



Protéomique

P6-001

Etude de la sulfatation de peptides par spectrométrie de masse

Agathe Sordoillet(1) • Ouafa Zerzaibi(1) • Aurélie Cornut-Thibaut(1) • Frédéric Delolme(1)

Isabelle Zanella-Cléon(1) Nathalie Enjolras(2) • Michel Becchi(1)

(1)CCMF, spectro. de masse, IFR128, IBCP, Univ. de Lyon • (2)IFR62-Labo. d'Hémostaseologie EA4374, Fac. de Médecine Laennec, Univ. de Lyon

La sulfatation est la modification post-traductionnelle la plus répandue des résidus Tyrosine, elle intervient presque exclusivement sur les protéines sécrétées et les protéines transmembranaires [1].

La sulfatation des Tyrosines est délicate à caractériser dans les conditions classiques de l'analyse protéomique : étude des ions positifs produits à partir des peptides tryptiques en LC/MS/MS, soit en ligne par Électrospray ou hors ligne en MALDI-ToF-ToF. Dans ces conditions, le peptide sulfaté sur la Tyrosine est indétectable : seul l'ion avec la perte de SO₃ est observé.

La détection des peptides sulfatés a été réalisée en MALDI-ToF et en mode négatif. Pour nos essais, nous avons utilisé le fragment 54-65 de l'Hirudine, acétylé en N-terminal et sulfaté sur la Tyr68. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la matrice 2',4',6'-trihydroxy-acetophenone en présence de citrate d'ammonium. Cette matrice est beaucoup plus efficace pour obtenir l'ion [M-H]⁻ et minimiser la formation de [M-H-SO₃]⁻ que la matrice DHB (acide 3,5-dihydroxy benzoïque), évaluée récemment comme la plus performante [2].

Le repérage des peptides sulfatés sur la Tyrosine se fait en comparant les spectres MALDI mode positif et mode négatif : dans le premier cas les ions [M+H-SO₃]⁺ sont observés alors que dans le deuxième cas ce sont les ions [M-H]⁻. Pour simplifier cette analyse, un enrichissement des peptides sulfatés est nécessaire lorsqu'on étudie des mélanges plus ou moins complexes. Cet enrichissement a été réalisé sur des supports oxyde de Titane et oxyde de Zirconium.

Cette méthode d'étude a permis de mettre en évidence une sulfatation du peptide [192-226] du facteur IX de coagulation (P00740).

[1] E. Montgatti, B. Hekking and H. Steen, *Biochim. Biophys. Acta* (2006), vol. 1764, 1904-1913.

[2] S.T. Drake and G.L. Hortin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2010), vol. 42, 174-179.

Quantification par spectrométrie de masse d'isoformes de transporteurs membranaires chez *Arabidopsis thaliana*

Madeleine Sugano • Jean-Marc Monneuse • Thierry Bécue • Michel Rossignol

Laboratoire de Protéomique Fonctionnelle, INRA UR1199, Montpellier, France.

Chez les végétaux, l'expression des transporteurs membranaires est régulée par la disponibilité des nutriments. Ces transporteurs font tous partie de familles multigéniques qui présentent de très fortes homologies de séquence, interdisant fréquemment l'utilisation d'approches immunologiques pour les identifier ou les quantifier. Parmi eux, la sous-famille des PIPs (Plasma membrane Intrinsic Proteins) assure le transport d'eau à travers la membrane. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, cette sous-famille compte 13 isoformes qui présentent de plus des spécificités d'expression tissulaire.

L'objectif du projet est de mettre en place une démarche d'identification et quantification des isoformes des transporteurs majeurs localisés au niveau de la membrane plasmique. Dans une étape-pilote, l'approche a été limitée aux PIPs. La démarche retenue repose sur l'utilisation de la spectrométrie de masse en mode MRM. En aval de la purification des protéines (PAGE-SDS sur fractions enrichies de membrane plasmique débarrassée des protéines extrinsèques), l'approche proposée comprend :

- l'identification et la sélection de peptides protéotypiques présentant des transitions intéressantes pour l'approche MRM,
- la synthèse de variants lourds de ces peptides (externalisée),
- l'optimisation de leur conditions de fragmentation (Potentiel de déclusterisation, Energie de collision, Dwell Time etc...),
- l'établissement des courbes de réponses (analyse semi quantitative - estimation)
- et l'établissement des gammes (peptides légers / peptides lourds) pour quantifier l'abondance des protéines correspondantes dans les échantillons d'intérêt.

Le travail a été réalisé sur un spectromètre hybride Q-TRAP 4000 couplé à une nano-LC HPL200. Il a permis la construction d'une ressource dédiée aux canaux à eau de la membrane plasmique d'*Arabidopsis* et d'étudier leur variations d'expression selon leur origine tissulaire ou les conditions environnementales.

Cette approche-pilote ouvre la voie à l'étude des réponses coordonnées d'autres familles de transporteurs primaires ou secondaires.

P6-003

Protéomique de la muqueuse intestinale : double approche et analyses Mascot vs. Omssa

Veronique Delval-Dubois(1,2) • Christine Schaeffer(1,2) • Alain Van Dorsselaer(1,2) • Fabrice Bertile(1,2)

(1)Université de Strasbourg, IPHC-D5A, LSMBD, LCASS 2, Strasbourg • (2)CNRS, UMR 7178, Strasbourg, France

De nombreux désordres métaboliques impliquent la muqueuse intestinale. Afin d'étudier son protéome chez le rat, nous avons développé une double approche protéomique à partir d'un même échantillon (2DE et 2D-LC couplés à des analyses MS/MS).

Après broyage à froid, et extraction en milieu acide, 2 fractions ont été obtenues par centrifugation. La fraction « surnageant » a été fractionnée par SPE ou ultrafiltration (UF)+SPE, puis par 2D-LC (RP pH10xRP pH3). La fraction « culot » a été séparée par 2DE. Après digestion trypsique, les peptides ont été analysés par nanoLC-Chip-MS/MS. L'identification des protéines (target-decoy) a été réalisée à l'aide de 2 moteurs de recherche; Mascot et Omssa.

L'application de filtres stringents d'identification (Scaffold) aux résultats Mascot puis Omssa a permis d'identifier ~900 et ~1000 protéines uniques, respectivement. ~700 protéines étaient communes aux 2 moteurs de recherche. L'application des filtres stringents aux résultats combinés Mascot+Omssa a permis d'identifier ~900 protéines uniques, validant ainsi ~28% de protéines uniques supplémentaires par les 2 moteurs de recherches. Les approches UF-SPE+2D-LC, SPE+2D-LC et 2DE (192 spots excisés) ont permis d'identifier ~300, ~700 et ~200 protéines, respectivement (données Mascot+Omssa). Ces résultats étaient complémentaires, 11% de protéines uniques supplémentaires étant identifiées après UF-SPE+2D-LC, 51% après SPE+2D-LC et 13% après 2DE.

Les protéines identifiées sont impliquées dans le métabolisme des glucides, lipides... Combinée à la quantification des protéines par MS, cette stratégie permettra d'étudier les mécanismes moléculaires de la muqueuse intestinale en réponse à des désordres métaboliques.

