

# Analyse protéomique à l'aide d'un spectromètre de Masse FTICR (LTQ-FT) : Exemples d'applications biologiques

P. Marcelo<sup>1</sup>, J. Mary<sup>2</sup>, A. Margeot<sup>3</sup>, V. Labas<sup>1</sup>, J. Rossier<sup>1</sup> & J. Vinh<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> UMR 7637 CNRS/ESPCI - Unité de Neurobiologie & Diversité Cellulaire - 10 rue Vauquelin, 75231 Paris cedex 05

<sup>2</sup> Laboratoire de Biologie et Biochimie Cellulaire du Vieillessement Université Paris 7 - Denis Diderot - 2, place Jussieu - 75251 Paris Cedex 05

<sup>3</sup> CNRS UMR8541 - Régulation de l'expression génétique - Ecole Normale Supérieure - 46 rue d'Ulm 75230 Paris Cedex 05

## INTRODUCTION

Dans les systèmes biologiques, les mélanges protéiques posent un problème du point de vue analytique à cause de leur complexité, de la variabilité de leur gamme d'abondance ainsi que des différents états de modification des protéines présentes. L'arrivée de techniques appropriées a permis à la spectrométrie de masse de devenir l'un des outils de choix pour les analyses biochimiques fournissant des possibilités pour l'identification de ces protéines. A ce titre, la spectrométrie de masse de résonance cyclotronique par transformée de Fourier (FTICR-MS) est un outil très puissant pour répondre à cette demande. Elle offre de plus une haute sensibilité et une gamme dynamique étendue<sup>1</sup> ce qui permet donc une caractérisation fine des protéines ou peptides purifiés<sup>2</sup> ou en mélanges complexes<sup>3</sup>. Nous présentons ici quelques aspects de l'apport de cette technologie en utilisant deux exemples biologiques très différents.

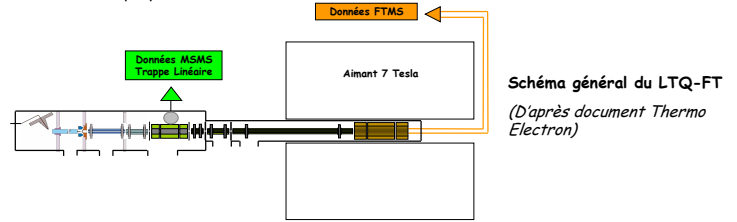
Le premier exemple biologique a pour but d'analyser les états d'oxydation de la calmoduline (CaM) *in vitro*. En effet, lors d'une infection par *Bordetella pertussis*, qui est l'agent pathogène responsable de la coqueluche, une toxine bactérienne, similaire à l'adénylate cyclase (A.C.), se lie à la CaM provoquant une synthèse importante d'AMPc. *In vivo*, cette toxine, par son interaction spécifique avec l'intégrine CD11b/CD18, cible principalement les cellules phagocytaires provoquant un phénomène d'oxydation intracellulaire *via* la production de composés oxygénés.

Le second exemple biologique a pour but d'analyser la séquence de la protéine mitochondriale ATP2 de levure afin de mettre en évidence des motifs impliqués dans son adressage dans la mitochondrie.

## MATERIEL ET METHODES

La CaM a été préparée selon le protocole publié par Vouquier et al<sup>4</sup>. Les bandes de gel SDS-PAGE correspondant à la protéine mitochondriale de levure ATP2 ont été digérées par la trypsinne selon le protocole de Shevchenko<sup>5</sup> et adapté (voir poster N. Royer).

Les différents échantillons biologiques ont été analysés par infusion directe, avec un capillaire métallisé (Proxeon), à l'aide d'un spectromètre de masse FTICR couplé à une trappe linéaire (LTQ-FT, Thermo Electron) ou avec un spectromètre hybride de type QTOF (QToF2, Waters), équipés d'une source nanospray

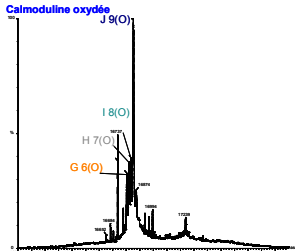


Les données brutes sont traitées par le logiciel Bioworks® (Thermo Electron). La confrontation des données expérimentales et théoriques est réalisée à l'aide du logiciel de recherche Sequest® (Thermo Electron) et de la banque SwissPROT.

