Discussion

---

Dans le but d'identifier les partenaires des formes fibrillaires de l'A $\beta$  1-42, nous avons utilisé un test de co-précipitation entre des fibrilles d'A $\beta$  1-42 synthétiques et des protéines extraites de synaptosomes de rats (Lorenzo et al., 2000, Verdier et al., 2005).

## **Modèle expérimental.**

Après les premières expériences de mise au point, nous avons réalisé ce test sur des protéines provenant de 6 échantillons indépendants. Chacun de ces échantillons a été testé en triplicat analytique. Nous avons validé toutes les protéines ayant un score MASCOT supérieur à 30 et identifiées par au moins 2 peptides. Afin d'identifier les protéines spécifiquement liées à l'A $\beta$  fibrillaire, un contrôle négatif a été utilisé. Celui-ci consistait à réaliser le même test de co-précipitation en incubant les protéines extraites des synaptosomes de rats avec de la beta-cristalline fibrillaire. Ces fibres de  $\beta$ -cristalline sont constituées d'agrégats sphériques d'un diamètre de 20 nm, apparaissant comme un « collier de billes » non ramifié d'une longueur maximum de 800 nm de long (Meehan et al., 2004). Au contraire, les fibres d'A $\beta$  s'assemblent sous forme de protofibrilles de 3-4 nm de diamètre, qui vont s'assembler en fibres non branchées de 7 à 10 nm de diamètre et d'une longueur de quelques micromètres (Verdier et al., 2005). Notre témoin négatif consiste donc en fibres n'ayant aucune séquence commune avec l'A $\beta$  1-42.

Dans notre modèle, nous avons incubé ces fibres avec des protéines extraites de synaptosomes de rats, l'A $\beta$  étant décrite comme étant synapto-toxique (Selkoe et al., 2002). Les synaptosomes ne sont pas des organelles à proprement parler, mais des sacs membranaires artificiels contenant des composants synaptiques, utilisés très souvent pour étudier la transmission synaptique. En effet, ils contiennent la terminaison synaptique complète, y compris des mitochondries, les vésicules synaptiques, la membrane post-synaptique et la densité post-synaptique (Bai et Witzmann, 2007). Notre protocole de fractionnement subcellulaire avait également comme objectif d'augmenter la proportion de protéines membranaires dans la solution incubée avec l'A $\beta$  (Stevens et al., 2003). En effet, il a été rapporté que la méthode sur gradient de densité de sucrose produisait la plus forte proportion de protéines membranaires parmi les autres méthodes d'isolement de protéines (Roth et al., 1981). L'A $\beta$  étant dans un compartiment extracellulaire nous avons cherché à augmenter cette proportion de protéines car nous avons supposé qu'elle se lierait en premier avec des protéines membranaires ou sécrétées. Ces protéines sont donc celles dont l'interaction avec l'A $\beta$  a le plus de chances d'avoir une signification patho-physiologique.

Dans un premier temps, nous considérons les protéines validées dans au moins une analyse, pour l'un des échantillons incubés avec l'A $\beta$ , et qui ne sont jamais identifiées dans le témoin négatif. En tout, 172 protéines ont ainsi été identifiées.

Il a été démontré que les fibres d'A $\beta$  peuvent interagir avec un grand nombre de protéines solubles. Il a été proposé que, suite à l'interaction entre les fibres d'A $\beta$  25-35 et les protéines solubles, ces protéines pourraient former des agrégats amorphes et co-précipiter avec les fibres d'amyloïde (Konno, 2001). Il est également possible que le mauvais repliement des protéines induit par les fibres d'A $\beta$  initie l'agrégation et la précipitation des protéines solubles en raison de la plus forte tendance des protéines non-repliées à s'agréger (par rapport aux protéines repliées) (Fink, 1998). Ces deux mécanismes, proposés par l'A $\beta$  25-35, pourraient évidemment être valables pour l'A $\beta$  1-42 utilisé dans le présent travail. L'implication physiologique de ce mécanisme serait que les fibrilles d'A $\beta$  pourraient interférer avec un grand nombre de systèmes biologiques en interagissant avec différents partenaires moléculaires.

Cependant, il faut aussi considérer l'hypothèse que l'interaction des protéines avec les fibrilles d'amyloïde aurait un rôle protecteur, cette adhésion modifiant les propriétés de surface des fibrilles et réduisant leur toxicité (Konno, 2001). Il a été démontré que l'interaction des fibrilles d'A $\beta$  avec des protéines de type trans-glutamase avait un effet sur la structure des fibrilles (Konno et al., 2005).

### **Protéines identifiées**

Pour présenter nos résultats, nous pouvons classer les 172 protéines identifiées en cinq groupes, en fonction de leur localisation cellulaire :

- La mitochondrie
- Le réticulum endoplasmique
- Le cytoplasme
- La membrane plasmique
- Le milieu extracellulaire

### ***Protéines mitochondriales***

Il est maintenant bien établi que le dysfonctionnement de la mitochondrie induit par l'A $\beta$  est associé avec la perte de transmission synaptique et l'apoptose dans la MA (Hashimoto et al., 2003). En particulier, il a été montré que les mitochondries synaptiques subissent de multiples dysfonctions dans la MA, dont l'accumulation d'AB, une augmentation du stress oxydatif, une diminution de la respiration cellulaire et une réduction de la capacité à capter les ions calciums. Il est intéressant de noter que ces phénomènes sont

très précoces dans la MA, et apparaissent pour les mitochondries synaptiques avant d'apparaître pour les mitochondries non-synaptiques (Du et al., 2011).

A notre connaissance, il n'existe aucun travail montrant une interaction directe entre les fibres d'A $\beta$  et les mitochondries, les fibres étant extracellulaires. Cependant, chez des patients atteints de la MA, l'APP comme l'A $\beta$  sont retrouvés dans la mitochondrie. Le site de liaison de l'A $\beta$  a été identifié comme étant l'alcool dehydrogenase, dans la matrice de l'organelle (Baloyannis, 2011). De plus, le blocage de la production d'énergie mitochondriale a pour effet de déplacer le catabolisme de l'APP vers la production d'A $\beta$  (Mecocci et al., 1996).

Il est maintenant bien établi qu'il existe une interaction entre l'A $\beta$  et les mitochondries. Les protéines identifiées dans ce travail (co-purifiées avec les fibres d'A $\beta$ ) doivent être considérées, avec beaucoup de prudence, comme des protéines candidates pouvant lier des non-fibrillaires de l'A $\beta$ .

Les différentes protéines mitochondriales identifiées dans ce travail peuvent être classées en fonction des voies métaboliques dans lesquelles elles sont impliquées.

#### *Les protéines de la phosphorylation oxydative*

La phosphorylation oxydative ou chaîne respiratoire est une succession d'oxydo-réduction avec de nombreux échanges de protons, qui ont pour but la production d'ATP. Ces complexes sont au nombre de cinq.

Il est remarquable que les protéines que nous avons identifiées soient impliquées dans ces différents complexes :

La NADH ubiquinone réductase ou complexe I :

Les protéines **NDUV3**, **NDUAB**, **NDUS6** et **NDUA5** font partie du complexe NADH ubiquinone réductase ou complexe I. Ce complexe qui est le plus gros complexe de la chaîne respiratoire permet la réaction d'oxydation du NADH formé au cours du cycle de Krebs en NAD<sup>+</sup> ainsi que la réduction du FMN en FMNH<sub>2</sub>, qui dernier réduit l'ubiquinone. Le complexe I permet le transfert des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, il s'agit du point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire.

La succinate Q réductase ou complexe II :

Les protéines **DHSA** et **DHSB** font partie du complexe succinate Q réductase, également appelé complexe II. Ce complexe permet l'oxydation du succinate en fumarate, les hydrogènes récupérés permettent la réduction du coenzyme Q de la membrane interne mitochondriale en coenzyme QH<sub>2</sub>.

Le cytochrome c réductase cytochrome b c1 ou complexe III

Le complexe III dans lequel on retrouve les protéines **UCRI** et **QCR6** permettent l'oxydation du coenzyme QH<sub>2</sub> en coenzyme Q.

Le cytochrome c oxydase ou complexe IV

Les protéines **COX5B**, **COX2**, **CX6C2**, **CX6A1** font partie du complexe IV qui permettent l'oxydation du cytochrome c ferreux en cytochrome c ferrique en présence d'O<sub>2</sub> permettant sa réduction H<sub>2</sub>O.

L'ATP synthase ou complexe V

Enfin, nous avons identifié la protéine **ATP5J**, qui fait partie du dernier complexe de la phosphorylation oxydative, en permettant la phosphorylation des molécules d'ADP en ATP.

Plusieurs études ont montré des modifications de la phosphorylation oxydative dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

L'incubation de neuroblastomes humain avec de l'AB 1-42 augmente le relargage d'adenylate kinase, une enzyme mitochondriale relarguée après l'apparition de pores dans la membrane mitochondriale, mais n'induit pas de fragmentation de l'ADN mitochondrial, suggérant que les mécanismes de mitotoxicité et de cytotoxicité impliquent un découplage de la chaîne respiratoire (Tillement et al., 2011).

### **Les protéines du complexe d'importation des protéines mitochondriales**

Parmi les potentiels partenaires du peptide A $\beta$  nous avons identifié des protéines mitochondriales permettant l'import des protéines cytosoliques dans la mitochondrie. La présence de ces complexes est due au fait que seules quelques protéines mitochondriales sont codées par le génome de la mitochondrie, la grande majorité des protéines est importée depuis le cytosol par des complexes spécifiques.

Il a été décrit que le peptide A $\beta$  1-42, qui n'est pas produit par la mitochondrie, se retrouve à l'intérieur de celle-ci, et qu'il affecte les fonctions mitochondriales. Des travaux menés sur des rats ont montré que le mécanisme d'import de l'A $\beta$  1-42 et 1-40 sous forme non fibrillaire dans les mitochondries faisait intervenir le complexe TOM (Hanson Petersen et al., 2008). Nous avons précisément retrouvé certaines protéines de ce complexe, ce qui suggère que les formes fibrillaires et non fibrillaires de l'A $\beta$  pourraient avoir des partenaires communs.

Les protéines **TOM70** et **TOM22** font partie du complexe protéique des translocases de la membrane externe mitochondriale. Ce complexe est composé de 7 protéines Tom 5, Tom 6, Tom 7, Tom 20, Tom 22, Tom 40 et Tom70. Le complexe TOM est constitué de trois groupes : des récepteurs (formé par les protéines Tom 20, Tom 22 et Tom 70), un tunnel d'entrée formé par Tom 40, le tout associé aux trois protéines Tom 5, Tom 6 et Tom 7 (Dietmeier et al. 1997) (Van Wilpe et al. 1999).

La protéine **TIM44** fait partie des translocases de la membrane interne mitochondriale. Il est composé de 4 complexes Tim 23, Tim 22, Pam (Presequence translocase-Associated Motor) et Oxa. La protéine TIM44 est une sous unité du complexe PAM et intervient dans le phénomène de translocation des protéines permettant leur entrée au sein de la matrice mitochondriale.