Caractérisation d'un peptidome : Préparation d'échantillon et identification par spectrométrie de masse

Bich C.(1) • Chambon C.(1) • Viala D.(1) • Sayd T.(2) • Guillot A.(3) • Remond D.(4) • Pujos-Guillot E.(1)

(1)Plateforme d'Exploration du Métabolisme (PFEM), INRA Clermont-Ferrand-Thiers • (2)QuaPA, BPM, INRA Clermont-Ferrand-Thiers

(3)Plateforme d'Analyses Protéomique de Paris Sud-Ouest (PAPPSO), INRA Jouy-en-Josas • (4)UNMP, INRA Clermont-Ferrand-Thiers

L'étude du peptidome associé à un protéome est essentielle pour avoir une vue d'ensemble de la partie potentiellement bio-active d'une matrice biologique. En effet, de plus en plus de résultats démontrent les effets physiologiques de certains peptides sur l'activité du tractus digestif ou d'autres fonctions physiologiques (activité antihypertensive, opioïde, immunomodulatrice, anxiolytique). Néanmoins, appréhender le peptidome d'une matrice biologique reste un challenge car la fraction peptidique est mélangée avec une quantité importante d'autres molécules et principalement avec les protéines qui sont très majoritaires. Le but de cette étude est de mettre au point une préparation d'échantillon rapide permettant d'éliminer au maximum les protéines tout en conservant un peptidome suffisamment pertinent et reproductif pour pouvoir servir, après identification par spectrométrie de masse, d'empreinte pour des études de comparaison peptidomique dans le sang mais aussi dans le tractus digestif (cinétique de digestion par exemple).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux peptides présents dans le sérum et plasma. Ainsi pour étudier ces peptides, différentes techniques d'extraction ont été testées afin de mettre en place une méthode simple et efficace. La précipitation des protéines par un solvant organique tel que l'acétonitrile ou le méthanol a été expérimentée : cette technique s'est révélée rapide et efficace mais le peptidome obtenu plutôt limité (faible nombre de peptides identifiés). D'autres méthodes nécessitant un temps de préparation plus long sont néanmoins apparus tout aussi efficace en terme d'élimination des protéines et ont permis l'accès à la caractérisation d'un plus grand nombre de peptides. C'est le cas notamment des cartouches de phase solide stationnaire de type SPE, OASIS (Waters) ou encore de billes poreuse en silice, MCM41 (Sigma-Aldrich).

La séparation et caractérisation des peptides récupérés lors de ces phases de purification ont été réalisées par LC-MS/MS. Deux types d'instruments ont été utilisés, une trappe 3D (LCQDeca) et une trappe linéaire associée à un analyseur orbitrap (LTQ Orbitrap)

Les premiers résultats obtenus sur des échantillons de plasma de mini « pig » montrent que les différentes techniques d'extraction testées permettent, à différents

degrés, d'identifier un peptidome. Cependant, le nombre de peptides identifiés par LTQ orbitrap, bien qu'en accord avec la littérature, reste peu élevé (entre 30 et 50) et provient majoritairement d'une activité protéasique sur les protéines majoritaires du plasma. Ainsi, d'autres protocoles de préparation et d'identification seront présentés afin d'avoir un pool de peptide le plus exhaustifs possible pour entreprendre dans un second temps des comparaisons d'empreintes et la mise en évidence de marqueurs peptidiques d'intérêts.

Alpha-N protein acetylation: A N-terminal modification of increasing interest

W. Bienvenut(1,2) • A. Martínez(1) • D. Sumpton(2) • S. Lilla(2) • T. Meinnel(1) • C. Giglione(1)

(1)CNRS, Campus de recherches de Gif, Gif-sur-Yvette, France • (2)Beatson Institute for Cancer Research, Switchback road Glasgow, UK

Thanks to the improvement of genome sequencing and recent large scale studies, thousands of proteins and post-translational modifications (C-PTM) are now easily accessible. Thus, proteomics is reaching a new challenge with the determination of their influences in protein interaction or signalling. Nowadays, alpha-N protein acetylation (NTA) is a new subject of interest since it occurs on 50-70% of the whole proteome and has been linked to protein stability.

A previous N-term acetylated peptide enrichment method(1) have been modified and applied to few organisms e.g., *D. discoideum* and *A. thaliana*. These analyses reveal hundreds of new NTA proteins. Furthermore, an additional step, applied for protein in vitro acetylation, unravel in vivo protein acetylation level using stable isotope labelling. This additional step supplied lists of non-NTA proteins. These data are crucial for the development of prediction tools such as Terminator(2) and allowed to improve its specificity.

Despite N-terminal acetylation has been considered to be irreversible and total, this work and a recent study(3) tends to give new light on this hypothesis. Indeed, this approach visualised and quantified the level in vivo acetylation that is a new aspect of this key co-translational modification. Data collected through these experiments will be detailed and the results related to partial NTA will be shown and discussed.

(1) Kapor et al., *Proceedings of the 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Seattle, WA, May 27-June 2, 2006

(2) Martínez et al., 2008, *Proteomics*, 8, 2809-31

(3) Arnesen et al., *PNAS* 2009 106(20):8157-62

Analyse protéomique et peptidomique de la borréliose de Lyme

A. Boeuf(1) • V. Delval(1) • A. Kern(2) • B. Jaulhac(2) • N. Boulanger(1) • L. Sabatier(1)

(1)Département des Sciences Analytiques, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg • (2)Physiopathologie et médecine translationnelle / groupe borréliose de Lyme, Facultés de pharmacie et de médecine, Strasbourg

La borréliose de Lyme est une infection bactérienne due à *Borrelia burgdorferi* sensu lato et transmise à l'hôte (animal, homme) par piqûre de tique du genre *Ixodes*. La salive de tique, a un rôle essentiel dans la transmission de l'infection. Il a notamment été montré que des extraits de glandes salivaires ont un effet immunorégulateur en inhibant la réponse inflammatoire des kératinocytes, notamment la sécrétion de peptides antimicrobiens[1]. Dans ce contexte, notre problématique est de déterminer quelles molécules présentes dans la salive de tique possèdent un pouvoir immunomodulateur. Pour cela, la première étape a été de mettre au point, sur de faibles quantités de matériel biologique, une méthode d'analyse par RP-HPLC, MS et MS/MS des molécules présentes dans des extraits de glandes salivaires. La seconde étape a été de réaliser des analyses différentielles entre des tiques *Ixodes ricinus* infectées ou non par *Borrelia*. La caractérisation des molécules induites est en cours ainsi que l'étude de leur effet sur la réponse immunitaire innée de la peau.

Un second aspect du travail consiste à développer une stratégie de diagnostic précoce par spectrométrie de masse. Une première étape de détermination de molécules cibles est en cours avant la mise au point de leur détection par spectrométrie de masse MRM. A terme un système d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI-IMS sera développé pour identifier et localiser des molécules cibles directement au niveau cutané.

[1]Marchal CM, Luft B, Yang X, Sibilia J, Jaulhac B, Boulanger NM, 2009, *Defensin is suppressed by tick salivary gland extract during the in vitro interaction of resident skin cells with Borrelia burgdorferi*, *J Invest Dermatol.*, 129(10), 2515-7.

Data Dependant Acquisition optimization on a Q-TOF instrument for proteomic applications

Colas Cyril • Barthelemy Nicolas • Carapito Christine • Husser Chrystel • Schaeffer Christine • Van Dorsselaer Alain
Université de Strasbourg, IPHC, Strasbourg, France & CNRS, UMR7178, Strasbourg, France

Because of the stochastic behaviour of the nanoLC-MS/MS experiments, the number of peptides usually identified by MS/MS is lower than that eluted from the chromatography. To increase the number of identified peptides, a Data Dependent Acquisition (DDA) mode for LC-MS/MS analyses has been introduced by manufacturers.

This DDA mode depends on several parameters, which can be optimized to improve identification rates of peptides.

