

UNIVERSITE LILLE I SCIENCES ET TECHNOLOGIES

ECOLE DOCTORALE SMRE

UNITE DE SERVICE ET DE RECHERCHE CNRS 3290

LABORATOIRE DE MINIATURISATION POUR L'ANALYSE, LA
SYNTHESE ET LA PROTEOMIQUE

THESE

Présentée par

Alexia ORTIZ

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

**Apport de la protéomique à la médecine
transfusionnelle :**

**Etude de l'impact des traitements d'inactivation des
agents pathogènes et des conditions de stockage sur les
protéines plasmatiques**

Soutenue le 18 Novembre 2011 devant la commission d'examen composée de

Président du Jury : Dr Julia CHAMOT-ROOKE

Rapporteurs : Dr Thierry RABILLOUD & Dr Alain Van DORSSELAER

Examineur : Dr Jean-Jacques HUART

Directeur de thèse : Dr Christian ROLANDO

Encadrant : Dr Caroline TOKARSKI

« L'art d'être tantôt très audacieux et tantôt très prudent est l'art de réussir »

Napoléon Bonaparte

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier le **Dr Christian Rolando** pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, et m'avoir fait confiance depuis le départ. Vous m'avez transmis une partie de vos connaissances et de votre expérience ; j'espère que je saurais en faire bon usage pour la suite. Vous m'avez également donné la possibilité de faire la connaissance de nombreuses personnes de divers horizons, en me faisant parcourir une bonne partie de l'Europe ; j'ai même failli rencontrer le Père-Noël grâce à vous !

Je remercie également le **Dr Caroline Tokarski** d'avoir co-encadré ce travail. Je te remercie d'avoir partagé un peu de tes connaissances en préparation d'échantillon et une partie de ton savoir faire pour dompter les spectromètres.

Je remercie le **Dr Thierry Rabilloud** d'avoir accepté de juger mon mémoire, et surtout d'accepter immédiatement lorsque je vous l'ai demandé. Ca m'a profondément touchée. Notre rencontre aux fins fonds de l'Italie ainsi que nos discussions autour de vins plus que moyens a été très enrichissante pour moi. J'espère, très sincèrement, que nous nous recroiserons. J'en suis à peu près sûre ! A bientôt donc.

Je remercie le **Dr Alain Van Dorsselear**, tout d'abord je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail ; mais également d'avoir accepté, il y a maintenant 4 ans que je puisse effectuer mon stage de fin d'études à Lille. Je vous en reste extrêmement reconnaissante. La boucle est bouclée, à présent.

Je remercie le **Dr Julia Chamot-Rooke** pour ne pas avoir hésité à participer à mon jury, et accepté d'en être à sa tête. Merci pour l'opération « infiltration » avec Magalie ;). J'essaie également de porter à mon tour le cjsM le plus loin possible pour perpétuer ce que vous avez commencé.

Je remercie le **Dr Jean-Jacques Huart**, directeur de l'Etablissement Français du Sang Nord-de-France. Je vous remercie d'avoir financé ma thèse et de m'avoir donné entière confiance dans le développement scientifique. J'ai appris de nombreuses choses à vos côtés, et ce même si nous nous sommes rencontrés qu'à trop peu d'occasions. Le bleu de méthylène n'a pas dit son dernier mot encore ! Je reste persuadée que la protéomique a un rôle non-négligeable dans l'univers de la médecine transfusionnelle.

Un grand merci à **Dominique Dernis**, directeur de la production de l'EFS Nord-de-France, et **Christine Defer**, responsable du laboratoire de Biologie Moléculaire de l'EFS Nord-de-France, je vous remercie pour votre disponibilité et pour avoir su partager vos connaissances de la transfusion. Malgré nos deux différentes disciplines, nous sommes parvenus à discuter et construire quelque chose qui, j'en suis sûre, ira loin dans le futur. Dominique, j'aime vous entendre dire que je suis « chez moi » lorsque je vous rends visite aux PSL !