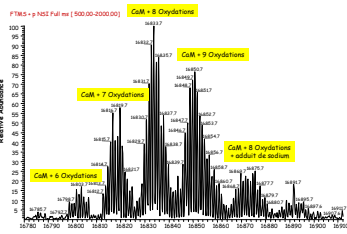
## RESULTATS

### INFLUENCE DE LA RÉOLUTION ET DE LA PRÉCISION DE MESURE SUR LA CARACTÉRISATION DES ÉTATS D'OXYDATION

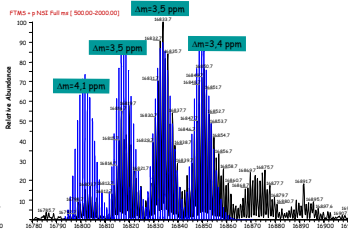
Analyse d'une protéine entière



Spectre nanoESI déconvolué après analyse en QTOFMS de la protéine entière. Pas de résolution isotopique, erreur environ 200 ppm, présence d'adduits de sels Na<sup>+</sup>.



Spectre nanoESI déconvolué après analyse en FTMS de la protéine entière. Résolution isotopique à 16kDa, identification des états d'oxydation et des adduits.



Reconstitution avec le logiciel freeware Molecular Weight Calculator 6.3, Matthew Monroe. Précision de mesure sur le spectre déconvolué: 4 ppm

La caractérisation de modifications sur les protéines entières nécessite une bonne résolution afin de séparer toutes les isoformes en présence et une bonne précision de mesure de masse pour déterminer la nature de ces modifications.

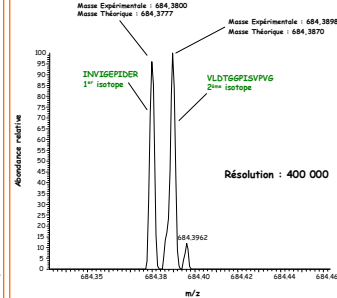
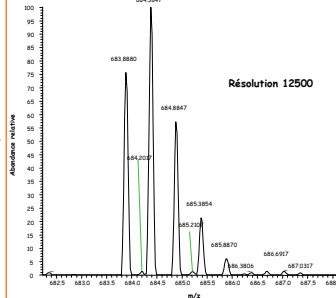
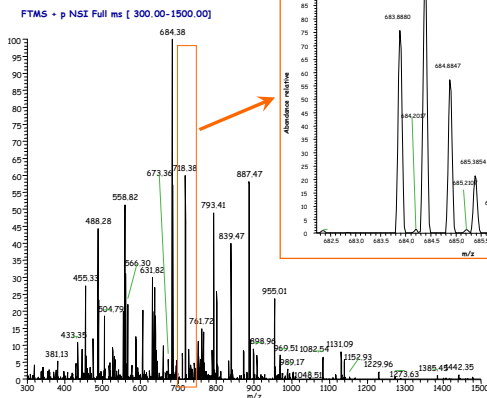
La contamination des échantillons protéiques par des tampons non volatils induit notamment la formation de nombreux adduits qui viennent se superposer au signal et « diluent » les espèces dans différents états d'ionisation à état de charge donné.

Dans cet exemple, il était ainsi difficile de conclure sans ambiguïté quant à la présence des niveaux d'oxydation élevés sans une très haute résolution et une bonne précision.