We present here a method which allows optimizing the DDA parameters on a nanoUHPLC coupled to a recent Q-TOF instrument. This method takes into account the results of a previous study which showed the critical influence of the chromatographic gradient slope as well as scan times [1]. We determined the best optimization sequence of the different parameters and explained how they were set to their optimal value.

First, the chromatographic gradient time and slopes were optimized to obtain the maximum peak capacity with a constant peak width during the whole run. Transmission parameters of the mass spectrometer were adjusted for a wide range of m/z (50-2200). Then the DDA parameters were step-by-step optimized in the following order: collision energies depending of m/z and charge state, MS scan time and threshold for selection of precursor ions prior to MS/MS, time of exclusion for precursor ions, regulation of MS/MS scan time according to MS intensities (a specific functionality of Bruker's Q-TOF mass spectrometer), and finally the number of precursors.

This optimized set of parameters was first tested on 1mm 1D gel bands of a yeast tryptic digest. With these optimized parameters, the number of identified peptides was increased by about 25% compared with the results obtained with the standard parameters. As a consequence, the number of identified proteins was increased by 10%.

On a much complex sample (whole yeast tryptic digest), the optimized parameters increased the number of identified proteins, for which a significant increase in sequence coverage was obtained.

[1] BARTHELEMY *et al.*, 58th ASMS, 2010, Salt Lake City.

Kinetic proteomic analysis of *Deinococcus deserti* recovering from γ -irradiation

A. Dedieu(1) • P. Guérin(1) • E. Sabinovic(1) • B. Meunier(2) • A. de Groot(3) • J. Armengaud(1)

(1)CEA, DSV, iBEB, Lab Biochim System Perturb, Bagnols-sur-Cèze, France • (2)INRA, UR1213 Herbivores, DIMA/C2M, Saint-Genès-Champagnelles, France • (3)CEA, DSV, iBEB, SBVME, Lab d'Ecologie Microbienne de la Biosphère et d'Environnements extrêmes, St Paul-les-Durance, France.

Deinococcus deserti VCD115 (1) belongs to a group of extremely radiotolerant bacteria. It has been isolated from surface sand of the Sahara. Like gamma radiation, the harsh conditions (desiccation, UV) in this specific environment result in numerous double-strand breaks at the chromosome level. The bacterium is able to repair these damages in a few hours. Its genome sequence has been determined and consists of a 2.8-Mb chromosome and three large plasmids of 325kb, 314kb, and 396kb. A proteogenomic strategy has been applied in order to perform its accurate annotation (1-2).

DNA repair mechanisms have been extensively studied with the *Deinococcus radiodurans* model. To learn about the specificities of DNA repair mechanisms of *D. deserti*, we performed a kinetic proteomic analysis after exposure to 3 kGy γ radiation. We analyzed the proteome with a 2-D gel approach. A hierarchical clustering analysis pointed at proteins of interest that are overproduced at the earliest stages after irradiation. Among the different clusters obtained, three were selected that gather proteins induced at early time after irradiation. One of these clusters contains proteins over-expressed from 2 hours after irradiation and in particular Deide02990 (DdrB), Deide00120 (SSB), DeideP201380 (PprA), Deide15490 (GyrB, DNA gyrase, subunit B), and two different RecA proteins (DeideP101260 and Deide19450). All these proteins are clearly involved in DNA protection or repair. Four additional proteins belong to this group: Deide12520 (DNA gyrase, subunit A) and Deide20140 (GCN5-related N-acyltransferase), Deide19260 (Candidate Twitching mobility protein), Deide21840 (candidate single-stranded DNA-binding protein).

Some of these proteins could be specific for damage recovery in *Deinococcus deserti*.

(1) de Groot, A., Dulermo, R., Ortet, P., Blanchard, L., Guerin, P., Fernandez, B., Yacberie, B., Dossat, C., Jolivet, E., Signier, P., Candler, M., Barakat, M., Dadien, A., Barbe, V., Heulin, T., Sommer, S., Azbouak, W., and Armengaud, J. (2009) Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium *Deinococcus deserti*. *PLoS Genet* 5, e1000434.

(2) Baidet, M., Ortet, P., Gailland, J. C., Fernandez, B., Guerin, P., Esjalbal, C., Subra, G., de Groot, A., Barakat, M., Dedieu, A., and Armengaud, J. (2010) Proteomics-based refinement of *Deinococcus deserti* genome annotation reveals an unsuspected use of non-canonical translation initiation codons. *Mol Cell Proteomics* 9, 415-426.

Préparation d'échantillons pour l'analyse des N-glycanes en mode MALDI-TOF - Applications à la caractérisation de glycoprotéines vaccinales

S. Vialle • J. Dubayle • P. Talaga

Samofi pasteur, Campus Mérieux, Recherche Biochimie, Marcy l'Étoile, France

La glycosylation des protéines, caractéristique des cellules eucaryotes, est la plus répandue et la plus complexe des modifications post-traductionnelles. La glycosylation participe à la mise en conformation, à la stabilité ainsi qu'à la solubilité de la protéine, mais également à sa protection contre la dégradation, à la reconnaissance cellulaire et moléculaire, à la croissance et à la communication entre cellules. Cette glycosylation est dépendante du système d'expression et des conditions de culture.

La spectrométrie de masse est une technologie de choix pour la caractérisation de la glycosylation. Le mode MALDI-TOF, facile et rapide à mettre en œuvre produit des profils glycaniques caractéristiques de cette glycosylation. (1)

La biosynthèse d'une glycoprotéine aboutie à un mélange de glycoformes possédant des glycosylations variées. La N-glycosylation est la plus répandue. Il existe 3 familles de N-glycanes : les oligomannoses, les glycanes de type hybride et de type complexe. Ils possèdent tous un noyau trimanosylchitobiose commun et se différencient par leurs décorations.

Les glycoprotéines possèdent un taux de N-glycosylation variable et certains composés tels que les protéines, sels ou détergents peuvent perturber l'analyse en mode MALDI-TOF, ce qui nécessite une mise au point importante de la préparation de l'échantillon.

Notre étude a donc porté sur les conditions de déglycosylation, la préparation de l'échantillon et sur les méthodes d'analyses des glycanes neutres et chargés extraits de glycoprotéines vaccinales issues de particules virales ou de mélanges complexes obtenus après séparation sur gel SDS-PAGE.

Après dialyse et dénaturation thermique des échantillons, une déglycosylation à la PNGase F est réalisée. La déglycosylation est contrôlée par SDS-PAGE. Un traitement par micropurification sur phase stationnaire graphite et/ou échange d'ion est souvent nécessaire avant dépôt sur la cible. Les matrices utilisées sont l'ATT (6-Aza-2-ThioThymine) pour l'analyse des N-glycanes chargés et le DHB (acide 2,5 dihydroxybenzoïque) pour les N-glycanes neutres.

Ces traitements permettent d'obtenir des spectres présentant des massifs isotopiques de très bonne

qualité. Il est donc possible de définir précisément la composition glycanique et de déterminer l'hétérogénéité de celle-ci. L'attribution montre que ce sont essentiellement des N-glycanes de type complexe et oligomannose. Certains N-glycanes de type complexe peuvent posséder un résidu fucose et un ou plusieurs résidus d'acides sialiques. Le type oligomannose est représenté par une famille d'espèces composée de 5 à 9 résidus de mannose.

Le mode MALDI-TOF permet donc d'établir un profil glycanique précis de la glycoprotéine et de vérifier qualitativement la reproductibilité de la N-glycosylation selon le procédé de fabrication ou de purification utilisé.

(1) Haslam, S. M., North, S. J., et Dell A. (2006). Mass spectrometric analysis of N- and O glycosylation of tissues and cells. *Current Opinion in Structural Biology* 16: 584-591.

