

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

Neurobiologie et Diversité Cellulaire ; UMR 7637 CNRS/ESPCI ; 10, rue Vauquelin F75231 Paris Cedex 05; France

Introduction

Un organisme pluricellulaire se caractérise d'abord par son génome, identique dans toutes ses cellules. La différenciation des cellules au cours du développement se traduit notamment au niveau des protéines et des peptides exprimés. Un nouveau défi s'impose alors : caractériser le protéome et le peptidome associés. Pour l'étude du protéome, la spectrométrie de masse présente trois points forts : haute sensibilité, une grande fiabilité d'identification et étude des mélanges complexes de polypeptides. Mais il faut aussi se tourner vers les peptides endogènes. L'inconvénient principal de ce type d'étude réside non pas dans la sensibilité intrinsèque nécessaire pour l'analyse mais dans les très faibles concentrations de matériel à partir desquelles il faut travailler : quelques fmol de peptides dilués dans quelques mL d'un milieu riche en sels inorganiques. Il faut donc développer une méthode d'enrichissement et de purification des neuropeptides contenus dans cette matrice biologique. Les molécules d'intérêt sont extraites sur phase solide puis concentrées dans un tampon adapté à la spectrométrie de masse. Après évaluation de différents supports chromatographiques pour l'extraction manuelle ou robotisée, l'analyse MALDI a également été optimisée. Le protocole global a été validé sur des neuropeptides standards avec détection à une concentration de 200amol/ μ L dans l'échantillon de départ et doit par la suite être appliqué à des échantillons biologiques.

Matériel et Méthodes

Échantillons

La mise au point des conditions d'analyse pour la spectrométrie de masse MALDI a été effectuée sur deux mélanges de peptides standards et un mélange de neuropeptides standards :

- Pexmix 4 : Bradykinine 1-5, Angiotensine II, Neurotensine, ACTH 18-39, Insuline B oxydée.
- Standard Maison : Des-Arg-Bradykinine, Angiotensine I, Neurotensine, ACTH 18-39, ACTH 7-38.
- Leu-enkephaline, Met-enkephaline acetate, (Sar¹, Leu⁵)-Angiotensine II acetate, Somatostatine, Endothéline 1 (ET-1), Peptide Vasocactif intestinal porcine (VIP). Ce dernier mélange a également permis de mettre au point l'extraction sur phase solide.

Une fois les protocoles d'extraction mis au point, ils ont été appliqués à différents échantillons biologiques :

- Au cours d'une expérience d'électrophysiologie, les tranches de 300 μ m de cerveau de rat baignent dans un tampon Ringer continuellement perfusé à 2ml/min. Le surnageant de ces tranches a été récupéré (après arrêt de la perfusion durant 5min) afin d'étudier les peptides libérés en réponse aux excitations électriques.
- Nous disposons également de solutions de PBS dans lesquelles des tranches de cerveau de rat depuis un an et demi. Nous avons étudiés ces solutions afin d'étudier les peptides libérés au cours de la conservation de ces tranches.

Extraction sur phase solide en mode manuel

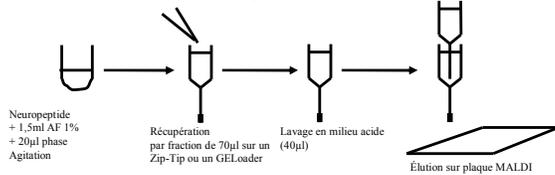
Lors du mode manuel, les peptides sont concentrés sur des billes de phase hydrophobe en vrac grâce à une longue agitation qui favorise la rencontre entre les billes et les molécules.

- Différents types de billes de phases ont été utilisés :

Phase Pores R2 10, Applied Biosystems (phase polymérique de polystyrène divinylbenzène, de granulométrie 10 μ m)

Phase Pores Oligo R3, Applied Biosystems (phase de même type, de granulométrie 30 μ m)

- Différents acides ont été utilisés pour la phase de lavage (Acide Trifluoroacétique et Acide Formique) ainsi que différentes conditions d'éluion (Pourcentage en Acétonitrile, avec ou sans matrice pour l'analyse MALDI).