La protéine **SAM50** est une protéine de la membrane externe mitochondriale, elle fait partie du complexe SAM (Sorting and Assembling Machinery) comprenant SAM50, SAM35 et SAM37. Ces 3 protéines permettent l'assemblage des protéines de la membrane externe des mitochondries (Kozjak et al. 2003), après passage par le complexe TOM.

### **Les protéines de fusion**

Nous avons identifié deux protéines de fusion, la **mitofusine 2 (Mfn2)** et **l'Optic Atrophy 1 ou dynamin-like protein (Opa1)**. Les protéines de fusion permettent à la mitochondrie de fusionner après sa division (qui est indépendante de celle de la cellule), ce qui permet le renouvellement de la mitochondrie.

Il a été montré qu'il y a dans la MA une dynamique anormale du *turn-over* des mitochondries, qui se traduit par des changements dans les taux d'expression de OPA1, Mfn1, Mfn2 et DLP1, et une redistribution des mitochondries dans les axones des neurones. Ces observations peuvent être induites par l'administration à des cultures primaires de neurones *d'oligomeric amyloid-beta-derived diffusible ligands* (ADDLs) (Wang et al., 2009). En partant de l'hypothèse que les fibres d'AB et les ADDLs puissent lier des partenaires communs, nos résultats soulignent l'intérêt d'étudier une interaction directe entre les protéines de fusion, dont OPA1 et Mfn5, et l'A $\beta$  sous forme oligomérique.

### **Les protéines liant le calcium**

Nous avons identifié deux protéines mitochondriale liant le calcium au sein de la mitochondrie, la **Calcium-binding mitochondrial carrier** et de la **Calcium uptake protein 1**. Ces deux protéines sont nécessaires à l'homéostasie du calcium dans la mitochondrie. En effet, la calcium uptake protein 1 permet de contrôler l'entrée de calcium dans la mitochondrie. (Baughman et al. 2011). Ces protéines ont une importance fondamentale sachant que le calcium mitochondrial régule le métabolisme oxydatif, active trois déshydrogénases du cycle de Krebs, la pyruvate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase et la  $\alpha$ -cétooglutarate déshydrogénase. L'augmentation de Ca<sup>2+</sup> dans la matrice mitochondrial augmente la synthèse d'ATP, mais un dérèglement de l'homéostasie du calcium entraînant une forte concentration de calcium induit une mort cellulaire (Nous avons également identifié une protéine, **la Leucine zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1** (Letm1), qui joue un rôle clé dans l'homéostasie du calcium

mitochondrial puisqu'elle joue un rôle d'antiporteur  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  dans la membrane interne mitochondriale (Jiang et al., 2009).

The mammalian homolog of one *Drosophila* gene identified in the screen, *Letm1*, was found to specifically mediate coupled  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchange. RNAi knockdown, overexpression, and liposome reconstitution of the purified *Letm1* protein demonstrate that *Letm1* is a mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter.

Au niveau de la cellule, il a été démontré que l' $\text{A}\beta$  peut affecter l'homéostasie en ions  $\text{Ca}^{2+}$  de différentes manières, en particulier dans les dendrites des neurones, près des dépôts d'AB. Les oligomères d' $\text{A}\beta$  induisent une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les neurones, puis dans les mitochondries, ainsi qu'un transfert massif de  $\text{Ca}^{2+}$  depuis le RE vers les mitochondries. Ces résultats sont cependant à considérer avec prudence en raison de la difficulté à étudier la distribution subcellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$  et des altérations de morphologie des mitochondries dans différents modèles de la MA (voir Contretas et al., 2010 pour revue). Le mécanisme suivant expliquant cette accumulation de calcium a été proposé : le peptide  $\text{A}\beta$  formerait *in vitro* comme *in vivo* un complexe avec la cyclophiline D, provoquant l'ouverture des mPTP induisant une entrée de calcium dans la mitochondrie, et finalement les atteintes neuronales (Yua et al., 2009).

### **Autres protéines mitochondriales**

- ABAD

La **3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2** ou **ABAD** (Amyloid Binding Alcohol Dehydrogenase) a également été identifiée. Cette protéine fait partie de la famille des déshydrogénase/réductase à chaîne courte. Son activité enzymatique entraîne la réduction des cétones, des aldéhydes et l'oxydation des alcools et des hormones stéroïdes. Elle intervient dans la bêta oxydation des acides gras qui est l'autre voie de production d'énergie de la mitochondrie.

Il est établi que la liaison de l' $\text{A}\beta$  avec la protéine ABAD constitue le lien direct entre le peptide amyloïde et la toxicité mitochondriale.  $\text{A}\beta$  interagit avec ABAD, dans des modèles de souris transgénique et dans le cerveau de patients atteints de la MA. Au niveau moléculaire, la liaison de l' $\text{A}\beta$  avec ABAD induirait une déformation substantielle de son site actif, qui empêcherait la liaison de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) (Lustbader et al., 2005). Chez des souris transgéniques sur-exprimant l'APP, l'inhibition de l'interaction  $\text{A}\beta$ -ABAD avec des peptides protège des dysfonctionnements mitochondriaux en augmentant la consommation d'oxygène et l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire, réduit le stress oxydatif mitochondrial et augmente la mémoire spatiale (Yao et al., 2011).

L'interaction biochimique entre les fibres d' $\text{A}\beta$  et ABAD confirme que les formes fibrillaires et non fibrillaires de l'AB ont avoir des partenaires communs.

#### Adenylate kinase 4

Les adenylates kinases font partie de la famille de nucleoside monophosphate kinase (NMPKs), les adenylates kinases sont au nombre de 5 (AK1, AK2, AK3, AK4, AK5). Elles sont retrouvées dans les organes nécessitant un taux élevé d'énergie tel que le cerveau, le cœur ainsi que les tissus musculaires. Le rôle de cette enzyme est primordial au sein de la cellule, elle permet de maintenir l'homéostasie du métabolisme nucléotidique à travers la réaction réversible  $2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$  (Noda et al., 1973 ; Schultz et al., 1989). Nous avons identifié l'**adenylate kinase 4** parmi les protéines co-précipitées avec les fibrilles d'AB. A notre connaissance, l'interaction entre l'AB et cette protéine sur-exprimée dans l'hippocampe de patients atteints de la MA (Sultana et al., 2007) n'a pas été décrite.

- Monoamine oxydases A et B

Ces enzymes ont pour fonction la déamination oxydative des amines. Leur rôle au sein de la cellule est très important car elles interviennent dans de nombreux processus tels que la différenciation cellulaire et l'apoptose (Toninello et al. 2004) (Nagatsu et al. 2006) (Fitzgerald et al. 2007). Elles sont situées au niveau de la membrane externe des mitochondries et sont largement présente dans l'ensemble des cellules. Ces deux enzymes ont pour substrats communs la dopamine, l'adrénaline, la noradrénaline et la tyramine. Ce qui différencie les deux monoamines oxydases sont les substrats métabolisés : la monoamine oxydase A métabolise la sérotonine alors que la monoamine oxydase B métabolise le  $\beta$  phényléthylamine, le benzylamine et le méthyl-histamine.

La monoamine oxydase A est impliquée dans la neurodégénération par la formation de peroxyde d'hydrogène comme métabolite du métabolisme des neurotransmetteurs aminergiques, dont la sérotonine et la dopamine. S'il n'est pas détoxifié par le système antioxydant comme la glutathione peroxydase, le  $\text{H}_2\text{O}_2$  peut être converti en radicaux hydroxyls qui peuvent initier la peroxydation des lipides et la mort cellulaire. Ce mécanisme est exacerbé lorsque les systèmes antioxydants fonctionnent moins bien, comme dans la MA (Crack et al., 2006). Il a également été montré que l'augmentation de la concentration en calcium augmente l'activité de la monoamine oxydase A et la génération des radicaux libres (Cao et al., 2007).

#### *Protéine du réticulum endoplasmique*

Une seule protéine du réticulum endoplasmique a été identifiée, il s'agit de la **Calcium transporting ATPase ou SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase)**. Cette protéine est une pompe intracellulaire du calcium comprenant trois parties un domaine cytoplasmique représentant 70% de la

protéine qui porte l'activité catalytique, un domaine transmembranaire qui constitue le canal permettant le passage des ions calcium et un domaine présent au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique. Le domaine transmembranaire est impliqué dans la fixation du calcium entraînant la translocation du calcium du cytoplasme vers le réticulum. Afin de réaliser cette entrée au sein du réticulum endoplasmique de l'ATP est nécessaire, cet ATP permet à la SERCA de transporter un deux ions calcium.

Il a été montré que l'AB potentialise le relargage intracellulaire du  $Ca^{2+}$  contenu dans le RE induit par un challenge à la nicotine ou à la caféine, et que cette potentialisation disparaît en présence d'un inhibiteur de la pompe SERCA. Ces résultats suggèrent que la dérégulation de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire induite par l'AB 1-42 implique les réserves intracellulaires de Ca (RE, mitochondries) qui sont contrôlées par les pompes SERCA (Chin et al., 2006).

Ces données et nos résultats soulignent l'intérêt de l'étude d'une interaction directe entre les formes non fibrillaires de l'AB et la protéine SERCA.

### **Protéines du cytoplasme**

- La protéine Tau

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence de dépôts amyloïdes et d'amas neurofibrillaires intraneuronaux constitués de la protéine associée aux microtubules Tau, suivis d'une perte des synapses et des neurones (Selkoe, 2002). Bien que l'hypothèse de la cascade amyloïde pointe le rôle central du peptide AB, il a été établi que la protéine Tau, sous sa forme hyperphosphorylée, a rôle indispensable dans la pathogénie et la progression de la MA (Vossell et al., 2010). Cependant, s'il est établi que la forme fibrillaire de l'A $\beta$  1-42 a un effet toxique sur la structure du cytosquelette dans le cerveau de patients atteints de la MA, il ne semble pas que ces fibrilles participent directement à l'hyperphosphorylation de Tau (Lain et al., 2005). De plus, les études histologiques ont montré une synergie entre les plaques amyloïdes et les amas neurofibrillaires (Delacourte et al., 2002). L'AB et la protéine Tau co-localisent dans les synaptosomes de modèles de la MA (Fein et al., 2008).

Différents mécanismes sont avancés pour expliquer la neurotoxicité induite par Tau.

Tandis que Tau assemble et stabilise les microtubules, la forme hyperphosphorylée de Tau séquestre la forme normale, ainsi que MAP1 et MAP2, et perturbe l'organisation des microtubules (Li et al., 2007). L'hyperphosphorylation anormale de Tau, qui peut être générée par la catalyse de différentes combinaisons de protéines kinase, favorise son mauvais repliement, diminue son turn-over et son assemblage en filaments. Cette désorganisation des microtubules participe probablement à un mauvais flux axonal et conduit à une dégénération lente du transport rétrograde et une perte de connectivité des neurones affectés (Iqbal et al., 2009).

Un déficit mitochondrial aggravé a été observé chez des souris transgéniques APP/PS/Tau ayant à la fois des plaques et des amas neurofibrillaires, comparativement à des souris sur-exprimant Tau ou l'APP seuls (Rhein et al., 2009). Ces résultats suggèrent que Tau et l'AB coopèrent ou agissent en synergie pour provoquer un effet mitotoxique (Amadoro et al., 2011).