Découverte de nouvelles fonctionnalités pour la protéine Pat1 à l'aide de la spectrométrie de masse

Rachida Bahassou-Benamri, Anne-Hélène Davin, Jean-Charles Gaillard, Jean Armengaud, Christian Godon
CEA-Marcoule, DSV-IBEB-SFTN-LBSP, Laboratoire de Biochimie des Systèmes Perturbés, Service de Biochimie Post Génomique et Toxicologie Nucléaire, Bagnols-sur-Cèze cedex, France

Dans la cellule eucaryote, l'information génétique est stockée dans un compartiment essentiel, le noyau. Certaines protéines régulatrices du noyau - navigants entre le noyau et le cytoplasme - sont inactivées par localisation cytoplasmique. En réponse à une perturbation de l'environnement de la cellule, elles sont importées vers le noyau où elles vont déclencher la transcription de gènes qui contrôlent l'intégrité du génome. Nous avons entrepris une étude exhaustive de ces protéines afin d'identifier celles qui sont vitales dans la réponse aux stress induisant des dommages de l'ADN. L'une de ces protéines, Ycr077c de *Saccharomyces cerevisiae*, est décrite comme un activateur de la dégradation cytoplasmique des ARNs messagers. Nous avons démontré par une analyse en microscopie à fluorescence que cette protéine s'accumule au noyau après un stress UV. Par spectrométrie de masse, nous avons répertorié et quantifié les partenaires de cette protéine après purification sélective. Des changements importants du réseau d'interactions ont été notés en réponse au stress. De plus, nous avons détecté dans une région proche de l'extrémité C-terminale de la protéine Ycr077c, impliquée dans la navigation nucléocytoplasmique de celle-ci, des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation. Une analyse par nanoLC-MS/MS à l'aide d'un spectromètre de masse à haute résolution a été conduite et les modifications spécifiques recherchées à l'aide d'une liste d'inclusion ad hoc. L'ensemble de ces résultats mettent en exergue une nouvelle fonctionnalité pour cette protéine qu'il faut désormais caractériser.

Phosphoproteome analysis of Arabidopsis plasma membrane

Sonia Hem • Claude Nespolous • Edith Nicol • Valerie Rofidal • Michel Rossignol

Laboratoire de Protéomique Fonctionnelle, INRA, UR 1199, Montpellier

Phosphorylation is one of post translational modifications (PTM) the most involved in cell signaling and phosphoproteomics become the most appropriated way to investigate such a field of growing interest. Associated to the progress in enrichment strategies, the powerful of mass spectrometry allows large scale analysis, leading to generate protein data sets of still more big size (Lemmer 09). However despite such efforts and progresses, the available proteomes in plant are far to be as big as those for mammals and yeasts and began just to accumulate (Kersten 09), in particular for specific sub-cellular compartments. As interface between the cell and the environment, the plasma membrane (MP) is susceptible to accommodate early phosphorylation events and identification of the membrane-associated proteins is very important, since many of them play an crucial role in cellular function. Today four proteomic studies were carried out on this cell compartment (Nuhse 2004, 2007, Niittyla 2007, Benschop 2007), leading to a global proteome of about 1200 unique phosphopeptides described in the PhosPhAt data base. Here we propose a new proteome obtained using a different enrichment strategy in order to be complementary with the existing repertoires. In our experiments, phosphopeptides enrichment was performed using various combinations of SAX and TiO₂ micro-chromatographies. The mass spectrometry analysis was done using an 3D trap coupled to a nanoflow HPLC ChipCube. With this strategy, about 500 phosphorylation sites were identified. Emphasis will be given on the proportion of multiphosphorylated and phosphotyrosine peptides identified.

P6-012

Time-course Reproducibility of Clinical Samples using Retentate Chromatography MALDI-TOF Mass Spectrometry

S. Jourdain(1) • A. Bulman(2) • W. Passlack(3) • S. Hartwig(3) • A. Czibere(4) • S. Lehr(3) • F. Pflöws(2) • E. Dalmasso(2)

(1)Bio-Rad Laboratories, Division Bio-Recherche, Marnes la Coquette, France • (2)Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA • (3) Institute of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, German Diabetes Center, Düsseldorf, Germany • (4)Harvard Stem Cell Institute, Boston, MA, USA

Success for biomarker discovery projects in clinical proteomics relies primarily on analytical and long-term reproducibility. Sample management, protein preparation for high-throughput analysis and performance of analytical instrument can all contribute to output signal variability. In this study, we investigated day-to-day experimental variability in a biomarker discovery project performed using retentate chromatographic arrays and high performance MALDI-TOF instrumentation.

105 patient (plus one reference) serum samples were enriched in medium and lower abundance species using a bead-based combinatorial peptide ligand library: serum was incubated with ProteoMiner beads and retained proteins were eluted as one unique fraction. Aliquots of the enriched patient samples were bound in duplicate to arrays using 96-well bioprocessors. Three different surface chemistries were used to increase the number of proteins detected. After sample binding, the array surface was washed to remove non-specifically bound proteins, and SPA matrix added. Array preparation and MALDI-TOF data acquisition were organized over five days. For each tested condition, the reference sample was spotted on every other array and experimental variability was monitored using peak intensity CV data and principal component analysis.

Monitoring a reference sample throughout the experiment, we observed the array-to-array and day-to-day reproducibility of detectable proteins. Following data pre-processing and total ion current normalization, peaks within the mass range of 2.5 to 25 kDa with a minimum signal-to-noise ratio of 5 were automatically detected and clustered. Peak intensity CVs were calculated independently for each peak cluster and median CVs were calculated for all peaks within one array chemistry. The calculated median CVs were approximately 16% for each of the three array chemistries. Principal component analysis did not reveal any statistically significant clustering of the reference sample data based on the day of data acquisition and hence analytical bias was not introduced over the five day experimental time course.

Targeted Top-Down proteomic analysis of cerebrospinal fluid from Amyotrophic Lateral Sclerosis patients

M. Vilaseca(1) • C. Diema(1) • N. Omeñaca(1) • A. Campos(3) • E. de Oliveira(3) • M. Baumert(5) • K. Vlcek(5)
J. Guinovart(2) • J. Borg(4)

(1)Mass Spectrometry Core Facility, Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain • (2)Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain • (3)Proteomic Platform, Scientific Technical Services, Barcelona Science Park, Spain • (4)Faculty of Medicine Jacques Lisfranc, Jean Monnet University, Saint-Etienne, France • (5)Advion BioSciences, Harlow, Essex, UK

Introduction:

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects motoneurons in the spinal cord and brain. Diagnosis is achieved with clinical evaluation, as well as electromyography and neuroimaging. However, a significant number of patients are misdiagnosed or diagnosed after a long delay. Therefore, it is crucial to find potential biomarkers to improve early and reliable diagnosis. Previous studies have reported differentially expressed proteins in various neurodegenerative diseases, as well as posttranslational modifications (PTM). Using a Bottom-Up analysis and isobaric quantification of cerebrospinal fluid (CSF) from ALS patients, we recently identified a panel of differentially expressed proteins. In the present study we applied Top-Down proteomics to examine modifications of these proteins in CSF samples.

Methods:

Top-Down analysis was performed by online LC-nanoESI-MS coupling on a LTQ-FT Ultra (ThermoScientific) with simultaneous fraction collection using the Triversa Nanomate (Advion BioSciences). A BioSuite pPhenyl 1000 (Waters) 10µm RPC 2.0 x75 mm column with a 5-80% ACN gradient over 60 min (100 µl/min) was used for intact protein separations. Protein MS/MS analyses were performed off-line, using the Nanomate, by applying CID or ECD and/or IRMPD fragmentation in order to determine the molecular weight of a high number of protein fragments.