### INFLUENCE DE LA RÉOLUTION ET DE LA PRÉCISION DE MESURE SUR UN LA FIABILITE D'IDENTIFICATION DES PROTEINES APRES PROTEOLYSE

Analyse d'un mélange peptidique

FTMS - p NSI Full ms [ 300.0-1500.00]



Masses théoriques  
 > 1367.7529 : INVIGEPIDER (128-139) 1<sup>er</sup> isotope,  
 > 1366.7688 : VLDTGGPISVPVG (109-122) 1<sup>er</sup> isotope,  
 > 1367.7714 : VLDTGGPISVPVG (109-122) 2<sup>ème</sup> isotope.

Filter: none	Reference	Score	Accession	Peptides (MS)					
Scans	Sequence	MBI	Charge	XC	Delta Cn	Sp	RSp	Ions	Count
#1	11619-ATPase complex beta subunit, mitochondrial	18.3						822581	2 (5 1 1 1 1)
2-45	INVIGEPIDER	1367.7535	2	3.281	0.529	721.3	2	1622	1
2-45	IKVLDTGGPISVPVG	1366.7694	2	3.867	0.152	1723.4	1	2208	1
#2	ATP9_YEAST							11676	2 (5 1 1 1 1)
2-45	INVIGEPIDER	1367.7535	2	3.281	0.529	721.3	2	1622	1
2-45	IKVLDTGGPISVPVG	1366.7694	2	3.867	0.152	1723.4	1	2208	1

Les peptides issus de la digestion de la bande de gel SDS-PAGE ont été analysés par spectrométrie de masse FTICR.

Une première analyse en mode MS à une résolution moyenne (12500) de type appareil hybride Q-TOF nous montre que le profil isotopique de l'espèce à 1366 Da n'est pas conforme à celui théoriquement attendu pour un peptide dans cette gamme de masse.

Une seconde analyse en mode MS à haute résolution (400000) a permis de résoudre deux isotopes distants de 0.0185 u à la masse 1367.7. Les deux précurseurs ainsi isolés ont été sélectionnés ensemble à l'aide de la trappe linéaire pour analyse de séquence par fragmentation en mode MS/MS. Le logiciel Sequest® a permis d'identifier deux peptides différents appartenant à la protéine ATP2 de levure dont les spectres MS/MS étaient superposés. Cet exemple montre donc que la haute résolution et une précision de masse élevée (0,5 ppm) permettent une augmentation de la couverture de séquence puisque 2 nouveaux peptides ont été caractérisés, et une identification plus fiable de cette protéine.

## CONCLUSION

Le couplage trappe linéaire-FTICR (tel que le LTQ-FT) est une configuration qui permet d'atteindre une haute résolution et une très bonne précision de masse ainsi qu'une bonne sensibilité. Il fait partie de la dernière génération de spectromètres de masse accessibles aux massistes non spécialistes en FTICR MS, notamment pour les applications protéomiques comme le montrent les deux exemples cités précédemment, tout en bénéficiant des performances de ce type d'appareil.

La rapidité de balayage et d'obtention de spectres MS/MS par fragmentation hors cellule FT nous a par ailleurs permis de le coupler directement à différentes chaînes nanoHPLC (LC-Packings, Dionex; ou Ettan MDLC Amersham par exemple)

L'analyse des données générées par ce type d'appareil nécessite néanmoins un système de traitement des données dimensionné de façon conséquente, et des suites logicielles adaptées. Ce type d'appareil peut avoir de multiples applications non seulement dans l'analyse protéomique et peut également s'avérer un outil intéressant dans les domaines diagnostique et clinique ainsi que dans le domaine environnemental.

## Références

- 1- Page J.S. *et al. Curr Opin. Biotech.* 2004, 15 : 3-11.
- 2- Bruce J.E. *et al. Anal Chem.* 1999, 71 : 2595-2599.
- 3- Shen Y. *et al. Anal Chem.* 2004, 76 : 144-154.
- 4- Vouquier S. *et al. J. Biol. Chem.* 2004, 29 : 30210-30218.
- 5- Shevchenko A. *et al., Anal Chem.* 1996, 68 : 850-858.