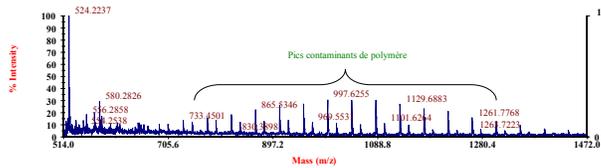
Extraction sur phase solide en mode robotisé

Afin d'améliorer la reproductibilité et de diminuer la durée de la manipulation, nous avons également mis en place un protocole robotisé en utilisant un robot de digestion TECAN. Lors du mode robotisé, les peptides sont concentrés sur des billes de phase C18 conditionnées sur un ZipTip C18 (Millipore) grâce à une série d'aspirations/refoulements. La mise au point a concerné le nombre d'aspirations/refoulements et les choix des solvants de lavage et d'éluion.

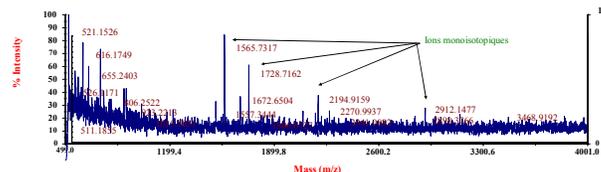


Mise au point de l'analyse MALDI

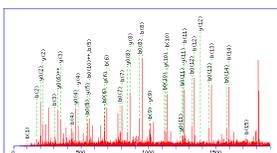
La spectrométrie de masse MALDI est une méthode sensible mais dont la préparation des échantillons reste très empirique. Elle demande donc une mise au point minutieuse. Nous avons donc été amenés à sélectionner d'une part la matrice (CHCA, DHB) parmi toutes celles dont nous disposons au laboratoire pour l'étude des neuropeptides et d'autre part les meilleures conditions de préparation de la matrice (concentration, solvant, additifs). Chaque mélange de peptides standards a été dilué dans la matrice testée à différents facteurs de dilution. Pour chaque dilution, 3 spots de 1 μ l ont été déposés aléatoirement sur une plaque MALDI afin d'évaluer la réproductibilité. Tous les spectres ont été acquis sur un MALDI-TOF Voyager DE-STR (PerSeptive, Applied Biosystems, Applied). Les spectres sont enregistrés en mode positif, réfléchion avec une tension d'accélération de 20kV sur la gamme de masse 500-4000uma après 396 shots où l'énergie du laser est progressivement portée au seuil de désorption des espèces.



Spectre 1 : Application du protocole manuel au surnageant d'une tranche de cerveau



Spectre 2 : Application du protocole robotisé au surnageant d'une tranche ayant trempé dans le PBS



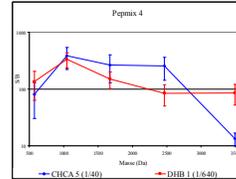
Les spectres MS/MS ont été réalisés en utilisant un spectromètre de masse de type Quadrupole-Temps de Vol (QTOF2, Micromass, Manchester, UK) couplé à une source nano electrospray en injection directe.

Spectre 3 : Interprétation MASCOT de l'ion précurseur 907,35 Th

Résultats

Conditions d'analyse optimales en MALDI-TOF

Une fois les meilleurs lots de CHCA et de DHB choisis au laboratoire, nous avons étudié la différence des résultats obtenus en fonction de la nature de ces deux matrices. Pour cela, nous avons déterminé le facteur de dilution qui permettrait d'obtenir le même type de rapport Signal/Bruit avec les deux matrices. Comme on peut le voir sur le graphe 1, la DHB permet d'obtenir une meilleure sensibilité puisque on obtient les mêmes rapports Signal/Bruit que pour la CHCA mais pour un facteur de dilution plus grand (concentration de 200amol/ μ L). Il est possible que cette différence s'explique tout simplement par la forme des cristaux : la DHB donne des aiguilles où les espèces sont concentrées à la base de celles-ci alors qu'en CHCA les espèces sont diluées de façon homogène sur tout le spot.