Je remercie bien sûr tous les « gens » du labo... presque ma troisième famille, surtout si l'on prend en compte le temps que j'y passe: **Karine** pour ton efficacité, ton énergie, pour m'avoir fait découvrir le monde des JiPés ; j'espère, par ailleurs, que tu feras bon usage de mon « Mlle », **Marie** pour tes précieux conseils, tes corrections et tes discussions (même les plus surréalistes), n'arrête jamais de dire que je suis « gifted » (j'aime ça !) ; **Geoffrey** (alias Baby Joe) pour tes talents de montage et de démontages de tout et n'importe quoi mais surtout je te souhaite de superbes choses pour l'avenir (mais ca j'en suis sûre, pas vrai ?!); **Anne-Sophie** pour m'avoir fait partagé mes pauses autour d'un café ; c'est à ton tour d'être sur le grill...bon courage !, **Hélène** pour ta fraîcheur, tu m'as appris beaucoup de choses, je n'oublierai jamais tes conseils pour masteriser les gels (sauf le vendredi !)...il est temps pour toi de voler de tes propres ailes, bon courage ! **Sophie** pour ton soutien, pour tes relectures et pour ta recette de tarte poire/chocolat (surtout !) ; **Latifa**, j'espère avoir été à la hauteur pour ton année passée à mes côtés, en tous cas, grâce à toi, j'ai fait quelques progrès en biologie ;) je te remercie pour l'énorme travail sur la RBP4 ! Enfin, le petit dernier (arrivé) de l'équipe : **Fabrice**, je crois qu'aucune prot' ne te résiste...le monde sera à nous très vite ! Je n'oublierai pas non plus les RMNistes et RPEistes (**Marc, Greg, Laurent, Maylis, Julien, Nadia, Bertrand et Hervé**) on s'est connu autour de (bons !) cafés et c'est toujours un plaisir ! Enfin merci à tous les « Jean-Pierre » de la salle de sports du campus, vous m'avez fait découvrir l'autre coté des protéines...

Plus personnellement, un gros merci à ma famille (**Maman, Papa & Driou** puis aussi **Isabelle et Raphaël**) pour votre soutien (à tous les niveaux !) et m'avoir soutenu dans mes choix, même si vous étiez loin de comprendre tout ce que je faisais dans mon sous-sol chez les Ch'tis. Maman, je suis maintenant là 100% pour toi ; on a beaucoup de temps à rattraper nous deux. J'ai aussi une profonde pensée pour **ma petite Mamie**, tu as toujours été à mes cotés depuis tout là-haut. J'espère que tu es fière de ta *figliuluccia*, tu m'aides à ne pas baisser les bras et à avancer ! Merci.

Merci à **E&D** (impossible de vous dissocier !), pour vos soirées et vos week-ends qui m'ont sortie (presque) la tête de ma paillasse !! Je ne saurais pas dire pourquoi mais nous nous sommes pas mal rapproché ces derniers temps, en tous cas j'aime ça. Sans oublier aussi **Cécile, "Sandy"**: Abbygail vous remercie from the bottom of her heart! Elle a passé des très bons moments avec vous. Cécile, les chapitres 1,2 et 5 te remercient !

Un merci tout spécialement à « ma meuf » **Emilie** pour m'avoir prodigué ses précieux conseils pour me relaxer dans toutes les situations pénibles (dentiste, présentations orales)...Ses maître-mots : lâcher-prise, ancrage et sans oublier, ballon-crêpe...et ça marche !

Merci tout spécial à la « **tribu** » **Debuck** pour votre soutien sans faille. Vous avez assisté à peu près tout depuis bientôt maintenant neuf ans.