Complementary analysis of tryptic digested proteins of some of the fractions collected was performed by a Bottom-Up approach.

Top-Down and Bottom-Up data were processed with ProSightPC 2 and Sequest (Bioworks 3.2; Thermo Scientific), respectively.

Preliminary data:

We focused our Top-Down studies on a few proteins that were found to be differentially expressed, like microglobulin, which was down-regulated, or apolipoprotein, which was up-regulated in ALS samples compared to controls. Fractions of interest were analyzed at high resolution in full MS (R=100 000). CID was performed in the ion trap with fragment detection in the LTQ-FT. CID, ECD and/or IRMPD data were acquired

with 150-300 scans averaging in order to increase signal to noise ratio and to obtain more informative spectra. PTM isomers were also quantified by comparing the ratios of fragment ion abundance produced by MS/MS. Our data show several phosphorylation and methylation patterns for these potential biomarkers for ALS. More specifically, modified proteins were studied with the aim of using phosphorylation and/or other PTM as a diagnosis tool.

Novel aspect:

Implementation of Top-Down methodology for PTM pattern analysis of potential ALS biomarkers in CSF.

Protein identification with high sequence coverage achieved by a simple limited digestion method inducing miss cleavages.

Gabriel D Mazzucchelli • Nicolas Smargiasso • Marie-Alice Meuwis • Edwin De Pauw

MS Lab, GIGA, Liège University, Liège, BELGIUM

MS-based protein sequencing methods are essentials for protein characterization. Two major strategies exist. The "top-down" approach in which intact protein ions are subjected to gas-phase fragmentation and the "bottom-up" approach that relies on the analysis of peptides generated by proteolytic digestions. The first strategy has the advantage to potentially give access to complete protein sequence. However, spectra complexity and the difficulty to analyze large molecules are important limitations. The second approach is the most used, mature and automated method but miss several peptides of the protein to be characterized. We propose here a simple and efficient method based on a limited digestion inducing miss cleavages which leads to a drastic increase in sequence coverage using bottom-up methods.

Three proteins (BSA, Fetuin, IgG) were subjected to proteolytic digestions. Six enzymes were used independently (Trypsin, chymotrypsin, Glu-c, Asp-N, Arg-C et Lys-C) to assess the interest and the robustness of this approach. 10µg of a 1mg/ml solution of each protein were independently digested. Standard buffer conditions were used. Reduction and alkylation reactions were performed prior a 2 hours digestion. Eight different enzyme concentrations were tested to induce limited digestion with high miss cleavages level. Weight enzyme/ weight total protein ratios used were: 1/100, 1/200, 1/500, 1/750, 1/1000, 1/2000, 1/5000, 1/10000. A quick evaluation of digestion efficiency was carried out by 1D gradient SDS PAGE analysis on the generated peptides. Samples were further analyzed by nano-HPLC-MS/MS experiment for protein identification.

Each individual digestion was first characterized by 1D SDS-PAGE experiment to assess digestion level and peptides lengths. Gel images show visible proteolytic activity for all enzymes used and over the whole enzyme concentrations range. Conditions showing the broadest distribution in peptide lengths together with similar apparent relative intensity were selected by visual inspection for further LC-MSMS experiments. All BSA digestion conditions were MS analyzed to check if the condition selected visually was correlated with large variety of peptide lengths were MS analysed. The conditions which show identification with the highest

sequence coverage are correlated to the visually selected ones. "Weight enzyme/weight total protein" ratios were selected according to gel images for further LC-MS analysis: trypsin 1/1000, chymotrypsin 1/500, GluC 1/750, AspN 1/100, ArgC 1/200, LysC 1/1000. Results on BSA digestions using trypsin 1/100 (w/w) ratio show 46% sequence coverage with 22 unique peptide matches and Mascot score at 1736 (Mascot search miss cleavages allowed at 0). The same sample with 1/1000 (w/w) enzyme /protein ratio show 66.1% sequence coverage, 44 unique peptide matches and a Mascot score at 2502 (Mascot search miss cleavages allowed at 9). Combination of trypsin 1/100 and 1/1000 allowed identification with 88.8% sequence coverage, 86 unique peptide matches and a Mascot score at 4519. We show here good improvement of the bottom-up approach which can be applied for pure protein characterisation studies. In addition to dramatically increase protein sequence coverage, this method allows matching different peptides to the same sequence, increasing identified matched sequences significance and robustness. This very simple and new method can easily be applied and has the advantage to statistically improve information amount that can be analyzed by LC-MS analysis.

Liquid chromatography-mass spectrometry assay for the identification and absolute quantification of the apelin peptides in human plasma and bovin colostrum

Mesmin Cédric • Dubois Mathieu • Becher François • Fenaille François • Ezan Eric

CEA, IBCTeoS, Service de Pharmacologie et d'Immunanalyse, Gif-sur-Yvette

Apelin peptides are of great interest owing to their involvement in physiological and pathological processes and have been proposed as novel biomarkers for heart failure. Plasma concentrations of bioactive peptides of 12 (apelin-12), 13 (apelin-13 and pyroglutamyl apelin-13), 17 (apelin-17) and 36 (apelin-36) amino acids are reported to range from 20 to 4000 pg/mL in healthy subjects. As standard immunoassays cannot specifically quantify each apelin peptide, we have developed a sensitive and targeted multiplexed liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for each plasma apelin fragment. The approach was based on a cation exchange extraction step of apelin forms present in human plasma. Apelin-12, -p13, -13, -17 and -36 were quantified using a triple quadrupole mass spectrometer operating in the multiple reaction monitoring mode. Stable isotope-labeled internal standards were used for quantification. Following assay validation, apelin peptide stability in plasma was investigated. Ten plasma samples from healthy donors were analyzed both with a standard immunoassay and our LC-MS/MS method. Immunoassay results for the ten healthy donors showed immunoreactive plasma apelin concentrations ranging from 208 to 466 pg/mL. The lower limits of detection of our LC-MS/MS assay ranged from 10 to 50 pg/mL for apelin-12, -13, -p13, -17, -36. Surprisingly, none of the five expected circulating forms of apelin was detected. These results question the nature and/or the concentration of circulating apelin peptides as well as the specificity of the immunoassays that have hitherto been used for clinical applications. Determination of these forms in human plasma is a particularly challenging task and is currently ongoing in our laboratory. As a first step in the endogenous apelin peptides identification, bovin colostrums apelin content was investigated. Concentrations at the ng/mL level of a wide variety of immunoreactive apelin were already reported in this fluid, but up to now none apelin peptide was clearly identified. Using the extraction process previously developed, coupled to an high-resolution and high-mass-accuracy untargeted mass spectrometric method (LC-LTQ/Orbitrap), more than ten endogenous apelin peptides were unambiguously characterized in bovin colostrum. This is the first time that the apelin peptides

family is so far described, and these results should allow a more comprehensive investigation of apelin biology.