- La protéine MAP 2

Nous avons également identifié la protéine MAP2. Nous avons vu que cette protéine pouvait être séquestrée par Tau, qui elle-même aurait la capacité de lier l'AB, la question de savoir si la liaison entre l'AB et MAP2 est directe ou indirecte (les deux protéines liant Tau) mérite donc d'être étudiée.

Il a été montré que les protéines neuronales MAP2 et Tau interagissent avec les microtubules, l'actine et les filaments intermédiaires via une région homologue nommée MTBR (C-terminal microtubule binding region) (Di Noto et al., 1999). L'hypothèse selon laquelle l'AB pourrait lier cette séquence homologue mérite d'être étudiée.

- La calcineurine

La **calcineurine (CaN) ou protéine phosphatase IIB ou sérine/thréonine phosphatase** est une protéine de la famille des protéines calmoduline dépendante. Elle est composée d'une sous unité catalytique (CnA) sur laquelle se fixe la calmoduline d'une sous-unité régulatrice (CnB) sur laquelle se fixe le calcium.

Une des fonctions de CaN est de déphosphoryler Tau. Il a été proposé que le stress oxydatif induit par l'AB augmente la production d'espèces oxygénées réactives, ce qui résulterait en une sur-expression d'un inhibiteur de CaN nommé RCAN1. Cette protéine inhiberait donc CaN et induirait l'expression de GSK3 $\beta$ , ces deux mécanismes conduisant à l'hyperphosphorylation de Tau (Llorret et al., 2011).

Par ailleurs, il a été montré que les formes solubles oligomériques d'AB sont capables d'activer CaN, qui va à son tour activer le facteur de transcription nucléaire des cellules T activées (NFAT). Cette activation aura pour conséquence d'induire une dystrophie des neurones et une baisse du nombre de dendrites (Wu et al., 2010).

### **Protéines de la membrane plasmique**

- Rabphilin-3A

Il s'agit d'une protéine liant le calcium et les phospholipides, que l'on retrouve dans les membranes pré-synaptiques (Mizoguchi et al., 1994 ; Chung et al., 1995) Elle stimule l'exocytose, et possède également un rôle dans l'endocytose, probablement en interagissant avec une petite protéine G nommée rabaptine-5 (Ohya et al., 1998).

Il a été suggéré que la Rabphilin-3A joue un rôle dans la phase tardive de la LTP (*long term potentiation*). En effet, la rabphilin-3A est phosphorylée après stimulation de la LTP, et l'inhibition de cette phosphorylation empêche la mise en place de la LTP (Capron et al., 2007).

Il est bien établi que l'AB synthétisé chimiquement, sous sa forme soluble contenant des oligomères, perturbe la plasticité synaptique provoquant une inhibition de la LTP et une augmentation de la LTD (long term depression) de la transmission glutamatergique (voir Odrenjck et al., 2010, pour revue).

### La phospholipase C

Cette enzyme transmembranaire clive les liaisons ester des phospholipides. Après activation de celle-ci par la protéine G, la phospholipase transforme le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) présent au niveau de la membrane plasmique en deux molécules, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5 triphosphate ou récepteur IP3. Cette libération de ces deux molécules entraîne l'activation des canaux calciques du RE permettant une augmentation des taux de calcium dans la cellule.

Il a été démontré qu'un mécanisme de la toxicité induite par les formes oligomériques d'AB implique la phospholipase c, qui, selon la voie présentée, va provoquer le relargage dans le cytosol des réserves de Ca<sup>2+</sup> contenue dans le RE, provoquant l'apoptose des neurones (Resende et al., 2008).

Il pourrait donc être utile de tester si une liaison de l'AB avec la phospholipase c pourrait être à l'origine de cette libération de Ca<sup>2+</sup>.

### **Signification des résultats obtenus**

Nos travaux ont été menés dans l'objectif d'identifier des partenaires possibles des fibrilles d'A $\beta$ . Pour cela, un système utilisant un test de co-précipitation entre ces fibrilles et des protéines extraites de synaptosomes de rats a été utilisé (Verdier et al., 2005). Ce test permet de mettre en évidence une interaction biochimique.

Nous constatons tout d'abord que beaucoup de protéines identifiées dans le travail de Verdier et al., 2005, n'ont pas été identifiées dans ce travail comme étant liées spécifiquement à l'A $\beta$ , alors que les méthodes utilisées sont *a priori* plus sensibles que celles du travail initial. Pour la plupart de ces protéines, ceci est dû au fait qu'elles ont été identifiées à la fois dans l'échantillon obtenu avec l'A $\beta$  et dans l'échantillon obtenu avec la cristalline. Une quantification différentielle permettrait d'augmenter le nombre de candidats. Ainsi, une protéine ayant une affinité par exemple 100 fois supérieure pour l'A $\beta$  que pour la cristalline n'est considérée dans aucune de ces deux études, alors qu'elle pourrait avoir une signification.

Il est frappant de constater que beaucoup de protéines co-précipitées spécifiquement avec les fibrilles d'A $\beta$  proviennent de compartiments intracellulaires (mitochondrie, cytosol, RE...). In vivo, cette

interaction biochimique n'a que peu de chance de se produire, les fibrilles étant localisées à l'extérieur de la cellule. La raison de la présence de ces protéines dans notre préparation est liée à la qualité de la préparation des synaptosomes, qui ne contiennent pas que des protéines membranaires (le protocole utilisé par Verdier et al., 2005, que nous avons utilisé pour ces travaux, avait également conduit à l'identification de protéines non membranaires).

Il reste cependant possible que les protéines identifiées comme interagissant avec la forme fibrillaire de l'AB puissent également interagir avec les formes non-fibrillaires du peptide. Plusieurs des protéines que nous avons identifiées ont été décrites comme liant les formes non-fibrillaires de l'AB (ABAD par exemple), ce qui conforte cette hypothèse et contribue à justifier l'étude de l'interaction entre les protéines identifiées dans ce travail et les formes non fibrillaires de l'AB.

Dans le cas où une telle interaction serait mise en évidence, les protéines identifiées constitueraient des candidats intéressants, d'autant que la plupart d'entre elles entrent assez facilement dans le paradigme d'une perturbation de l'homéostasie du calcium conduisant à l'apoptose. C'est le cas de la phospholipase C, la protéine SERCA, des protéines mitochondriales liant le calcium...

Les relations entre l'A $\beta$  et la neurotoxicité induite par l'hyperphosphorylation de Tau méritent également d'être approfondies. Non seulement nous avons mis en évidence une interaction entre l'A $\beta$  et Tau ainsi que MAP, mais nous avons également montré une interaction entre l'AB et la calcineurine, dont la fonction est de déphosphoryler Tau. Il est extrêmement tentant de tester d'une part si cette interaction pourrait se produire in vivo (avec des formes non fibrillaires de l'A $\beta$ ), et d'autre part si cette interaction pourrait inhiber l'action de la calcineurine, conduisant progressivement à une hyperphosphorylation de Tau.

# VI Conclusions & Perspectives

---

## VI.1 D'un point de vue technologique

### VI.1.1 Perspectives en MALDI MS/MS

Une application majeure de l'ionisation MALDI est l'analyse de mélanges complexes par LC-MS et MS/MS. Les instruments de type TOF-TOF, Q-TOF ou LIT-Orbitrap sont disponibles commercialement et sont interfacés avec des séparations capillaires en chromatographie en phase liquide et en électrophorèse capillaire, mais la plupart des applications utilisent l'ionisation ESI pour réaliser un couplage direct entre l'éluât chromatographique et la source du spectromètre de masse. En effet pour réaliser une interface LC-MALDI, les gouttelettes contenant l'éluât sont mélangées avec la matrice MALDI, puis déposées séquentiellement sur la surface d'une cible MALDI, et laissées sécher. La surface portant ces fractions collectées séchées est ensuite insérée dans la chambre d'ionisation sous vide pour être irradiée par le laser. Les protocoles d'analyse en nanoLC MALDI-MS/MS mis en place au laboratoire sont désormais fonctionnels et permettent d'atteindre une sensibilité comparable à celle disponible sur les couplages nanoLC ESI-MS/MS comme celui étudié dans le cadre de cette analyse avec un appareil de type LTQ-FT MS. Comme indiqué dans l'introduction quelques systèmes ont été décrits pour un couplage direct, mais l'avantage d'un couplage dit « off-line » est de permettre de réaliser la collecte des fractions de l'échantillon à une vitesse adaptée à la séparation chromatographique, puis de réaliser l'analyse par spectrométrie de masse à une vitesse indépendante des temps de rétention, selon les échantillons, de manière à optimiser l'information obtenue sur ces échantillons. Ainsi dissocier temps d'élution chromatographique et temps d'analyse en spectrométrie de masse s'avère extrêmement intéressant.

Par exemple, une séparation LC peut être intégralement analysée en mode MS simple, afin de mesurer les masses des peptides et leurs intensités relatives. Ces mesures sont ensuite exploitées pour localiser l'apex des pics chromatographiques pour l'analyse en mode dit « data-dependent » pour programmer les analyses en mode MS/MS de façon globale pour tous les spots obtenus sur la plaque. De plus comme il est rare que l'intégralité de l'échantillon soit utilisée au cours de ces analyses, il est possible de revenir sur un spot pour réaliser des mesures complémentaires.

En revanche actuellement la rapidité et la sensibilité de ce type de couplage en LC-MALDI n'est pas significativement meilleures que les analyses conventionnelles en LC-ESI, et la résolution et la précision de mesures des appareils de type FT-ICR et Orbitrap restent significativement supérieures.

Les travaux récents publiés par le groupe de Vestal montrent que les analyseurs TOF sont en pleine évolution (Vestal ML Jour Mass Spectrom 2009 44 303-317). De plus un effort important est réalisé sur les interfaces. Ce groupe annonce la possibilité de travailler avec des configurations utilisant des lasers à

5kHz pour augmenter le débit d'analyse, et un certain nombre de développements sont en cours avec les objectifs annoncés suivant : résolution >100000 pour les peptides, erreur de masse <1 ppm, limite de détection 10 amol, gamme dynamique  $10^5$ - $10^6$ , résolution isotopique pour les protéines jusqu'à 30000, résolution de sélecteur d'ion TIS >4000.

Le principe mis en œuvre pour le TIS est le suivant. La résolution chute lorsque l'énergie laser augmente. Ceci est dû notamment à une plus grande dispersion de la position et de la vitesse initiales des ions avant accélération. Cet effet ne peut donc être corrigé en augmentant la distance de vol ou la fréquence du TIS. Or en mode MS/MS l'énergie requise pour la fragmentation se place bien au-dessus de la valeur idéale qui est la valeur seuil minimale pour détecter les ions en mode MS. Il faut donc refocaliser les ions à l'entrée du TIS. C'est ce qui est décrit dans les travaux du groupe de Vestal (TOF-TOF with high resolution precursor selection and multiplexed MS-MS, US patent 7838824, VIRGIN INSTRUMENTS CORPORATION Inventor VESTAL MARVIN L, 23 Nov 2010), qui montrent qu'une résolution supérieure à 5000 peut être obtenue sur la gamme de masse 500-6000 Da.

