

Peptidome et spectrométrie de masse

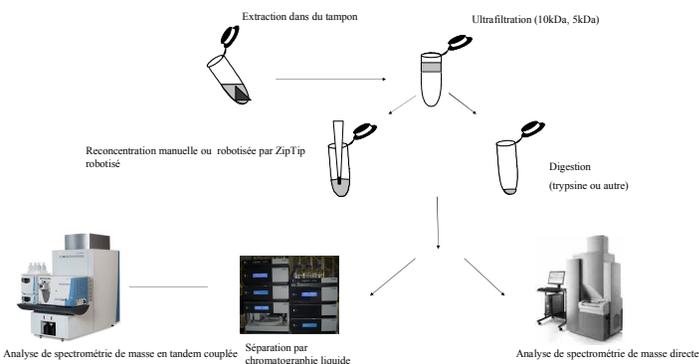
A-M Hesse, N. Royer, P. Marcelo, J. Rossier, et J. Vinh

UMR 7637 CNRS/ESPCI - Unité de Neurobiologie & Diversité Cellulaire - 10 rue Vauquelin, 75231 Paris cedex 05

INTRODUCTION

Un organisme pluricellulaire se caractérise d'abord par son génome, identique dans toutes ses cellules. Cependant, au cours du développement, chaque cellule se différencie pour assurer une fonction propre au sein de l'organisme. Cette différenciation se traduit notamment au niveau des protéines et des peptides exprimés par chaque cellule. Depuis le séquençage du génome de certains organismes, un nouveau défi s'est alors imposé : caractériser le protéome et le peptidome associés. La spectrométrie de masse s'est imposée pour l'étude du protéome car elle présente les trois points forts suivants : haute sensibilité, grande fiabilité au niveau de l'identification et possibilité d'étudier des mélanges complexes de polypeptides. Il faut désormais aussi se tourner vers les peptides endogènes.

L'inconvénient principal de ce type d'étude réside dans les très faibles concentrations de matériel sur lesquelles il faut travailler : quelques femtomoles de peptides dilués dans quelques millilitres d'un milieu riche en sels inorganiques. Notre objectif est donc de développer une méthode d'enrichissement et de purification de peptides contenus dans une matrice biologique. Pour cela, nous avons choisi d'extraire les molécules d'intérêt sur phase solide puis de les concentrer dans un tampon adapté à l'étude par spectrométrie de masse. Des extractions de tranches de cerveau de rat ont été réalisées dans différents tampons. Les extraits obtenus ont d'abord été fractionnés par ultrafiltration en différentes gammes de masses, puis digérés ou non par des enzymes et reconcentrés pour être analysés par nanoLCMSMS ou directement sur MALDI TOF-TOF.



MATERIEL ET METHODES

ECHANTILLONS

Des tranches de cortex de rat ayant 15 jours ont été découpées avec une épaisseur de 300µm. Quatre d'entre elles ont été agitées durant 1h à 4°C dans 100µl des solutions suivantes :

- Tampon phosphate (PBS) 10mM acidifié par 1% d'acide trifluoroacétique (TFA)
- Chlorure de potassium (KCl) 30mM, acidifié par 1% de TFA
- TFA 0.1%
- Acide formique (AF) 1%

Quatre autres tranches ont été agitées dans 500µl de ces mêmes solutions durant une nuit à 4°C. Pour les huit échantillons, les surnageants ont été récupérés.

TRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE 100µl

Ces solutions sont soumises à une phase de reconcentration robotisée par un robot de digestion TECAN. Les peptides sont extraits sur des billes de phase C18 conditionnées sur un ZipTip C18 (Millipore) grâce à une série de 300 aspirations/refoulements. Les peptides sont ensuite lavés par une solution d'AF 1% puis élués par 4µl de solution Acétonitrile/eau/AF (AcN/H₂O/AF, 50/50/1) et 4µl d'AcN. L'éluat est réduit à 2µl d'AF 1% par évaporation.

TRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE 500µl

Les solutions sont premièrement soumis à un fractionnement par ultrafiltration sur des Vivaspin 500 (Vivascience) de seuil de poids moléculaire 10kDa puis 5kDa.

La fraction la plus légère est reconcentrée sur ZipTip C18 par le robot : la solution est prélevée par une aiguille du robot puis injectée au dessus d'un ZipTip pour être enfin refoulée. Les peptides sont lavés et élués comme précédemment.

Les deux autres fractions sont digérées ou non par des enzymes (trypsin et endoprotéinase AspN) puis dessalées sur ZipTip.

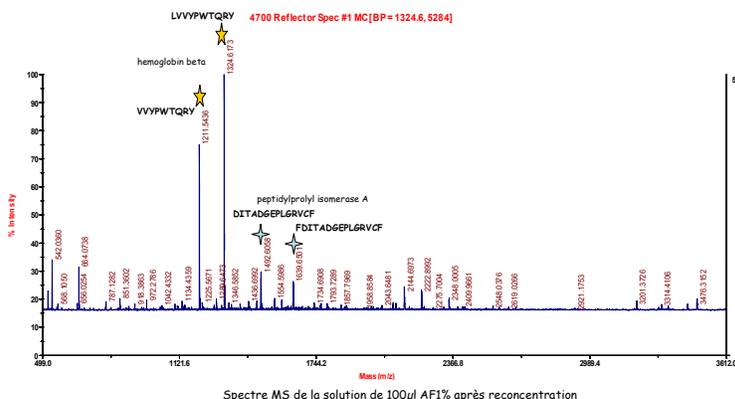
ANALYSE DE MASSE

Après traitement, les différents échantillons sont à la fois analysés par MALDI TOF-TOF et nano LCMSMS