Demonstrating biomanufacturing comparability of therapeutic glycosylated monoclonal antibodies through identification of N-linked glycans by directed multi-stage mass spectrometry oligosaccharide profiling

G. Eagle(1) • M. Openshaw(2) • D. Spencer(3) • (1)Shimadzu Biotech, Manchester, UK, (2)GC Ltd., Teddington, UK, (3)Ludger Ltd, Alington, UK, • A. Kameyama • H. Narimatsu • Research Center for Medical Glycobiology National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Ibaraki, JAPAN • N. Kikuchi Mitsui • Knowledge Industry Co., Ltd • S. Nakaya • Shimadzu Corporation

Novel aspects

Directed multi-stage MALDI-QIT-TOF MSⁿ identification of N-linked glycans using a probabilistic scoring algorithm to aid oligosaccharide profiling of therapeutic antibodies

Introduction

The licensing of biological therapeutics following International Conference Harmonisation (ICH) guidelines requires demonstration of comparability during biomanufacturing. For recombinant monoclonal antibodies (rMABs), glycosylation influences efficacy profile, batch-to-batch variability and in vivo safety. Therefore only accurate and reliable characterisation can ensure quality control. However glycan heterogeneity - there can be 30 or more types at each of two Fc glycosylation sites makes this non-trivial. Oligosaccharide profiling requires techniques such as HPLC purification of fluorescently labelled glycans for relative quantitation, and sequential MSⁿ spectral analysis for structural determination. The advantages of directed multi-stage MALDI-QIT-TOF MSⁿ for glycan identification without the need for time consuming manual interpretation of complex fragment patterns has been investigated for glycoprofiling of a positive control rMAB.

Method

A positive control rMAB was deglycosylated, and released glycans labelled with 2-aminopyridine (2-AP). HPLC purification was followed by MS and MSⁿ analysis (+ve mode), as part of a guided multi-stage experiment for glycan identification. Data (m/z and intensities) was searched against a Human glycan spectral database (AIST & MKI) using client software (Shimadzu) and a probabilistic scoring algorithm. Glycans were identified from the spectra based on the presence and absence of fragment ions and their intensities. Briefly, a peak list from MS spectra of the AP-labelled glycans was searched against the glycan database - returning a list of potential precursor candidates. MS² acquisitions were followed by a new search, if necessary further rounds of directed MSⁿ were performed for identification.

Preliminary data

The suitability of the client software, probabilistic scoring algorithm and Human glycan spectral database for accurate and reliable oligosaccharide profiling of a positive rMAB control - used for comparability studies of commercial therapeutic rMABs (Ludger) has been investigated. The database is populated with 206 human carbohydrates including 108 unique N linked glycans (105: AP-labelled glycans). The robustness of the platform was initially tested with six AP-labelled glycan standards including: G1 fucosylated and non-fucosylated isomers, (110.4, 100.3 & 100.4 (galaxycode (Takahashi & Kato)) and Lacto-N-Fucopentaose II and I at concentrations ranging from 1 - 20pmol/μl. All six were correctly identified and MS² & MS³ directed pathways described. Glycans were prepared on a standard stainless steel MALDI target using the dried droplet method plus ethanol (EtOH) re-crystallisation. Compared to the dried droplet method only, this preparation gave good sample homogeneity across the dried sample spot, and good shot to shot signal intensity across a raster during automated data acquisition. Briefly 0.5μl of sample was spotted onto the MALDI target. After drying the sample was overlaid with 0.5μl of DHB matrix solution (10mg/ml in 50% EtOH, 5mM NaCl) and left to dry. This was followed by spotting 0.2μl of EtOH over the sample spot. Concentrations of 5-20mM NaCl in the matrix solution were investigated, with 5mM NaCl giving the most sensitive preparation. Replicate MSⁿ spectra were shown to be reproducible (detected fragment ions and relative intensities) by triplicate analysis of two AP-labelled glycan standards across three production MALDI-QIT-TOF instruments. Additionally the CID control setting is optimized when the precursor intensity was 15% of the intensity of the base peak during MSⁿ acquisitions. A graphical representation of the probabilistic scores and significance threshold was developed for interpretation of search results.

Méthodologie analytique par LC-MALDI-Orbitrap

Sega Ndiaye • Iman Haddad • Emmanuelle Demey • Joelle Vinh

Laboratoire de Spectrométrie de masse biologique et protéomique, Paris

Les sources de type MALDI sont généralement couplées aux analyseurs de type TOF. Nous utilisons au laboratoire un autre type de couplage qui comprend une source MALDI couplée à un analyseur Orbitrap.

L'intérêt de ce type de configuration est du d'une part à une haute précision (5ppm en routine sur plusieurs jours) et d'autre part à la résolution du détecteur (100000 à m/z 400) qui permet de réaliser des profils de masse très informatifs en mode MALDI, notamment lors de l'analyse en cartographie peptidique.

La stabilité de ces spécifications dans le temps est d'autant plus intéressante lors d'une analyse LC-MALDI. La précision de mesure permet de réaliser une analyse de plusieurs heures à plusieurs jours en minimisant les dérives (nanoLC en gradient long ou nano LC multidimensionnelle par exemple). [1]

Cependant, la fragmentation d'espèces monochargées dans une trappe linéaire reste a priori plus délicate à optimiser comparée à la fragmentation d'espèces multichargées retrouvée en électrospray. Pour contrer ce problème, il est possible de combiner les données Orbitrap pour la précision de masse MS et les données MALDI TOF/TOF pour la qualité des spectres MS/MS [2]. Dans ce travail, différentes méthodes d'analyses ont été étudiées en optimisant les paramètres d'acquisition pour obtenir les meilleurs résultats et les meilleures identifications possibles en passant par une analyse LC-MALDI-Orbitrap. Le nombre de microscans moyennés, l'énergie de collision utile pour l'activation des précurseurs, la couverture statistique du dépôt MALDI, la fréquence d'échantillonnage sont autant de paramètres influents. Il est possible d'envisager aussi d'autres types de retraitements des données post analyse afin d'exploiter au mieux la précision de mesure accessible avec ce détecteur.

L'apport de ce type de couplage après optimisation en comparaison avec une analyse plus classique de type LC MS/MS sera présenté en conclusion de cette étude.

[1] J. Vinh, I. Haddad, S. Ndiaye, A.M. Hesse and J. Rosier, *NanoLC-MALDI Orbitrap Coupling Evaluation: An Attempt to Optimize the Acquisition Strategy*, *Proceedings of the 56th ASMS Conference Denver, CO, June (2008)* TPBB 067.

[2] Rietchel B, Baumliedberger D, Arvey TN, Bornemann S, Rohner M, Schuerken M, Kasai M, Meyer B.

The benefit of combining nLC-MALDI-Orbitrap MS data with nLC-MALDI-TOF/TOF data for proteomic analysis employing elastase.

J Proteome Res. 2009 Nov;8(11):5317-24.

P6-018

Optimizing mass spectrometry for ultra high performance nano LC in Proteomics

*E.-J. Sneekes • M. Karsten • B. de Haan • R. Swart • Dionex Corporation, Amsterdam, NL
G. Trementin • Dionex Corporation, Sunnyvale, CA • C. Netter • Dionex France, Voisins le Bretonneux, F*

Introduction

The number of proteins that can be identified in proteomics experiments has been increasing for years and will continue to do so. However these increases usually involve more complexity in the workflows, in the form of 2D LC or generation of complex mass spectrometric methods, e.g. inclusion lists.

The application of ultra high performance nano LC allows simpler workflows for the separation without compromising on separation efficiency. In addition, mass spectrometry is used to sequence peptides, and MS instruments inherently have some separation power. So far, LC-MS instrumentation is usually operated to maximize the signal intensity and minimize the number of peptides that enter the MS simultaneously.

By assessing and controlling the co elution from the LC system and optimizing this for the separation power the MS provides, the LC-MS setup turns into a multi-dimensional separation system as whole.