Un autre aspect en plein essor afin d'augmenter le débit d'analyse et de limiter la contrainte du temps d'analyse des approches multidimensionnelles est la possibilité de réaliser des analyses en mode multiplex. Ainsi plusieurs précurseurs peuvent être sélectionnés et fragmentés pendant le même cycle d'analyse. Il faut alors attribuer les fragments au bon précurseur. En TOF/TOF une méthode pour réaliser l'analyse MS/MS en multiplexe est de sélectionner un nombre donné de précurseurs d'intérêt à chaque impulsion laser grâce au TIS, ce set d'ions peut comporter des précurseurs et les ions fragments associés. Après accélération de cet ensemble d'ions avec une source pulsée, il passera dans un second TIS qui permettra de détecter cet ensemble d'ions dans un second détecteur d'ions. Une partie du spectre de fragmentation est sélectionnée dans ce second TIS et est transmise vers ce second détecteur alors que le reste des ions est défléchi vers le premier détecteur. De cette manière il est possible de séparer physiquement a posteriori les précurseurs et leurs fragments. Ceci nécessite que les masses de deux précurseurs diffèrent d'au moins de 2% (TOF-TOF with high resolution precursor selection and multiplexed MS-MS, US patent 7838824, VIRGIN INSTRUMENTS CORPORATION Inventor : VESTAL MARVIN L, 23 Nov 2010). De plus il est possible de regrouper les fragments de deux précurseurs de masses distinctes de 1.6% ou moins en considérant le défaut de masse apparent des fragments et l'intensité relative des fragments en référence à leur précurseur.

D'autres méthodes de traitements logiciels sont envisageables, comme la recherche itérative des fragments pour chaque précurseur avec plusieurs passages en éliminant régulièrement les fragments identifiés. Il est aussi possible de modéliser les profils de fragmentation calculés d'après une première recherche afin de d'identifier spécifiquement ces espèces pour discriminer les résultats. Ces approches ne sont pas spécifiques de la configuration en mode MALDI.

Nos études avec le MALDI-LTQ/Orbitrap montrent que malgré la difficulté à fragmenter efficacement les précurseurs monochargés dans une trappe linéaire, il est possible en compensant la très faible fréquence du laser installé sur la source MALDI, d'avoir des résultats très analogues à ceux obtenus avec le TOF/TOF. Comme montré par Karas (Karas et al. 2011). La combinaison de la résolution et de la précision en analyse Orbitrap et de l'efficacité de fragmentation en mode TOF/TOF est une alternative puissante aux développements futurs envisagés pour les analyseurs TOF. Cette association requiert pour être réaliste une compatibilité des cibles MALDI et des formats de données car les études réalisées pour le moment consistent soit en un prélèvement des spots puis transfert manuel sur l'autre instrument, soit en un split post-colonne ce qui signifie une perte de la limite de détection globale d'un facteur 2. Par ailleurs les formats propriétaires des constructeurs entravent énormément la possibilité de combiner simplement ces analyseurs. C'est la suite envisagée actuellement au laboratoire.

La mise au point de routine informatique pour retraiter les données et interfacer les instruments, ainsi que les premiers essais avec l'atelier afin de modifier les supports pour obtenir une solution consensus sont en cours. Lorsque cette configuration sera opérationnelle, l'application du setup expérimental à l'étude des partenaires protéiques de l'A $\beta$  sera finalement finalisée en combinant séparation chromatographique, analyse FT-MS et fragmentation TOF/TOF-MS/MS. Nous espérons de cette manière compléter notre couverture de l'échantillon et augmenter la robustesse de nos analyses différentielles.

Concernant l'analyse parallèle d'échantillons utilisant les deux modes d'ionisation ESI et MALDI, les différents résultats obtenus nous montrent une complémentarité des deux approches. Cette complémentarité est caractérisée par une différence protéique et peptidique. L'étude des paramètres physico-chimiques des peptides spécifiques de chaque mode d'ionisation nous montre que certains paramètres peuvent influencer sur l'ionisation préférentielle des peptides.

Parmi ces facteurs physico-chimiques on trouve la masse, le pI, le nombre de résidus basiques, la charge nette positive et l'accessibilité aux solvants. Afin d'exploiter ces premiers résultats une étude statistiques des 550 paramètres calculés sera nécessaire pour déterminer d'autres facteurs discriminants. L'analyse des échantillons de synaptosomes en LC-MALDI fournira des informations complémentaires aux résultats obtenus en LC-ESI-LIT-FTICR.

## VI.2 L'interactome de l'A $\beta$ fibrillaire

### Perspectives

Les résultats présentés ici montrent que l'A $\beta$  est un peptide pouvant agir avec une grande variété de partenaires.

Parmi les candidats, nous avons identifié 11 protéines identifiées de façon reproductible exclusivement en présence d'amyloïde. Pour ces protéines, et plus particulièrement celles qui pourraient avoir un lien assez direct avec la physiopathologie de la MA, comme la protéine Tau, la phospholipase C, la protéine SERCA et la calcineurine, il pourrait être utile de poursuivre cette étude.

Pour cela, il faudrait dans un premier temps valider et caractériser l'interaction biochimique. La première chose à faire serait de vérifier si cette interaction est possible entre ces protéines candidates et des formes non fibrillaires de l'A $\beta$ , qui pourraient être synthétisées chimiquement et purifiées par immunoprécipitation à la fin de ce test. Une méthode de validation orthogonale de l'identification pourra aussi être utilisée, comme un Western blot. Il sera ensuite nécessaire de vérifier si l'interaction est directe ou indirecte, par exemple avec des études de microscopie électronique ou de microscopie confocale.

Si ces interactions sont confirmées, il sera alors nécessaire d'évaluer les conséquences in vivo de la liaison des différentes formes d'A $\beta$  sur l'activité des protéines identifiées.

Pour poursuivre ce travail, il pourrait être intéressant d'identifier les partenaires des différentes formes d'A $\beta$ , qui existent sous des séquences (1-40, 1-42, x-42...) et des structures différentes (monomères, dimères, oligomères).

Une autre façon d'exploiter ce travail serait d'aligner la séquence des protéines identifiées pour trouver des séquences consensus, comme étant des séquences de liaison de l'A $\beta$ . Cette identification permettrait de choisir de nouveaux ligands de l'A $\beta$ , qui pourraient lier le peptide et l'empêcherait ainsi de se lier à d'autres protéines et d'induire des effets négatifs pour la cellule.

D'un point de vue méthodologique, la spectrométrie de masse s'est avérée être un outil très puissant dans la caractérisation des protéines et des peptides. L'utilisation de spectromètres de masse de dernière génération tels que le FTICR rend l'identification des protéines à la fois rapide et fiable grâce à la haute résolution et la haute précision que présente cet appareil. Le développement de la LC-MALDI, qui est sans aucun doute une technique d'avenir grâce à ses nombreux avantages (complémentarité avec l'ESI, possibilité d'analyser plusieurs fois le même échantillon), permet d'élargir la couverture du protéome.

De plus, l'analyse protéomique et la spectrométrie de masse permettent de quantifier les protéines dans un état et dans des conditions données. Le développement des techniques de quantification par marquage isotopique et l'évolution des spectromètres de masse dédiés à la quantification des peptides et des protéines permettra de réaliser une quantification de plus en plus précise, ce qui, sur un projet tel que celui-ci, permettra d'affiner et de compléter les résultats. Notre démarche va dans ce sens, des premiers essais de quantification sans marquage sont en cours d'essai à la suite de l'arrivée au laboratoire d'un spectromètre de masse dédiée à la quantification de type MRM.



## VII Conclusion générale

---

La purification et l'identification de partenaires du peptide A $\beta$ , au cours de ce travail a nécessité de nombreux développements méthodologiques pour obtenir les résultats les plus fiables. Concernant la préparation des échantillons, l'utilisation de nombreux rats a été nécessaire pour mettre au point la stratégie de co-précipitation permettant de réduire la présence de contaminants pouvant biaiser l'analyse tout en favorisant l'identification des différents partenaires. Le deuxième point crucial concerne la séparation chromatographique des peptides après digestion trypsique. En effet la gamme dynamique d'une analyse peut considérablement diminuer si un nombre élevé de peptide se retrouve coélué de la colonne analytique. Pour éviter une telle diminution de la gamme dynamique conduisant à un faible nombre d'identification de peptides et de protéines nous avons mis en place une approche simple et fiable visant à augmenter la durée du gradient d'éluion. Dans notre étude, le passage d'une séparation en 1 heure à 4 heures a conduit à un nombre de protéines identifiées quatre fois supérieure à l'utilisation d'un gradient classique. Ces résultats satisfaisants nous poussent à développer une analyse similaire avec des colonnes analytiques plus longues. En effet une augmentation de la durée de gradient sur une colonne de taille classique (15 cm), bien qu'efficace, entraîne malgré tout des pertes de résolutions.

La stratégie que nous avons développée nous a permis d'identifier 172 protéines spécifiquement liées au peptide A $\beta$ . Parmi ces 172 protéines, 11 ont été retrouvées dans les six expériences : *Ras-related protein Ral-A*, *Cytochrome b-c1*, *amine oxidase B*, *3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type 2*, *mitochondrial import TOM70*, *Dynamin-like 120 kDA protein*, *Succinate dehydrogenase*, *LETM1*, *EF-hand domain containing protein*, *Up-regulated during skeletal muscle growth protein* et *Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex*. Ces différentes protéines jouent des rôles importants dans la cellule, étant impliquées dans l'homéostasie du calcium (calcium uptake protein 1 et calcium binding mitochondrial carrier protein), ou l'organisation des microtubules (Microtubule associated protein Tau et Microtubule associated protein 2) qui sont perturbées dans la MA.

Pour ces protéines, et plus particulièrement celles qui pourraient avoir un lien assez direct avec la physiopathologie de la MA, comme la protéine Tau, la phospholipase C, la protéine SERPA et la calcineurine, il pourrait être utile de poursuivre cette étude, tout d'abord en validant cette interaction entre ces protéines candidate et les formes non-fibrillaires de l' A $\beta$ , puis en évaluant les conséquences *in vivo* de la liaison des différentes formes d' A $\beta$  sur l'activité des protéines identifiées.

Dans le cadre de nos travaux, les identifications protéiques ont été réalisées avec l'utilisation d'une seule méthode, la LC-ESI-MS/MS. Cette méthode n'ayant pas permis de retrouver certains partenaires de l'A $\beta$ , nous avons développé de nouvelles méthodes analytiques. La chromatographie bidimensionnelle étant déjà mise en place au laboratoire mais nécessitant un montage assez délicat. Nous avons développé la LC-MALDI mettant en jeu un couplage de la chromatographie en phase liquide mono ou bidimensionnelle (LC) et la désorption laser assistée par matrice (MALDI). Cette technique semble au premier abord complémentaire à l'électrospray.

Les premiers développements du système nous ont permis d'analyser sur une même plaque un total de 12 échantillons avec 2880 spots et une fréquence d'échantillonnage de 10 secondes. Cette fréquence d'échantillonnage représente le compromis idéal entre la taille des spots et la largeur à mi-hauteur des pics chromatographiques (30 secondes). Une bonne sensibilité du système, comparable au système LC-ESI est également obtenue. Enfin, l'avantage majeur est la possibilité d'analyser plusieurs fois le même échantillon déposé ce qui permet de réaliser une analyse directe avec une liste d'exclusion de masse ou de revenir sur un spectre MS ou MS/MS afin d'affiner l'analyse et compléter les informations de séquences.