Moins sérieusement, mais importants malgré tout, je tiens à remercier Nespresso (mention particulière pour Arpeggio et Volluto), je ne compte plus le nombre de capsules qui sont passées entre mes mains, et qui m'ont permis de braver le sommeil et la fatigue quand il le fallait. Je dédie également une partie de ces travaux à tous les « dramas » qui ont su m'accompagner tout au long des ces trois ans au cours de ma rédaction et de mes réflexions, en particulier Law and Order SVU (et tout spécialement à l'Inspecteur Liv' Benson), et autres Simpson, American Dad !, South Park et Family Guy. Sans oublier, bien sûr, l'univers de la WWE en particulier Randy Orton , John Cena et Rey Mysterio ainsi que ma cure de super-héros cet été pendant ma rédaction ! Je n'ai pas vos pouvoirs...mais je m'en sors ! Vous avez tous contribué à améliorer mon anglais.

Enfin, un énorme grand merci à **Bibou...**cette thèse est un peu la tienne, je pense aussi ! Tu l'as vécue de l'intérieur, tout autant que moi. Etre à tes côté m'a forcée à décrocher, et à chaque fois ce fût bénéfique. Tu as su me faire relativiser, prendre du recul quand il le fallait, mais aussi persévérer dans les moments moins évidents. Tu crois en moi plus que moi-même, c'est un fabuleux booster pour moi ! Maintenant, c'est nous deux contre le monde pour de vrai, promis !

Table des matières

Introduction générale

Chapitre 1 : Analyse protéomique & Médecine transfusionnelle

1	Le plasma transfusionnel	33
1.1	Le plasma humain.....	33
1.2	Le protéome du plasma.....	34
1.3	Les traitements d'inactivation des agents pathogènes	36
1.3.1	Plasma viro-atténué par solvant-détergent	37
1.3.2	Plasma viro-atténué par traitement photochimique.....	38
1.3.3	Pasteurisation du plasma	39
1.4	Mode de conservation et stockage.....	40
2	L'analyse protéomique appliquée à l'étude de plasma	41
2.1	L'électrophorèse sur gel	42
2.1.1	La matrice.....	42
2.1.2	L'électrophorèse monodimensionnelle	43
2.1.3	L'électrophorèse bidimensionnelle	45
2.1.4	Techniques de détection post-électrophorétiques	46
2.2	La spectrométrie de masse.....	47
2.2.1	Les sources les plus utilisées en protéomique	48
2.2.2	Les analyseurs	55
2.3	Couplage avec la nano-chromatographie liquide (nanoLC).....	69
2.3.1	La nanoLC.....	69
2.3.2	Le mode « préconcentration ».....	70
2.3.3	Les nanocolonnes	71
2.4	Identification des protéines.....	71
2.4.1	Stratégie « Bottom-Up »	71
2.4.2	Stratégie « Top-Down »	74

3	La protéomique du plasma et médecine transfusionnelle	74
3.1	La protéomique du plasma	75
3.2	Impact des traitements d'inactivation sur les protéines plasmatiques	77
3.3	Impact de la conservation et des conditions destockage du plasma transfusionnel ..	78
 Chapitre 2 : Le traitement au bleu de méthylène		
1	Généralités	101
1.1	Le bleu de méthylène.....	101
1.1.1	Son action.....	101
1.1.2	L'inactivation virale par le bleu de méthylène	102
1.1.3	La mise en œuvre de ce traitement au sein de l'EFS Nord-de-France	102
1.2	La protéomique et la quantification différentielle	103
1.2.1	La notion de « shotgun proteomics »	103
1.2.2	La quantification relative appliquée au plasma.....	105
1.2.3	La quantification différentielle et ses limitations	107
1.2.4	La quantification différentielle et la détection MS.....	108
2	Etude des traitements sur standards protéiques.....	108
2.1	Standards protéiques.....	109
2.1.1	La substance P	109
2.1.2	L' α -lactalbumine	110
2.1.3	L'albumine sérique bovine.....	112
2.2	Photochimie et photophysique du bleu de méthylène	115
2.3	L'oxydation des protéines	116
2.4	Effet du traitement au bleu de méthylène sur les modèles	118
2.4.1	Substance P	118
2.4.2	L' α -lactalbumine	118
2.4.3	L'albumine sérique bovine.....	119
3	Approche « label-free »	121
3.1	La LC-comparative : son principe	121