Experimental

In this research we have looked at the aspects of a RP LC MS analysis of complex digests. The goal was to optimize both gradient LC and the mass spectrometer detection settings to maximize the number of identifications, without compromising on total run time or operational ease of use. Various gradients lengths and shapes were applied to produce the most efficient separation. Precursor ion selection was varied by number, intensity threshold and repetitions in order to use the mass spectrometer as an extension of the separation method. Preliminary results.

High-resolution LC-MS separations of complex proteomic peptide samples are demonstrated by combining long columns with 2 μm particles and long gradients. UHPLC on nano scale was successfully applied by separating complex digests on a 50 cm long nano column packed with 2 μm particles. The operating pressure at a flowrate of 300 nl/min was around 700 bars. Extending the gradient length to 10 hours has resulted in peak capacities of more than 750. Manual review of the mass spectrometric data has revealed narrow peaks and consequently higher signal intensities. The effects of LC and MS parameters on performance and the influence on peptide identification are discussed.

Novel aspects

Ultra high performance nano LC-MS allows the use of straightforward methods to obtain maximum protein identification information.

Caractérisation de RCPG par une approche protéomique

Lebreton M.(1) • Cany C.(2) • Steffan T.(2) • Kubn L.(1) • Alkhalifoui F.(2) • Magnin T.(2) • Leize E.(1) • Wagner R.(2) • Potier N.(1)

(1)Laboratoire de Dynamique et Structures Moléculaire par Spectrométrie de Masse (LDSM2), Institut de Chimie de Strasbourg, CNRS – UMR7177

(2)Département des Récepteurs et Protéines Membranaires, ESBS, CNRS - UMR7175

Les stratégies d'analyse protéomique classiquement utilisées pour l'étude de Protéines Membranaires (PM) (« shotgun » ou gel 1D) conduisent souvent à l'identification de protéines cibles, mais le faible taux de recouvrement de séquence liés au faible nombre de peptides générés ne permet pas une caractérisation complète. A l'aide d'un système modèle, des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPGs) produits et purifiés à partir d'un système levure recombinant, nous avons développé un protocole visant à l'obtention d'un recouvrement de séquence maximal, nécessaire à la mise en évidence de modifications post-traductionnelles ou d'isoformes. Ce protocole, appliqué sur 5 RCPGs, est basé sur la fusion des résultats obtenus par l'action de trois agents de digestion sur une même bande de gel 1D : un agent de digestion spécifique (trypsine), un agent de digestion peu spécifique (chymotrypsine), un agent de digestion chimique (CNBr).

Alors qu'ils partagent une même structure à 7 domaines transmembranaires, les taux de recouvrement de séquence obtenus sur nos 5 RCPGs après une digestion in-gel à la trypsine se sont avérés très variables en fonction du récepteur considéré ; Et ce, quelles que soient les conditions d'extraction des peptides (présence de détergent, concentration élevée en acide). En revanche, l'utilisation de la chymotrypsine et des doubles digestions avec le CNBr s'est révélée très utile en permettant (i) de valider l'exactitude de certains domaines grâce à la détection de peptides dont les séquences se chevauchent partiellement et (ii) d'augmenter sensiblement le taux de recouvrement de séquence grâce à l'hydrolyse de plusieurs domaines transmembranaires. Des taux de recouvrement de séquence pouvant aller jusqu'à 80% dans le cas du récepteur Purinergique P2RY1 nous ont permis de mettre en évidence la présence d'une N-glycosylation sur l'extrémité N-terminale. Dans tous les cas, la complémentarité des masses mesurées par MALDI et par LC-MS/MS a été exploitée.

Effet de l'acétylation N-terminale de peptides et phosphopeptides sur leur ionisation et leur fragmentation MS et MS/MS

Lucrèce Matheron • Emmanuelle Sachon • Gérard Bolbach

UFMC, Plateforme de spectrométrie de masse et protéomique, Paris

Le but de ce travail est de mettre en évidence l'intérêt d'une acétylation N-terminale de peptides contenant ou non des résidus basiques (R ou K), afin d'aborder les phénomènes d'ionisation (MALDI) et de fragmentation en phase gazeuse (ESI, MALDI). Il a été montré précédemment que l'acétylation de peptides en N-terminal pouvait permettre la discrimination par spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF de deux formes isobares d'un heptapeptide (ASAWFTN) présentant une sérine sous forme L ou D en position 2 (1). Quand les peptides sont acétylés, le proton n'est plus « séquestré » au niveau du N-terminal (AP la plus élevée), il est de ce fait plus mobile et capable d'entraîner une fragmentation MS/MS tout au long du squelette peptidique, permettant ainsi de mieux différencier les deux peptides. De même, l'analyse d'un peptide acide contenant des résidus P, Ac-DAEPPILYSEY-NH₂ en MALDI-TOF, en mode réflecteur positif ne permet pas d'observer la molécule protonée intacte et conduit à une fragmentation principale en N-terminal de la première P, de façon très précoce dans la cible-source (2). En comparant les spectres MALDI en mode réflecteur positif des formes acétylées ou non de la dermorphine : YAFGYPS-NH₂ ou de l'heptapeptide : ASAWFTN, nous avons pu observer, dans le cas du peptide acétylé, et ce malgré l'absence de résidus P ou acides, une fragmentation source très prompte et intense, conduisant à l'observation d'ions y et b résolus, dispersés le long de la séquence. Pour les peptides contenant un résidu R ou K, ce type de fragmentation n'est pas observé. Nous avons aussi étudié le rôle de l'acétylation lors de l'ionisation de mélanges équimolaires des peptides suivants : NP (NSLPQIPTLNLESR), acNP (ac-NSLPQIPTLNLESR), PS2 (NpSLPQIPTLNLESR), acPS2 (ac-NpSLPQIPTLNLESR), DP (NpSLPQIPTLNLEpSR) et acDP (ac-NpSLPQIPTLNLEpSR). Les mélanges ont été réalisés soit entre la version acétylée et non acétylée de la même séquence peptidique soit en mélange équimolaire de ces 6 peptides. Les résultats obtenus sont très différents. En mélange 1:1, les peptides non acétylés semblent s'ioniser de façon équivalente aux peptides acétylés. En revanche, en mélange complexe, les peptides acétylés s'ionisent nettement mieux quelle que soit la séquence du peptide. Cet effet est particulièrement remarquable dans le cas du peptide

acNP versus NP avec un rendement d'ionisation 2 à 6 fois meilleur en fonction des matrices utilisées. Les peptides acétylés semblent moins sujets aux effets de suppression en mélange complexe. Lorsque ces peptides sont phosphorylés, cette tendance est moins prononcée. Enfin, des pertes métastables (-HPO₃, -H₃PO₄) plus importantes sont observées lorsque le phosphopeptide est acétylé en N-terminal. Nous nous sommes aussi intéressés à la fragmentation CID de ces 6 peptides, à la fois en MALDI-TOF-TOF et en ESI-Q-TRAP. En ESI, l'acétylation conduit à une fragmentation plus importante de l'ion parent 2+. Cet effet destabilisant est contrebalancé par la présence d'une phosphorylation, plus particulièrement lorsque cette phosphorylation a lieu proche du site d'acétylation, ici en position 2. En MALDI les phosphopeptides acétylés sont plus stables vis-à-vis de la perte métastable du phosphate à partir de l'ion parent, ce qui permet d'obtenir une meilleure information de séquence. Ceci est surtout vrai quand le site de phosphorylation est proche du site d'acétylation. Concernant les fragments, en MALDI, on n'observe pas d'effet de l'acétylation sur les ions y mais les ions b sont moins nombreux quand le peptide est acétylé avec une intensité augmentée des ions b de faible masse (surtout dans le cas du DP). En ESI, les ions y sont plus nombreux quand le peptide est acétylé surtout dans le cas du DP, en revanche, on observe peu d'effet de l'acétylation sur les ions b à part une plus importante perte de phosphate quand les fragments sont acétylés (dans le cas acPS2 et surtout acDP). En protéomique, acétyler un mélange peptidique issu de la digestion enzymatique d'une protéine pourrait conduire à une fragmentation source en MALDI. Il serait ainsi possible entre autre, de réaliser des expériences de MS3 avec un appareil de type MALDI-TOF-TOF. De même, l'augmentation de l'information de séquence en MS/MS peut s'avérer intéressante dans le cas des phosphopeptides connus pour principalement se fragmenter au niveau du phosphate.