Durant ce travail, nous avons utilisé un spectromètre hybride MALDI-Orbitrap, dont l'utilisation et les performances sont prometteuses, sa précision ainsi que sa haute résolution en font un outil de choix dans le cadre d'analyses de cartographies peptidiques (PMF) de haute précision et la recherche de modifications post-traductionnelles. Cependant certaines optimisations logicielles restent à réaliser afin d'obtenir des résultats supérieurs.

Suite à l'optimisation du système LC-MALDI une comparaison avec la LC-ESI a été réalisée. Dans le cadre de plusieurs collaborations au laboratoire, nous avons comparé les deux approches afin d'observer les capacités analytiques de chacune d'elle. Comme décrit dans la littérature nous avons observé une complémentarité protéique et peptidique pour chacun des échantillons analysés ce qui prouve que la complémentarité ESI/MALDI ne se limite pas à un type d'échantillon. Une analyse similaire réalisée à partir d'un échantillon standard avec quatre spectromètres de masse équipé d'une source MALDI ou ESI (ESI-LIT-FTICR, ESI-Orbitrap, MALDI-Orbitrap et MALDI-TOF/TOF) a démontré que l'analyseur n'est pas le facteur discriminant prioritaire.

Pour comprendre quels sont les facteurs entraînant la discrimination des peptides, nous avons étudié divers critères physico-chimiques à partir du calcul de 550 paramètres. Les premiers résultats montrent que des facteurs tels que la masse, le point isoélectrique, la terminaison C-terminale, l'accessibilité aux solvants et le nombre d'éléments basiques sont des facteurs entraînant une ionisation préférentielle pour l'ESI ou le MALDI.

En raison de sa capacité à identifier de nouveaux peptides, la LC-MALDI nous servira pour compléter les notre étude sur les partenaires de l'A $\beta$ . De plus, le couplage est désormais accessible à l'ensemble des

membres du laboratoire et proposé aux différentes collaborations pour des études qualitatives ou quantitatives avec l'utilisation de marqueurs isotopiques (iTraq, TMT).



## VIII Références bibliographiques

---

- Alzheimer A. (1906). "Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde." Neurologisches Centralblatt 23: 1129-36.
- Alzheimer A. (1911). Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie 4 (356).
- Amadoro G, Corsetti V, Atlante A, Florenzano F, Capsoni S, Bussani R, Mercanti D, Calissano P. Interaction between NH<sub>2</sub>-tau fragment and A $\beta$  in Alzheimer's disease mitochondria contributes to the synaptic deterioration. *Neurobiol Aging*. 2011 Sep 27.
- Anderson, D., E. Campbell, et al. (2006 ). "A soluble 3D LC/MS/MS proteome of the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme* " *J Proteome Res* 5(11): 3096-104.
- Anderson, N. L. and N. G. Anderson (1998). "Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words." *Electrophoresis* 19(11): 1853.
- Anstey K.J., L. D. M., and Low L.F. (2008). "Cholesterol as a risk factor for dementia and cognitive decline: a systematic review of prospective studies with meta-analysis. ." *Am J Geriatr Psychiatry* 16: 343-354.
- Apweiler R, B. A., Wu CH. (2004). "Protein sequence databases." *Curr Opin Chem Biol*. 8(1): 76-80.
- Arendash GW, Sanchez-Ramos J, Mori T, Mamcarz M, Lin X, Runfeldt M, Wang L, Zhang G, Sava V, Tan J, Cao C. Electromagnetic field treatment protects against and reverses cognitive impairment in Alzheimer's disease mice. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(1):191-210.
- Baeumlisberger D, Rohmer M, Arrey TN, Mueller BF, Beckhaus T, Bahr U, Barka G, Karas M. Simple dual-spotting procedure enhances nLC-MALDI MS/MS analysis of digests with less specific enzymes. *J Proteome Res*. 2011 Jun 3;10(6):2889-94. Epub 2011 Apr 22.
- Bai F, Witzmann FA *Subcell Biochem*. 2007;43:77-98 Synaptosome proteomics.
- Bai F, Witzmann FA. Synaptosome proteomics. *Subcell Biochem*. 2007;43:77-98.
- Bergmans BA, De Strooper B. 2010. gammasecretases: from cell biology to therapeutic strategies. *Lancet Neurol* 9:pp. 215-226.
- Bertram, L., M.B. McQueen, K. Mullin, D. Blacker, and R.E. Tanzi. 2007. Systematic metaanalyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet*. 39:17-23.
- Biemann, K. (1990). "Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions)." *Methods Enzymol*. 193: 886-7.
- Blanche H, Cabanne L, Sahbatou M, Thomas G. A study of French centenarians: are ACE and APOE associated with longevity? *C R Acad Sci III*. 324:129-35, 2001.
- Bodnar. WM., B. R., Krise. JM., Moseley. MA., (2003 ). "Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage." *J Am Soc Mass Spectrom*. 14(9): 971-9.
- Bonfiglio F. (1908). *Riv. Sper. Freniatria* 34(196).
- Boyle J.P., Honeycutt A.A., Narayan K.M., Hoerger T.J., Geiss L.S., Chen H. et al. Projection of diabetes burden through 2050: impact of changing demography and disease prevalence in the U.S. *Diabetes Care*, 2001; 24:1936-1940.
- Brancia FL, Oliver SG, Gaskell SJ. *Rapid Commun, Mass Spectrom*. 2000; 14: 2070
- Breteler, M.M. 2000. Vascular involvement in cognitive decline and dementia. Epidemiologic evidence from the Rotterdam Study and the Rotterdam Scan Study. *Ann N Y Acad Sci*. 903:457-65.
- Brown RS and Lennon JJ (1995 ). "Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer " *Anal Chem*. 67(13): 1998-2003.

- Cai Y, Zhang XM, Macklin LN, Cai H, Luo XG, Oddo S, Laferla FM, Struble RG, Rose GM, Patrylo PR, Yan XX BACE1 Elevation is Involved in Amyloid Plaque Development in the Triple Transgenic Model of Alzheimer's Disease: Differential A $\beta$  Antibody Labeling of Early-Onset Axon Terminal Pathology *Neurotox Res.* 2011 Jul 2
- Champion D., Brice A., Hannequin D., Tardieu S., Dubois B., Calenda A., Brun E., Penet C., Tayot J., Martinez M. A large pedigree with early-onset Alzheimer's disease: clinical, neuropathologic, and genetic characterization. *Neurology*, 1995,45, 80-85.
- Cao X, Wei Z, Gabriel GG, Li X, Mousseau DD. *BMC Neurosci.* 2007 Sep 16;8:73. Calcium-sensitive regulation of monoamine oxidase-A contributes to the production of peroxyradicals in hippocampal cultures: implications for Alzheimer disease-related pathology.
- Capron B, Wattiez R, Sindic C, Godaux E, Ris L. *Neurosci Lett.* 2007 Mar 13;414(3):257-62. Tyrosine phosphorylation of rabphilin during long-lasting long-term potentiation
- Cataldo JK, Prochaska JJ, Glantz SA. Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's Disease: an analysis controlling for tobacco industry affiliation *J Alzheimers Dis.* 2010;19(2):465-80.
- Chen, Y., and C. Dong. 2009. A $\beta$ 40 promotes neuronal cell fate in neural progenitor cells. *Cell Death Differ.* 16:386-94.
- Chin JH, Tse FW, Harris K, Jhamandas JH. Beta-amyloid enhances intracellular calcium rises mediated by repeated activation of intracellular calcium stores and nicotinic receptors in acutely dissociated rat basal forebrain neurons. *Brain Cell Biol.* 2006 Jun;35(2-3):173-86.
- Chromy BA, Nowak RJ, Lambert MP, Viola KL, Chang L, Velasco PT, Jones BW, Fernandez SJ, Lacor PN, Horowitz P, Finch CE, Krafft GA, Klein WL Self-assembly of A $\beta$ (1-42) into globular neurotoxins. *Biochemistry.* 2003 Nov 11;42(44):12749-60.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci.* 2005 Jan;8(1):79-84. Epub 2004 Dec 19.
- Comisarow, M. B., Marshall, A. G., (1974a). "Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy." *Chem. Phys. Lett.* 25: 282-283.
- Conrads, T. P., et al., (2000). "Utility of accurate mass tags for proteome-wide protein identification." *Anal Chem.* 72(14): 3349-54.
- Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T. Mitochondria: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jun-Jul;1797(6-7):607-18
- Cordero MM, Cornish TJ, Cotter RJ, Lys IA. Sequencing peptides without scanning the reflectron: post-source decay with a curved-field reflectron time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1995;9(14):1356-61.
- Crack PJ, Cimdins K, Ali U, Hertzog PJ, Iannello RC. Lack of glutathione peroxidase-1 exacerbates A $\beta$ -mediated neurotoxicity in cortical neurons. *J Neural Transm.* 2006 May;113(5):645-57.
- Di Noto L, DeTure MA, Purich DL. Disulfide-cross-linked tau and MAP2 homodimers readily promote microtubule assembly. *Mol Cell Biol Res Commun.* 1999 Jul;2(1):71-6.
- Domon. B. and Aebersold. R (2006). "Mass spectrometry and protein analysis." *Science* 312(5771): 212-7.
- Du H, Guo L, Yan SS. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Sep 25. Synaptic mitochondrial pathology in Alzheimer's disease.
- Duering M., Grimm MOW., Grimm HS., Schröder J., and Hartmann T. Mean age of onset in familial Alzheimer's disease is determined by amyloid beta 42. *Neurobiology of Aging*, 2005, 26, 6, 785-788.
- Dulin F, Leveille F, Ortega JB, Mornon JP, Buisson A, Callebaut I, Colloc'h N. 2008. P3 peptide, a truncated form of A $\beta$  devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett* 582:pp. 1865-1870.
- Duyckaerts C, Hauw JJ, Piette F, Rainsard C, Poulain V, Berthaux P, Escourolle R. 1985. Cortical atrophy in senile dementia of the Alzheimer type is mainly due to a decrease in cortical length.

Acta Neuropathol 66:pp. 72-74.