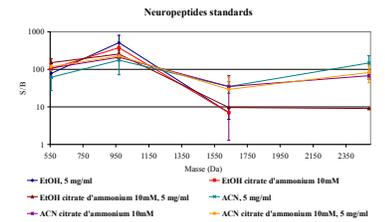


Graphe 1 : Comparaison CHCA/DHB

Six protocoles ont ensuite été testés pour la préparation de la DHB :

- 5mg/ml dans 20/80/0,1 AcN/EAU/TFA (v/v/v)
- 5mg/ml et 10mg/ml dans 20/80/0,1 AcN/EAU/TFA (v/v/v) avec 10mM/L de citrate d'ammonium
- 5mg/ml dans 10/90/0,1 EtOH/EAU/TFA (v/v/v)
- 5mg/ml et 10mg/ml dans 10/90/0,1 EtOH/EAU/TFA (v/v/v) avec 10mM/L de citrate d'ammonium

Le graphe 2 présente l'évolution de rapports Signal/Bruit en fonction de la masse du peptide considéré pour chaque préparation de matrice, le peptide étant à la concentration de 100fmol/ μ L. Pour les masses inférieures à 1200 Da, les rapports restent supérieurs à 100 quelle que soit la préparation utilisée. En revanche, il apparaît une nette différence entre la préparation en EtOH et la préparation en AcN. En effet, pour les deux peptides les plus lourds, le signal est quasiment perdu en EtOH alors qu'en AcN, les rapports S/B restent au moins supérieurs à 30. Ceci pourrait s'expliquer par une meilleure dissolution des gros peptides dans l'AcN. En ce qui concerne le citrate d'ammonium, aucune amélioration significative n'est notée, les conditions d'analyse préférentiellement utilisées ont donc été DHB dilué à 5mg/ml dans un mélange AcN/EAU/TFA sans additif.



Graphe 2 : Comparaison des conditions de préparation de la DHB

Évaluation des différents supports chromatographiques

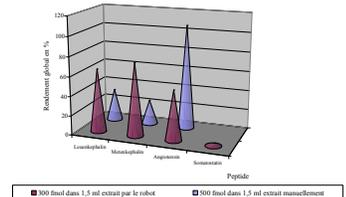
Pour évaluer les meilleures conditions de lavage et d'éluion, nous avons comparé les rendements d'extraction cumulés sur les différents spots (nous avons généralement élué 1 μ l par 1 μ l). Les protocoles optimisés en mode manuel et en mode robotisé sont les suivants :

Mode manuel	Mode robotisé
Support Phase Oligo R3	Support Zip-Tip μ C18
Agitation 1400tr/min pdt 1/2heure	300 aspirations/refoulements
Lavage AF 1%	Lavage AF 1%
Éluion : 8*1 μ l AcN/EAU/AF 80/20/0,2 avec 5mg/ml de DHB	Éluion : 2*1 μ l AcN/EAU/AF 80/20/0,2
	Analyse : 1 μ l DHB 5mg/ml dans AcN/EAU/TFA 20/80/0,1

Les protocoles manuel et robotisé ont alors été comparés :

Le protocole robotisé nous permet d'obtenir une meilleure sensibilité puisque 4 neuropeptides sur 6 sont détectés après reconcentration de 300 fmol initiales alors que le protocole manuel ne nous permet de détecter que 3 des 6 neuropeptides à partir 500fmol initiales. De plus nous avons fait face à des problèmes de polymère contaminant les spectres avec le protocole manuel : le plastique des microtubes devait probablement passer en solution durant l'étape d'agitation d'1/2 h. Ce problème a été résolu grâce au protocole robotisé puisque l'étape d'agitation des tubes est supprimée.

Enfin, le mode robotisé nous permet un gain de temps important : 4 échantillons sont traités simultanément en 20min. Il faut une heure pour un échantillon en mode manuel !