3.2	Différentes étapes pour la LC-MS comparative	122
3.3	Eléments statistiques.....	124
3.3.1	Test statistique.....	125
3.3.2	Notion de la puissance d'un test.....	126
3.3.3	Analyse de variance (ANOVA)	126
3.3.4	Analyse en composante principale	128
3.3.5	Le FDR.....	128
3.4	Résultats.....	129
3.4.1	Protéines majoritaires	130
3.4.2	Protéines minoritaires.....	132
4	Conclusion	135

Chapitre 3 : Etude de l'impact du traitement au bleu de méthylène sur le fibrinogène

1	Le fibrinogène.....	158
1.1	Sa structure	158
1.2	Physiologie de l'hémostase	160
1.3	La cascade de coagulation	162
1.3.1	Son déroulement.....	162
1.3.2	Le fibrinogène et la fibrine.....	162
1.4	Purification du fibrinogène.....	164
1.4.1	Par précipitation	164
1.4.2	Chromatographique liquide.....	165
1.5	La chromatographie d'interaction hydrophobe	167
1.5.1	Généralités.....	167
1.5.2	HIC et approche par hydrophobicité critique.....	168
1.5.3	CHIC et fibrinogène	169
1.6	La chromatographie d'échange ionique	170
1.6.1	Principe.....	171

1.6.2	Les échangeurs ioniques.....	171
1.6.3	L'effet du pH et des sels.....	172
1.6.4	IEX et purification de protéines plasmatiques	174
2	Purification du fibrinogène	175
2.1	Purification par HIC	175
2.2	Purification par IEX.....	177
2.2.1	Validation de la purification.....	180
3	Impact du traitement au bleu de méthylène sur le fibrinogène.....	182
3.1	Etude des modifications induites par le traitement au bleu de méthylène.....	182
3.1.1	Sur le fibrinogène	182
3.2	Etude de la formation du caillot	185
3.2.1	Suivi UV cinétique	186
3.2.2	Les fibrinopeptides : LC-MS.....	187
3.2.3	Analyse FT-ICR du caillot de fibrine.....	189
4	Discussion & Conclusion	190

Chapitre 4 : Etude d'un marqueur de dégradation plasmatique

1	Contexte de l'étude	224
1.1	Marqueur technique de dégradation	224
1.1.1	La « Retinol Binding Protein 4 »	225
1.1.2	La transthyréline.....	226
1.1.3	Le complexe	227
1.1.4	Protéomique et quantification absolue	228
1.1.5	Les stratégies de quantification absolue.....	231
2	Mise en place de la stratégie de quantification AQUA	233
2.1	Démarche générale	234
2.2	La stratégie de quantification AQUA.....	235
2.2.1	Caractérisation de la RBP4 par MS et MS/MS	235

2.2.2	Les peptides AQUA	238
2.2.3	Quantification	242
3	Purification de la RBP4	246
3.1	Point bibliographique	247
3.1.1	Exclusion stérique	248
3.1.2	Précipitation séquentielle	254
3.1.3	Immuno-chromatographie	256
4	Suivi de dégradation plasmatique	261
5	Conclusion	262

Chapitre 5 : Nouvelles matrices pour l'électrophorèse sur gel & application à la séparation d'échantillon plasmatique