- Echeverria V, Zeitlin R, Burgess S, Patel S, Barman A, Thakur G, Mamcarz M, Wang L, Sattelle DB, Kirschner DA, Mori T, Leblanc RM, Prabhakar R, Arendash GW. Cotinine Reduces Amyloid- $\beta$  Aggregation and Improves Memory in Alzheimer's Disease Mice. *J Alzheimers Dis.* 2011 Feb 14.
- Ecroyd H, Carver JA. Crystallin proteins and amyloid fibrils. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Jan;66(1):62-81.
- Evans, D.A., H.H. Funkenstein, M.S. Albert, P.A. Scherr, N.R. Cook, M.J. Chown, L.E. Hebert, C.H. Hennekens, and J.O. Taylor. 1989. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA.* 262:2551-6.
- Expertise collective INSERM ; " Maladie d'Alzheimer : enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux " ; synthèse et recommandations ; 2007 : 52-58
- F.H. Strobel, L.M. Preston, K.S. Washburn and D.H. Russell. *Anal. Chem.*, 64 (1992), p. 754.
- Fábíán G, Bozó B, Szikszay M, Horváth G, Coscia CJ, Szücs M. Chronic morphine-induced changes in mu-opioid receptors and G proteins of different subcellular loci in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Aug;302(2):774-80.
- Fabrigoule C, Letenneur L, Dartigues JF, Zarrouk M, Commenges D, Barberger-Gateau P. 1995. Social and leisure activities and risk of dementia: a prospective longitudinal study. *J Am Geriatr Soc* 43:pp. 485-490
- Farrer L.A., Cupples L.A., Haines J.L., Hyman B., Kukull W.A., Mayeux R. et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A metaanalysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA.*, 1997; 278:1349-1356.
- Fein et al., 2008 J.A. Fein, S. Sokolow, C.A. Miller, H.V. Vinters, F. Yang, G.M. Cole and K.H. Gylys, Co-localization of amyloid beta and tau pathology in Alzheimer's disease synaptosomes. *Am. J. Pathol*, 172 (2008), pp. 1683-1692
- Fenn JB, M. M., Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989 ). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." *Science* 246(4926): 64-71.
- Fillit, H.M. 2002. The role of hormone replacement therapy in the prevention of Alzheimer disease. *Arch Intern Med.* 162:1934-42.
- Fischer O. (1907). *Monatsschr. Psychiatr. Neurol* 22(361).
- Froehlich JE, Wilkerson CG, Ray WK, McAndrew RS, Osteryoung KW, Gage DA, Phinney BS. Proteomic study of the Arabidopsis thaliana chloroplast envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J Proteome Res.* 2003 Jul Aug;2(4):413-25.
- Fugmann T., Neri D., et al. (2010). "DeepQuanTR: MALDI-MS-based label-free quantification of proteins in complex biological samples." *Proteomics.* 10(14): 2631-43.
- Furukawa, K., B.L. Sopher, R.E. Rydel, J.G. Begley, D.G. Pham, G.M. Martin, M. Fox, and M.P. Mattson. 1996. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha secretase derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem.* 67:1882-96.
- Gandhi T, F. F., Wiederhold E, Breitling R, Poolman B, Permentier HP. (2010). "Apex peptide elution chain selection: a new strategy for selecting precursors in 2D-LC-MALDI-TOF/TOF experiments on complex biological samples." *J Proteome Res.* 5(9).
- García AM, Ramón-Bou N, Porta M. Isolated and joint effects of tobacco and alcohol consumption on risk of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(2):577-86.
- Garcia-Osta, A., and C.M. Alberini. 2009. Amyloid beta mediates memory formation. *Learn Mem.* 16:267-72.
- Gaspar A, Englmann M, Fekete A, Harir M, Schmitt-Kopplin P. Trends in CE-MS 2005-2006. *Electrophoresis.* 2008 Jan;29(1):66-79.
- Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM, Thaxton CS, Mufson EJ, Klein WL, Mirkin CA.

- Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 15;102(7):2273-6. Epub 2005 Feb 4.
- Gevaert, K. and J.Vandekerckhove (2000). "Protein identification methods in proteomics." *Electrophoresis* 21(6).
  - Ghosal K, Vogt DL, Liang M, Shen Y, Lamb BT, Pimplikar SW. 2009. Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:pp. 18367-18372.
  - Giddings, J. C. (1984). "Two-dimensional separations: concept and promise." *Anal Chem* 56(12): 1258A 1260A, 1262A, 1264A
  - Gilbert. R.G. and Smith. S.C. (1990). "Theory of unimolecular and recombination reactions." Oxford, Blackwell Scientific Publications: 364
  - Giliberto L, d'Abramo C, Acker CM, Davies P, D'Adamio L. 2010. Transgenic expression of the amyloid-beta precursor protein-intracellular domain does not induce Alzheimer's Disease-like traits in vivo. *PLoS One* 5:p. e11609.
  - Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 2;100(18):10417-22. Epub 2003 Aug 18.
  - Graves AB, van Duijn CM, Chandra V, Fratiglioni L, Heyman A, Jorm AF, Kokmen E, Kondo K, Mortimer JA, Rocca WA, . 1991. Alcohol and tobacco consumption as risk factors for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol* 20 Suppl 2:S48-57.:p. S48-S57.
  - Griffin TJ, Gygi SP, Rist B, Aebersold R, Loboda A, Jilkine A, Ens W, Standing KG. Quantitative proteomic analysis using a MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Anal Chem*. 2001 Mar 1;73(5):978-86.
  - Guerrin, M., et al., Expression cloning of human corneodesmosin proves its identity with the product of the S gene and allows improved characterization of its processing during keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*, 1998. 273(35): p. 22640-7.
  - Gunstad, J., R.H. Paul, R.A. Cohen, D.F. Tate, and E. Gordon. 2006. Obesity is associated with memory deficits in young and middle-aged adults. *Eat Weight Disord*. 11:e15-9.
  - Guo Z., Fratiglioni L., et al. (1999). "Occurrence and progression of dementia in a community population aged 75 years and older: relationship of antihypertensive medication use. ." *Arch Neurol*. 56(991-996.).
  - Gustafson D, Rothenberg E, Blennow K, Steen B, Skoog I. 2003. An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med* 163:pp. 1524-1528.
  - Haass, C., M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E.H. Koo, D. Schenk, D.B. Teplow, and et al. 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. 359:322-5
  - Hansson Petersen CA, Alikhani N, Behbahani H, Wiehager B, Pavlov PF, Alafuzoff I, Leinonen V, Ito A, Winblad B, Glaser E, Ankarcrona M. The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 2;105(35):13145-50.
  - Hardouin, J., Duchateau, M., Joubert-Caron, R. and Caron (2006). "Usefulness of an integrated microfluidic device (HPLC-Chip-MS) to enhance confidence in protein identification by proteomics." *Rapid Commun Mass Spectrom*. 20(21): 3236-44.
  - Hattan SJ, Vestal ML. Novel three-dimensional MALDI plate for interfacing high-capacity LC separations with MALDI-TOF. *Anal Chem*. 2008 Dec 1;80(23):9115-23.
  - Hayden KM, Norton MC, Darcey D, Ostbye T, Zandi PP, Breitner JC, Welsh-Bohmer KA. 2010. Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study. *Neurology* 74:pp. 1524-1530.

- Hesse, L., D. Beher, C.L. Masters, and G. Multhaup. 1994. The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett.* 349:109-16.
- Higgins LS, Murphy GM Jr, Forno LS, Catalano R, Cordell B. P3 beta-amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain *Am J Pathol.* 1996 Aug;149(2):585-96.
- Hipple, J. A., H. Sommer, and H.A. Thomas, (1949). "A Precise Method of Determining the Faraday by Magnetic Resonance." *Physical Review.* 76(12): 1877-1878.
- Holtzman RE, Rebok GW, Saczynski JS, KouzisAC, Wilcox DK, Eaton WW. 2004. Social network characteristics and cognition in middle-aged and older adults. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* 59:pp. 278-284.
- Hunt, D. F., Henderson, R. A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A. L., Appella, E. and Engelhard, V. H (1992). "Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry." *Science* 255(5049): 1261.
- Hussain, I., D. Powell, D.R. Howlett, D.G. Tew, T.D. Meek, C. Chapman, I.S. Gloger, K.E. Murphy, C.D. Southan, D.M. Ryan, T.S. Smith, D.L. Simmons, F.S. Walsh, C. Dingwall, and G. Christie. 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci.* 14:419-27.
- impossible?" *Electrophoresis* 21(6): 1054-70.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* 2009 Jul;118(1):53-69.
- Irie K, Murakami K, Masuda Y, Morimoto A, Ohigashi H, Ohashi R, Takegoshi K, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T. Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng.* 2005 May;99(5):437-47.
- Jan, A., Gokce, O., Luthi-Carter, R., and Lashuel, H. A. (2008). The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta 40 and Abeta 42 is an important determinant of Abeta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity. *J Biol Chem.*
- Jiang D, Zhao L, Clapham DE. Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Science.* 2009 Oct 2;326(5949):144-7.
- Jick H, Z. G., Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. (2000). "Statins and the risk of dementia. ." *Lancet* 1627-1631.
- Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tauhyperphosphorylation and neuritic degeneration *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Apr 5;108(14):5819-24. Epub 2011 Mar 18.
- Jin-Tai Yua, Raymond Chuen-Chung Chang, Lan Tana, , *Progress in Neurobiology* Volume 89, Issue 3, November 2009, Pages 240-255 Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: From mechanisms to therapeutic opportunities
- Johnson T, Bergquist J, Ekman R, Nordhoff E, Schürenberg M, Klöppel KD, Müller M, Lehrach H, Gobom J. A CE MALDI interface based on the use of prestructured sample supports. *Anal Chem.* 2001 Apr 15;73(8):1670-5.
- Jones N. Alzheimer disease: Risk of dementia and Alzheimer disease increases with occupational pesticide exposure. *Nat Rev Neurol.* 2010 Jul;6(7):353.
- Juan D, Zhou DH, Li J, Wang JY, Gao C, Chen M. A 2-year follow-up study of cigarette smoking and risk of dementia. *Eur. J. Neurol.* 2004;11(4):277-282.
- Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." *Anal Chem.* 60(20): 2299-301.
- Kebarle P. (2000 ). "A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry " *J Mass Spectrom* 35(7): 804-17.
- Kingdon. K. (1923). "A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures." *Phys. Rev.* 21(4): 408.