Application à des échantillons biologiques

Le protocole manuel a été appliqué à des surnageants (500 μ l) de tranches de cerveau de rat ayant subi des excitations électriques. Les surnageants ont tout d'abord été acidifiés au pH 2-3 par du TFA afin de permettre une meilleure fixation. Les spectres obtenus par application du protocole manuel préalablement décrit ne nous a pas permis d'obtenir une cartographie peptidique dans la mesure où les problèmes de plastique ont persistés (voir Spectre 1).

L'application du protocole robotisé à 300 μ l de surnageant d'une tranche de cerveau de rat conservé dans le PBS depuis un an et acidifié à pH 2-3, nous a permis de reconstruire des peptides endogènes et d'obtenir une cartographie peptidique ce qui valide notre approche. Cependant, le MALDI ne permet pas d'identifier les molécules relarguées : nous avons donc utilisé par la suite la spectrométrie de masse en tandem de type Q-TOF pour obtenir des informations de séquence (voir Spectre 2).

Nous avons analysé en nanoESI-Q-TOF MS/MS un éluat de 4 μ l de l'application du protocole robotisé à une solution de PBS du même type que la précédente. Après un spectre MS simple, nous avons sélectionné les précurseurs bichargés les plus intenses. Parmi ceux-ci, le précurseur de masse 907,35Th a été identifié par le logiciel Mascot (Matrix Science) comme un peptide issu de la dégradation de la tubuline β 5 de *Mus Musculus* : le peptide identifié est TAEEEDDFGEAEAEA (voir Spectre 3). Il correspond à l'extrémité C-terminale de la séquence de la tubuline. Comme on peut le voir sur le spectre, tous les pics sont attribués et la séquence complète est donnée à la fois par les fragments bn et yn. Les autres spectres n'ont pas pu être interprétés par Mascot et ne correspondent pas à des protéines répertoriées dans les banques. Cependant une interprétation manuelle nous a permis d'obtenir des morceaux de séquences qui présentent des similitudes avec le peptide TAEEEDDFGEAEAEA. Il est donc probable que certains précurseurs sélectionnés correspondent à d'autres peptides de la tubuline. Ceci n'est pas étonnant puisque cette protéine est une protéine majoritaire du cytosquelette. Lors du découpage de la tranche, des cellules sont lysées et peuvent des protéases qui ont induit une dégradation de la tubuline.

Conclusion-Perspectives

Nous avons dans un premier temps optimisé l'analyse MALDI des neuropeptides en choisissant la matrice et les conditions de préparation les mieux adaptées.

Dans un deuxième temps, différents supports chromatographiques ont été évalués pour réaliser l'étape d'extraction sur phase solide à la fois en mode manuel et en mode robotisé. A une extraction longue et fastidieuse en mode manuel, nous avons préféré l'extraction en mode robotisé plus sensible (reconcentration jusqu'à 200amol/ μ L). De plus, le protocole robotisé nous a permis de supprimer les problèmes de contamination gênant lors de la manipulation manuelle.

L'application du protocole robotisé à des échantillons biologiques nous a permis de mettre en évidence la libération de peptides biologiques mais pas de neuropeptides endogènes. L'analyse de ceux-ci n'est donc pas totalement mise au point. Notamment il pourrait être intéressant de soumettre les tranches de cerveau à l'application de drogues afin de favoriser la libération de neuropeptides. Des protocoles d'extraction par du méthanol ou des solutions très acides sont envisagés. D'autre part, l'analyse MS doit être améliorée. En effet, le spectre MS simple du mélange analysé était très complexe, il aurait pu être intéressant de simplifier le mélange par une étape préalable de chromatographie. Ainsi, plus d'espèces auraient pu être concentrées et fragmentées et notamment les espèces minoritaires parmi lesquelles les neuropeptides. De plus à cause de cette complexité, il était très difficile de sélectionner un seul et unique précurseur pour la fragmentation, ce qui a rendu l'interprétation des spectres plus difficile. L'utilisation d'un appareil de haute précision et de haute résolution tel que le FTICR disponible au laboratoire (LTQ-FT Thermo Finnigan) permettrait de pallier à ce problème.