RESULTATS

MALDI TOF-TOF

La matrice utilisée est une solution à 4mg/ml d'acide α-cyano-hydroxycinnamique (CHCA) dans un mélange AcN/H₂O/TFA (60/40/0.1) avec 10mM de citrate d'ammonium. L'échantillon (0.3µl) et la matrice (0.6µl) sont mélangés sur la plaque en utilisant la méthode de la goutte séchée. Les spectres MALDI-TOF des peptides sont obtenus sur un spectromètre de masse MALDI TOF/TOF™ 4800 (Applied Biosystems Inc., Framingham, MA). Les analyses sont menées en mode réflecteur positif, avec une tension d'accélération de 20kV en source 1. 2000 scans sont moyennés sur la gamme de masse 500-3500Da. Les données sont traitées par la station de travail *GPS Explorer™* (Applied Biosystems) en combinant les recherches dans la base de données NCBIInr avec Mascot (MatrixScience). La calibration externe des spectres est réalisée en utilisant les ions [M+H]⁺ du mélange Proteomix Peptide mix 4 (LaserBioLabs, Sophia Antipolis, France) contenant le fragment 1-5 de la Bradykinine (573.315Da), l'Angiotensine II humaine (1046.542Da), la Neurotensine (1672.918Da), le fragment 18-39 de l'ACTH (2465.199Da) et la chaîne B oxydée de l'Insuline (3494.651Da).



Spectre MS de la solution de 100µl AF1% après reconcentration

Les spectres MALDI générés n'ont généralement pas pu donner des résultats satisfaisants. Les peptides identifiés sont peu nombreux malgré des spectres assez riches et correspondent à des fragments de protéines très abondantes dans l'ensemble des tissus (hémoglobine bêta) ou spécifiques des tissus nerveux (Peptidylprolyl Isomerase¹, protéine intervenant dans la synthèse protéique). Il est probable que la complexité de l'échantillon rende les spectres difficilement interprétables.

NANOLC MSMS

Les échantillons non digérés sont également analysés par chromatographie capillaire en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), à l'aide d'un système chromatographique Famos-Switchos-UltiMate (Dionex, Pays-Bas) connecté à un spectromètre de masse hybride nanoESI-QqTOF (QTOF2, Waters). Les séparations chromatographiques ont été menées sur une colonne capillaire à polarité de phase inversée (Atlantys C18, 75 µm d.i., 15 cm de longueur, Waters), à un débit de 200 nL/min. Les échantillons digérés sont analysés à l'aide du système chromatographique NanoLC Dual Gradient Ultimate™ 3000 (Dionex) sur une colonne capillaire (Pepmap C18, 75 µm d.i., 15 cm de longueur, LC Packings) couplé à un spectromètre de masse FTICR : LTQ-FT (Thermo Electron).

Après traitement des données, les recherches ont été effectuées sur le logiciel MASCOT. Quel que soit l'état de l'échantillon (digéré ou non), aucune enzyme n'a été spécifiée afin de remonter aux peptides initiaux.

Dans les échantillons digérés de la fraction intermédiaire, 35 protéines ont été identifiées par 93 peptides. Parmi ceux-ci 51 correspondent à des peptides n'ayant pas été obtenus par l'enzyme de digestion mais probablement par des protéases *in vivo* lors des chaînes de protéolyse des protéines. Cependant parmi les protéines identifiées, beaucoup correspondent à des protéines très représentées dans les cellules comme les tubulines, les kératines...

Cependant les échantillons non digérés, quelques peptides ont été identifiés mais les ions générés sont généralement très chargés et difficiles à fragmenter. De plus le signal généré par une série d'ions multichargés correspondant à un peptide lourd peut suffire à masquer le signal des autres ions (figure 1). Enfin un spectre MSMS pauvre (figure 2) combiné à une détermination difficile de l'état de charge par le QTOF (ici 4 au lieu de 6) pour l'ion 831Th ne permet pas d'identifier ce type de peptide.

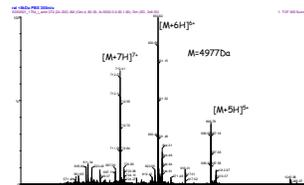


Figure 1 : Un scan sur le chromatogramme de la fraction inférieure à 5kDa en PBS (100µl)

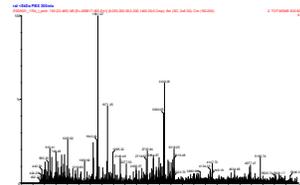


Figure 2 : Spectre MSMS correspondant après traitement informatique

CONCLUSION

La stratégie générale mise en place de fractionnement des échantillons en différentes gammes de masse puis de reconcentration des peptides permet d'identifier des peptides endogènes, la plupart générés par des protéases *in vivo*. Cependant les fragments générés restent issus de protéines majoritaires du cytosquelette. Afin d'identifier des neuropeptides par exemple, notre démarche reste à améliorer.

Pour cela, nous envisageons de coupler une séparation chromatographique bidimensionnelle (LC 2D) à la spectrométrie de masse MALDI TOF-TOF. En effet, les spectres générés par ce spectromètre étaient peu informatifs probablement en raison de la complexité des échantillons. L'étape de chromatographie préalable réduirait ce problème. D'autre part, la LC 2D permettrait de mieux séparer les peptides et ainsi de fragmenter plus d'espèces, notamment des minoritaires comme les neuropeptides.

Référence
1 Nishida *et al*, The top 10 most abundant transcripts are sufficient to characterize the organs functional specificity: evidences from the cortex, hypothalamus and pituitary gland, *Gene*, 344, 2005