- Kinoshita, A., C.M. Whelan, O. Berezovska, and B.T. Hyman. 2002. The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells. *J Biol Chem.* 277:28530-6.
- Kivipelto, M., E.L. Helkala, M.P. Laakso, T. Hanninen, M. Hallikainen, K. Alhainen, H. Soininen, J. Tuomilehto, and A. Nissinen. (2001). "Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. ." *BMJ.* 322: 1447-51.
- Klein WL, Krafft GA, Finch CE. Targeting small Aβ oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.* 2001 Apr;24(4):219-24.
- Köcher T, Swart R, Mechtler K. Ultra-high-pressure RPLC hyphenated to an LTQ-Orbitrap Velos reveals a linear relation between peak capacity and number of identified peptides. *Anal Chem.* 2011 Apr 1;83(7):2699-704. Epub 2011 Mar 9.
- Kojro, E., G. Gimpl, S. Lammich, W. Marz, and F. Fahrenholz. 2001. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the α-secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:5815-20.
- Konno T, Morii T, Hirata A, Sato S, Oiki S, Ikura K. *Biochemistry.* 2005 Feb 15;44(6):2072-9. Covalent blocking of fibril formation and aggregation of intracellular amyloidogenic proteins by transglutaminase-catalyzed intramolecular cross-linking.
- Konrad M, Stephan Vb Hector G, Auguste D and Alzheimer's disease *The Lancet*, Volume 349, Issue 9064, Pages 1546 - 1549, 24 May 1997
- Kontush A., Berndt C., Weber W., Akopyan V., Arlt S., Schippling S. et al. Amyloid-beta is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma. *Free Radic. Biol Med.*, 2001; 30:119-128.
- Kwak, Y.D., C.L. Brannen, T. Qu, H.M. Kim, X. Dong, P. Soba, A. Majumdar, A. Kaplan, K. Beyreuther, and K. Sugaya. 2006. Amyloid precursor protein regulates differentiation of human neural stem cells. *Stem Cells Dev.* 15:381-9.
- Lain E, Penke B, Delacourte A, Gündisch D, Schröder H, Witter B. *Eur J Neurosci.* 2005 Feb;21(4):879-88. Effects of Aβ1-42 fibrils and of the tetrapeptide Pr-IIGL on the phosphorylation state of the tau-protein and on the α7 nicotinic acetylcholine receptor in vitro.
- Lalowski M, Golabek A, Lemere CA, Selkoe DJ, Wisniewski HM, Beavis RC, Frangione B, Wisniewski T. The "nonamyloidogenic" p3 fragment (amyloid β17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid. *J Biol Chem.* 1996 Dec 27;271(52):33623-31.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Aβ1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 26;95(11):6448-53.
- Launer LJ, R. G., Petrovitch H, Masaki K, Foley D, White LR, Havlik RJ. (2000). "Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study. ." *Neurobiol. Aging* 21: 49-55.
- Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. A specific amyloid-β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature.* 2006 Mar 16;440(7082):352-7.
- Letenneur L, Gilleron V, Commenges D, Helmer C, Orgogozo JM, Dartigues JF. 1999. Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:pp. 177-183.
- Letenneur L, Larrieu S, Barberger-gateau P. Alcohol and tobacco consumption as risk factors of dementia: a review of epidemiological studies. *Biomed. Pharmacother.* 2004;58(2):95-99.
- Li B, Chohan MO, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol.* 2007 May;113(5):501-11
- Li, L. W., A. P. L.; Coulson, L. D. (1993). "Continuous-flow matrix-assisted laser desorption

ionization mass spectrometry." *Anal. Chem.* 65: 493-495.

- Lin, X., G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti, and J. Tang. 2000. Human aspartic protease
- Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., Carmack, E., Mize, G. J., Morris, D. R., Garvik, B. M. and Yates, J.R., 3rd (1999). "Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry." *Nat Biotechnol* 17(7): 676-82.
- Lloret A, Badia MC, Giraldo E, Ermak G, Alonso MD, Pallardó FV, Davies KJ, Viña J. Amyloid-? Toxicity and Tau Hyperphosphorylation are Linked Via RCAN1 in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2011 Aug 29.
- Lobo A, L. L., Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Jagger C, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A. (2000). "Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group.* ." *Neurology* 54: S4-S9.
- Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X, Pollak S, Chaney M, Trinchese F, Liu S, Gunn-Moore F, Lue LF, Walker DG, Kuppusamy P, Zewier ZL, Arancio O, Stern D, Yan SS, Wu H. ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science.* 2004 Apr 16;304(5669):448-52.
- M. Gralle and S. T. Ferreira (2007). "Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts." *Prog Neurobiol*, 82(1), 11-32.
- Makarov. A. (2000). "Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis." *Anal. Chem.* 72(6): 1156.
- Mamyrin, B. K., VI. Shmikk, DV. Zagulin, VA. (1973). "The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution." *Sov. Phys. JETP* 37(45).
- Marcus, R. A. (1952). "Unimolecular dissociations and free radical recombination reactions." *J. Chem. Phys. Rev.* 20: 359-364.
- Marshall, A.G., C.L. Hendrickson, and G.S. Jackson, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews*, 1998. 17(1): p. 1-35.
- Masters C.L., Simms G., Weinman N.A., Multhaup G., McDonald B.L., and Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 1985; 82:4245-4249.
- Medzihradsky K F ET al Peptide Sequence Determination by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Employing a Tandem Double Focusing Magnetic-Orthogonal Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometer" *JASMS*, 7, no. 1, January 1996, page 1-10
- Medzihradsky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML, Burlingame AL. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem.* 2000 Feb 1;72(3):552-8.
- Meehan S, Berry Y, Luisi B, Dobson CM, Carver JA, MacPhee CE. Amyloid fibril formation by lens crystallin proteins and its implications for cataract formation. *J Biol Chem.* 2004 Jan 30;279(5):3413-9. Epub 2003 Nov 13.
- Meheroz HR, Barry DJ. The cumulative effect of repetitive concussion in sports. *Clin Sports Med* 2001;11:194-8.
- memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:1456-60.
- Meziane, H., J.C. Dodart, C. Mathis, S. Little, J. Clemens, S.M. Paul, and A. Ungerer. 1998. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:12683-8.
- Mirgorodskaya E., B. C., Fucini P, Lehrach H, Gobom J. (2005). "Nanoflow liquid chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: sample preparation, data analysis, and application to the analysis of complex peptide mixtures." *Proteomics.* 5(2): 399-408.
- Mollé D, Jardin J, Piot M, Pasco M, Léonil J, Gagnaire V. *J Chromatogr A.* 2009; 1216:2424

- Moskovets E, Preisler J, Chen HS, Rejtar T, Andreev V, Karger BL. High-throughput axial MALDI-TOF MS using a 2-kHz repetition rate laser. *Anal Chem.* 2006 Feb 1;78(3):912-9.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation *J Neurosci.* 2000 Jun 1;20(11):4050-8.
- Murray, K. K., Russell, D. H., (1994). "Aerosol matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry." *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5: 1-9.
- Nagele, E., Vollmer, M. and Horth, P. (2004). "2D nano-LC/MS for proteomics applications: a comparative analysis using yeast proteome." *J Biomol Tech* 15(2): 134-43.
- Nagra, D., Li, L., (1995). "Liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry with continuous-flow matrix-assisted laser desorption ionization." *J. Chrom* 711: 235- 245.
- Nemes P, Marginean I, Vertes A. Spraying mode effect on droplet formation and ion chemistry in electrosprays. *Anal Chem.* 2007 Apr 15;79(8):3105-16. Epub 2007 Mar 23.
- Neubert H, B. T., Rumpel K, Hunt BT, Henle ES, James IT. (2008). "Label-free detection of differential protein expression by LC/MALDI mass spectrometry." *J Proteome Res.* 7(6): 2270-9.
- Nishimoto, T. Okamoto, Y. Matsuura, S. Takahashi, T. Okamoto, et al. (1993). "Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o)." *Nature*, 362(6415), 75-9
- O'Farrell PH. (1975 ). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." *J Biol Chem.* 250(10): 4007-21.
- Oksman P. (1995). "A Fourier transform time-of-flight mass spectrometer. A SIMION calculation approach. ." *Int J Mass Spectrom.* 141: 67-76.
- Ondrejčák T, Klyubin I, Hu NW, Barry AE, Cullen WK, Rowan MJ. Alzheimer's disease amyloid beta-protein and synaptic function. *Neuromolecular Med.* 2010 Mar;12(1):13-26. Epub 2009 Sep 16.
- O'Nuallain B, Freir DB, Nicoll AJ, Risse E, Ferguson N, Herron CE, Collinge J, Walsh DM. Amyloid beta-protein dimers rapidly form stable synaptotoxic protofibrils *J Neurosci.* 2010 Oct 27;30(43):14411-9.
- Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Claus JJ, vander Cammen TJ, Grobbee DE, Hofman A. 1995. Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ* 310:pp. 970-973.
- P. Mecocci, A. Cherubini, M. F. Beal et al., "Altered mitochondrial membrane fluidity in AD brain," *Neuroscience Letters*, vol. 207, no. 2, pp. 129-132, 1996.
- Palotás A, Kálmán J, Palotás M, Juhász A, Janka Z, Penke B. Beta-amyloid-induced increase in the resting intracellular calcium concentration gives support to tell Alzheimer lymphocytes from control ones. *Brain Res Bull.* 2002 Jun;58(2):203-5
- Park SJ, Song JS, Kim HJ. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; 19: 3089
- Paul W. and H. Steinwedel (1953). "Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld." *RZeitschrift für Naturforschung* 8 (7): 448-450.
- Pes O, Preisler J. Off-line coupling of microcolumn separations to desorption mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2010 Jun 18;1217(25):3966-77. Epub 2010 Mar 3.
- Pitsi, D., and J.N. Octave. 2004. Presenilin 1 stabilizes the C-terminal fragment of the amyloid precursor protein independently of gamma-secretase activity. *J Biol Chem.* 279:25333-8.
- Pouillet P, Carpentier S, Barillot E. *Proteomics* 2007; 7: 2553
- Qi-Takahara, Y., M. Morishima-Kawashima, Y. Tanimura, G. Dolios, N. Hirotsu, Y. Horikoshi, F. Kametani, M. Maeda, T.C. Saido, R. Wang, and Y. Ihara. 2005. Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci.* 25:436-45.
- Qiu C., W. B., Viitanen M., and Fratiglioni L. (2003). "Pulse pressure and risk of Alzheimer

- disease in persons aged 75 years and older: a community-based, longitudinal study." *Stroke*. 34(594-599).
- Ramarason H, H. C., Barberger-Gateau P, Letenneur L, Dartigues JF. (2003). "Prévalence de la démence et de la maladie d'Alzheimer chez les personnes de 75 ans et plus: données réactualisées de la cohorte Paquid." *Rev Neurol*. 159(4): 405-11.
  - Refolo, L. M., B. Malester, J. LaFrancois, T. Bryant-Thomas, R. Wang, G.S. Tint, K.Sambamurti, K. Duff, and M.A. Pappolla. (2000). "Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. ." *Neurobiol Dis*. 7: 321-31.
  - Resende R, Ferreiro E, Pereira C, Resende de Oliveira C. Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience*. 2008 Aug 26;155(3):725-37.
  - Rhein et al., 2009 V. Rhein, X. Song, A. Wiesner, L.M. Ittner, G. Baysang, F. Meier, L. Ozmen, H. Bluethmann, S. Dröse, U. Brandt, E. Savaskan, C. Czech, J. Götz and A. Eckert, Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 106 (2009), pp. 20057-20062
  - Rocchi A., Pellegrini S., Siciliano G., Murri L. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull.*, 2003, 30;61, 1, 1-24.
  - Rocchiccioli S, C. E., Boccardi C, Citti L, Callipo L, Laganà A, Capobianco E. (2010). "A proteomic study of microgravity cardiac effects: feature maps of label-free LC-MALDI data for differential expression analysis." *Mol Biosyst*. 6(11): 2218-29.
  - Roepstorff, P. and J. Fohlman (1984). "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides." *Biomed Mass Spectrom*. 11(11): 601.
  - Rosenstock, H. M., Wallenstein, M.B., Warharftig, A.L., Eyring, H. (1952). "Absolute rate theory for isolated systems and the mass spectra of polyatomic molecules. ." *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 38: 667-678.
  - Ruppen I, G. L., Orenes-Piñero E, Ashman K, Gil M, Algaba F, Bellmunt J, Sánchez-Carbayo M. (2010). "Differential protein expression profiling by iTRAQ-two-dimensional LC-MS/MS of human bladder cancer EJ138 cells transfected with the metastasis suppressor KiSS-1 gene." *Mol Cell Proteomics*. 9(10): 2276-91.
  - Sambamurti K, G. A., Kindy MS, Bhat NR, Greig NH, Lahiri DK, et al. (2004). "Cholesterol and Alzheimer's disease: clinical and experimental models suggest interactions of different genetic, dietary and environmental risk factors." *Curr. Drug. Targets* 5(6): 517-528.
  - Santoni, V., Molloy, M. and Rabilloud, T (2000). "Membrane proteins and proteomics: un amour
  - Schwartz JC, Senko MW, Syka JE. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer *J Am Soc Mass Spectrom*. 2002 Jun;13(6):659-69.
  - Senko MW, Schwartz JC, Schoen AE, Syka JEP. 2000. Fourier transform mass spectrometry in a linear quadrupole ion trap. 48th ASMS Conf Mass Spectrom Allied Topics, Long Beach, California
  - Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, Drobecq H, Kostanjevecki V, Missiaen C, Watzet A, David JP, Vanmechelen E, Sergheraert C, Delacourte A. 2003. Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J Neurochem* 85:pp. 1581-1591.
  - Shah, S., S.F. Lee, K. Tabuchi, Y.H. Hao, C. Yu, Q. LaPlant, H. Ball, C.E. Dann, 3rd, T. Sudhof, and G. Yu. 2005. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell*. 122:435-47.
  - Sharma A, C. L., Sul J-Y, Kim TK, Barrett L, et al. (2010). "Neurotoxic Phosphoform of Elk-1 Associates with Inclusions from Multiple Neurodegenerative Diseases. ." *PLoS ONE* 5(5): e9002.
  - Sharma LK, F. H., Liu J, Vartak R, Deng J, Bai Y. (2011). "Mitochondrial respiratory complex I dysfunction promotes tumorigenesis through ROS alteration and AKT activation." *Hum Mol Genet*. Sept 2.
  - Sharp ES, Gatz M. Relationship Between Education and Dementia: An Updated Systematic