(1) Sachon et al., *Anal. Chem.*, 2009, 81, 4389-96.

(2) Sachon et al., *Anal. Chem.*, 2009, 81, 8986-92.

Chromatographie rapide haute pression et Orbitrap Velos : évaluation du tandem

Virginie Salnot • François Guillonmeau • Cedric Broussard • Marjorie Leduc • Patrick Mayeux

Plate-forme protéomique université paris Descartes, Paris

Dans le cadre de l'arrivée sur la plateforme 3p5 de la nanochromatographie liquide Ultimate 3000 RSLC de Dionex couplé au spectromètre de masse LTQ- Orbitrap Velos de ThermoScientific, les diverses atouts et faiblesses de ces appareils ont été évalués.

La RSLC a la capacité de pouvoir monter à des pressions jusqu'à 900 bars. Avec ce système, il est donc possible d'augmenter les débits et/ou d'utiliser des colonnes de particules plus fines, donc plus résolutive. En revanche, les colonnes de préconcentration ne peuvent être utilisées qu'en mode "flow through" (débit dans un seul sens). L'Orbitrap Velos a doublé sa rapidité de scan. Le couplage de ces 2 systèmes haute-performance doit permettre de diminuer la durée des analyses en conservant ou en augmentant la résolution.

Nous avons comparé le mode "injection directe" et le mode "préconcentration" sur la RSLC en injectant un étalon de BSA. Les critères d'évaluation de ces 2 modes sont mesurés à l'aide des logiciels Chroméléon, Xcalibur et MASCOT. Nous avons observé une amélioration notable du mode injection directe par rapport au système nanoLC classique, alors que le mode préconcentration ne présente qu'une amélioration modérée.

Plusieurs colonnes de préconcentration seront testées pour augmenter la résolution de l'analyse : colonne de préconcentration PepMap contenant des particules de 3 μ M ou colonne monolithique.

Afin de se ménager la possibilité de réaliser l'une ou l'autre des injections, en fonction des besoins liés à l'échantillon, un nouveau montage a été envisagé. Ce montage permet par une simple programmation d'orienter l'échantillon vers le mode d'injection choisi. Ceci permettrait soit d'analyser des échantillons "à risque" en préservant la colonne analytique et le spectromètre de masse au détriment de la résolution, soit d'analyser des échantillons "propres" en conservant le maximum de résolution.

Apport de la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) pour la quantification de biomarqueurs protéiques par spectrométrie de masse

Romain Simon • Carole Meseguer • Catherine Fonbonne • Jérôme Lemoine • Arnaud Salvador

UMR 5160, Villeurbanne

La spectrométrie de masse ciblée en mode MRM (« Multiple Monitoring Reaction») s'impose aujourd'hui comme l'une des méthodes de choix pour l'évaluation clinique de biomarqueurs protéiques. Cependant les sensibilités atteintes à ce jour sont encore loin de celles des méthodes immuno-enzymatiques qui se situent généralement en dessous du ng par mL de serum ou plasma. Il est donc important de développer de nouvelles méthodologies analytiques par LC-MS/MS permettant d'abaisser au maximum ces sensibilités. Bien que cela passe évidemment par l'utilisation de spectromètres de masse ultra-sensibles, le gain en sensibilité peut également être apporté par la préparation d'échantillon et/ou la chromatographie.

La chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) qui utilise une phase stationnaire polaire et une phase mobile hydro-organique majoritairement organique, connaît depuis ces dernières années un développement très rapide et important dans le domaine de la quantification de petites molécules. Cette forte teneur en solvant organique, plus volatile et possédant une tension de surface plus faible que l'eau induit une désolvatation plus efficace de la phase mobile et donc une sensibilité accrue en électrospray par rapport à ce que l'on observe en chromatographie en phase inverse. Cette propriété a été fortement exploitée pour l'analyse de médicaments et/ou de leurs métabolites dans les fluides biologiques. D'importants gains de sensibilité entre l'HILIC et la phase inverse ont ainsi été rapportés. Si le comportement chromatographique de peptides en chromatographie HILIC a déjà été étudié, l'aspect analyse quantitative n'a jamais été évalué. Notre étude s'intéresse donc aux gains de sensibilité pouvant être apportés par l'HILIC pour la quantification absolue de protéines via des peptides rapporteurs issus d'une digestion par la trypsine. La réponse de différents peptides tryptiques a donc été comparée en HILIC et en C18. Les gains de sensibilité (HILIC vs C18) sont généralement compris entre 2 et 10. L'influence de la composition de la phase mobile sur les états de charges a également été évaluée.

P6-023

Analyse protéomique différentielle de xénogreffes de tumeurs coliques humaines

T. Wasselin(1,2) • F. Bertile(1,2) • J.-F. Launay(3) • P. Gendry(3) • F. Delalande(3) • S. Sanglier-Cianférani(1,2)
A. van Dorsselaer(1,2)

(1) Université de Strasbourg, IPHC-D3A, ISMBO, Strasbourg • (2) CNRS, UMR 7178, Strasbourg, France • (3) Inserm U682, Proteomic Core Facility, Université de Strasbourg, France

Les métastases sont la principale cause de létalité du cancer colique humain mais les mécanismes moléculaires de leur développement restent méconnus. Cette étude vise à identifier les protéines différentiellement exprimées entre une tumeur colique humaine primaire et deux métastases hépatiques synchrones, après xénogreffes chez la souris nude.

Les protéines des xénogreffes, séparées sur colonne DEAE puis gel 2D, sont analysées en nanoLC-MS/MS. Les images de gels 2D sont analysées avec PDQuest. L'identification des protéines (target-decoy) est réalisée à l'aide de deux moteurs de recherche, MASCOT et OMSSA.

La majorité (60%) des protéines identifiées provient bien des tumeurs humaines xénogreffées et non de l'environnement murin (11%). 29% ne peuvent être assignées à une des deux espèces. Parmi ces dernières, 30% présentent une stricte homologie de séquence entre les espèces. Le « modèle xénogreffe » est donc un modèle de choix pour l'étude du développement métastatique.

67% des peptides sont identifiés aussi bien avec MASCOT qu'avec OMSSA. Néanmoins, MASCOT et OMSSA permettent d'identifier spécifiquement des peptides supplémentaires (34% pour MASCOT et 9% pour OMSSA).

L'extraction automatique des annotations (Gene Ontology, Kegg databases) des protéines humaines différentielles révèle leur origine cytoplasmique, nucléaire, mitochondriale et membranaire. Plusieurs d'entre elles, impliquées dans le métabolisme énergétique, l'apoptose, la réponse au stress oxydatif..., sont connues pour leur rôle dans certains cancers, désordres métaboliques ou maladies neurodégénératives.

Ces résultats sont encore en cours d'analyse et devraient conduire à la détermination de nouvelles cibles thérapeutiques et/ou diagnostiques.