Review. Alzheimer Dis Assoc Disord. 2011 Jul 11

- Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 1995, 375, 653-60.
- Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X. D., McKay, D. M., Tintner, R., Frangione, B., and et al. (1992). Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258, 126-129.
- Sinha, S., J.P. Anderson, R. Barbour, G.S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H.F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S.M. Suomensari, S. Wang, D. Walker, J. Zhao, L. McConlogue, and V. John. 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*. 402:537-40.
- Slemmer JE, Matser EJT, De Zeeuw CI, Weber JT. Repeated mild injury causes cumulative damage to hippocampal cells. *Brain* 2002;125:2699-709.
- Staub A, Schappler J, Rudaz S, Veuthey JL. CE-TOF/MS: fundamental concepts, instrumental considerations and applications. *Electrophoresis*. 2009 May;30(10):1610-23.
- Stein, T.D., N.J. Anders, C. DeCarli, S.L. Chan, M.P. Mattson, and J.A. Johnson. 2004. Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci*. 24:7707-17.
- Streltsov VA, Varghese JN, Masters CL, Nuttall SD. Crystal structure of the amyloid- $\beta$  p3 fragment provides a model for oligomer formation in Alzheimer's disease *J Neurosci*. 2011 Jan 26;31(4):1419-26.
- Strittmatter W.J., Saunders A.M., Schmechel D., Pericak-Vance M., Enghild J., Salvesen G.S. et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 1993; 90:1977-1981.
- Sulkava R, Wikstrom J, Aromaa A, Raitasalo R, Lehtinen V, Lahtela K, Palo J. 1985. Prevalence of severe dementia in Finland. *Neurology* 35:pp. 1025-1029.
- Sultana R, Boyd-Kimball D, Cai J, Pierce WM, Klein JB, Merchant M, Butterfield DA. Proteomics analysis of the Alzheimer's disease hippocampal proteome. *J Alzheimers Dis*. 2007 May;11(2):153-64.
- Takach, E. J., et al., (1997). "Accurate mass measurements using MALDI-TOF with delayed extraction. ." *Anal Chem*. 16(5): 363-9.
- Thèse Anne-Marie Hesse UPMC 2009
- Thèse J. Vinh UPMC 1999
- Thierry Rabilloud, Proteome research : Two-dimensional gel electrophoresis an identification methods, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2000, ISBN 3540657924
- Thompson, J. J. (1913). "Rays of positive electricity and their application to chemical analysis." *Proceedings of the Royal Society A* 89: 1-20.
- Tillement L, Lecanu L, Papadopoulos V. Further evidence on mitochondrial targeting of  $\beta$ -amyloid and specificity of  $\beta$ -amyloid-induced mitotoxicity in neurons. *Neurodegener Dis*. 2011;8(5):331-44
- Toyama A, N. H., Matsuda K, Ishikawa N, Kohno N, Daigo Y, Sato TA, Nakamura Y, Ueda K (2011). "Deglycosylation and label-free quantitative LC-MALDI MS applied to efficient serum biomarker discovery of lung cancer." *Proteome Sci*. 8(9): 18.
- Tyers, M. and M. Mann (2003). "From genomics to proteomics." *Nature* 422(6928): 193-7.
- Valero ML, Giralt E, Andreu D. *Lett. Pept. Sci*. 1999; 6: 109
- Vassar, R., B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, and M. Citron. 1999. Beta-

- secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 286:735-41.
- Verdier Y, Huszár E, Penke B, Penke Z, Woffendin G, Scigelova M, Fülöp L, Szucs M, Medzihradzky K, Janáky T. Identification of synaptic plasma membrane proteins co-precipitated with fibrillar beta-amyloid peptide. *J Neurochem*. 2005 Aug;94(3):617-28. Epub 2005 Jul 7.
  - Verghese J., L. R. B., Hall C.B., Kuslansky G., and Katz M.J. (2003). "Low blood pressure and the risk of dementia in very old individuals." *Neurology* 61(1667-1672.).
  - Vestal ML. Modern MALDI time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2009 Mar;44(3):303-17.
  - Vestal ML. Modern MALDI time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2009 Mar;44(3):303-17.
  - Vestal, M.L., Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando, FL, 1998, p.35
  - Vossel et al., 2010 K.A. Vossel, K. Zhang, J. Brodbeck, A.C. Daub, P. Sharma, S. Finkbeiner, B. Cui and L. Mucke, Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport. *Science*, 330 (2010), p. 198
  - Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:pp. 535-539.
  - Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, Selkoe DJ. The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry*. 2000 Sep 5;39(35):10831-9.
  - Wang X, Su B, Lee HG, Li X, Perry G, Smith MA, Zhu X. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2009 Jul 15;29(28):9090-103.
  - Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*. 2001 Mar;19(3):242-7.
  - Watson, G.S., and S. Craft. 2003. The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS Drugs*. 17:27-45.
  - Watson, G.S., and S. Craft. 2003. The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS Drugs*. 17:27-45.
  - Weyerer S, Schäufole M, Wiese B, Maier W, Tebarth F, van den Bussche H, Pentzek M, Bickel H, Lupp M, Riedel-Heller SG; Current alcohol consumption and its relationship to incident dementia: results from a 3-year follow-up study among primary care attenders aged 75 years and older. *Age Ageing*. 2011 Jul;40(4):456-463. Epub 2011 Mar 2.
  - Whitehouse CM, D. R., Yamashita M, Fenn JB (1985 ). "Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers." *Anal Chem*. 57(3): 675-9.
  - Wiley, W. and I. McLaren (1955). "Time -of-flight mass spectrometry with improved resolution." *Rev Sci Instrum* 26: 1150-1157.
  - Wilm, M. and M. Mann (1996 ). "Analytical properties of the nanoelectrospray ion source." *Anal Chem*. 35(7): 804-17.
  - Wilson RS, M. D. L. C., Barnes LL, Schneider JA, Bienias JL, Evans DA, et al. (2002). "Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease." *Jama* 287(6): 742-748.
  - Wirths O, Breyhan H, Cynis H, Schilling S, Demuth HU, Bayer TA. 2009. Intraneuronal pyroglutamate-Abeta 3-42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathol* 118:pp. 487-496.
  - Wu HY, Hudry E, Hashimoto T, Kuchibhotla K, Rozkalne A, Fan Z, Spires-Jones T, Xie H, Arbel-Ornath M, Grosskreutz CL, Bacskai BJ, Hyman BT. Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through

- calcineurin activation. *J Neurosci.* 2010 Feb 17;30(7):2636-49.
- Wu WW, W. G., Baek SJ, Shen RF. (2006). "Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF." *J Proteome Res.* 5(3): 651-8.
  - Xia W, Zhang J, Kholodenko D, Citron M, Podlisny MB, Teplow DB, Haass C, Seubert P, Koo EH, Selkoe DJ. Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins *J Biol Chem.* 1997 Mar 21;272(12):7977-82.
  - Yan, R., M.J. Bienkowski, M.E. Shuck, H. Miao, M.C. Tory, A.M. Pauley, J.R. Brashier, N.C. Stratman, W.R. Mathews, A.E. Buhl, D.B. Carter, A.G. Tomasselli, L.A. Parodi, R.L. Heinrikson, and M.E. Gurney. 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature.* 402:533-7.
  - Yankner B.A., Caceres A., and Duffy L.K. Nerve growth factor potentiates the neurotoxicity of beta amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 1990; 87:9020-9023.
  - Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. 1990, *Science*, 250(4978):279-82.
  - Yao J, Du H, Yan S, Fang F, Wang C, Lue LF, Guo L, Chen D, Stern DM, Gunn Moore FJ, Xi Chen J, Arancio O, Yan SS. Inhibition of amyloid-beta (A $\beta$ ) peptide-binding alcohol dehydrogenase-A $\beta$  interaction reduces A $\beta$  accumulation and improves mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2011 Feb 9;31(6):2313-20.
  - Yin, H., Killeen, K., Brennen, R., Sobek, D., Werlich, M. and van de Goor, T. (2005). "Microfluidic chip for peptide analysis with an integrated HPLC column, sample enrichment column, and nanoelectrospray tip." *Anal Chem* 77(2): 527-33.
  - Zhan Q, G. A., Hercules DM., (1999). "A novel interface for on-line coupling of liquid capillary chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization detection." *Rapid Commun Mass Spectrom.* 13(22): 2278-83.
  - Zhen Y., X. N., Richardson B, Becklin R, Savage JR, Blake K, Peltier JM (2004). "Development of an LC-MALDI method for the analysis of protein complexes." *J Am Soc Mass Spectrom.* 15(6): 803-22.
  - Zhou DF, Wu CS, Qi H, Fan JH, Sun XD, Como P, Qiao YL, Zhang L, Kieburz K. 2006. Prevalence of dementia in rural China: impact of age, gender and education. *Acta Neurol Scand* 114:pp. 273-280.
  - Zou K., Kim D., Kakio A., Byun K., Gong J.-S., Kim J., Kim M., Sawamura N., Nishimoto S.-i., Matsuzaki K., Lee B., Yanagisawa K. and Michikawa M. (2003) Amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ )<sub>1-40</sub> protects neurons from damage induced by A $\beta$ <sub>1-42</sub> in culture and in rat brain. *J. Neurochem.* 87.
  - Zubarev, R. A., P. Hakansson, and B. Sundqvist, (1996.). "Accuracy requirements for peptide characterization by monoisotopic molecular mass measurements." *Anal Chem.* 68(22): 4060-4063.