1.	L'électrophorèse sur gel et l'analyse protéomique	280
1.1.	Les supports pour l'électrophorèse	280
1.2.	La 2DE : forces et limites de la technique	283
2.	Optimisation de la matrice d'acrylamide traditionnelle	285
2.1.	Contexte de l'étude	285
2.2.	Optimisation de la formulation	286
2.2.1.	Evaluation des différentes masses moléculaires de dextran	287
2.2.2.	Evaluation des gels acrylamide/dextran	292
2.3.	Compatibilité avec les techniques de coloration post-électrophorétiques	295
2.4.	Application à la séparation d'un échantillon de plasma	296
3.	Evaluation d'une nouvelle matrice pour l'analyse protéomique	298
3.1.	Contexte de l'étude	298
3.2.	Caractéristiques du N-acryloyl-tris(hydroxylméthyl) aminométhane (NAT)	299
3.3.	Evaluation des propriétés électrophorétiques	300
3.3.1.	1D SDS-PAGE	300
3.3.2.	Extraction protéine/peptide	303

3.4.	2D SDS-PAGE	305
3.5.	Applications.....	308
3.5.1.	Etude de protéines minoritaires plasmatiques	308
3.5.2.	Comparaison des profils électrophorétiques	311
4.	Conclusion	312
1	Préparation des échantillons avant analyse.....	341
1.1	Modification <i>in-vitro</i>	341
1.2	Préparation de plasmas	342
1.2.1	Déplétion des protéines abondantes	342
1.2.2	Purification du fibrinogène.....	343
1.2.3	Isolement de la RBP4	346
1.3	Dosage de protéines.....	348
1.3.1	Méthode de Lowry	348
1.3.2	Méthode de Bradford	348
1.4	Dessalage des échantillons	349
2	Séparation électrophorétique, révélation post-électrophorétique et analyse d'images	349
2.1	Gel d'électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)	349
2.2	Gel d'électrophorèse bidimensionnelle	350
2.3	Coloration post-électrophorétique	351
2.4	Analyse d'image des gels d'électrophorèse.....	351
3	Hydrolyse enzymatique	351
3.1	Hydrolyse enzymatique d'un échantillon protéique : digestion en solution	351
3.2	Hydrolyse enzymatique de protéines séparées sur gel d'électrophorèse.....	352
4	Analyse par spectrométrie de masse	353
4.1	Analyse par MALDI-TOF MS	353
4.2	Analyse par MALDI –TOF/TOF MS	353
4.3	Analyse par couplage nanoLC-nanoESI – MS/MS	354
4.3.1	NanoLC	354

4.3.2	Analyse par nanoLC-nanoESI-Qq-TOF MS/MS	355
4.3.3	Analyse par nanoLC-nanoESI Qh-FT-ICR.....	356
5	Identification des protéines	357
5.1	Identification protéique par les empreintes peptidiques des protéines	357
5.2	Identification protéique par données MS/MS.....	357
6	Quantification AQUA.....	358

Introduction générale

En 2010, plus de trois millions de dons de sang ont été réalisés en France, ce qui représente deux millions et demi de poches de sang total et plus de quatre cent mille poches de plasma.

La transfusion sanguine : ses grandes étapes (figure 1)

L'aventure de la transfusion sanguine commence en 1628, lorsqu'un médecin anglais William Harvey décrit la circulation sanguine. Au cours de l'Histoire, l'Homme n'a eu de cesse de réaliser des expériences à partir du sang. Paré de toutes les vertus, auréolé de magie, parfois aussi synonyme d'effroi, le sang intrigua et inquiéta longtemps. Tentatives infructueuses, percées audacieuses, scandales, interdits et espoirs furent le lot de ceux qui cherchèrent à en lever le mystère jusqu'au début du XXème siècle.

En 1900, l'autrichien K. Landsteiner découvre la notion de différents groupes sanguins (A-AB-B-O), en comparant le sang de différents sujets, jetant ainsi les bases de la transfusion sanguine moderne [1]. Curieusement, l'importance de ses travaux ne fut comprise que beaucoup plus tard [2]. Il ne recevra que trente ans plus tard le prix Nobel de médecine et de physiologie.

Avec la première guerre mondiale, la notion de conservation du sang émerge. Les militaires doivent faire preuve d'une grande rapidité pour agir avant la coagulation du sang prélevé. En 1917, un anticoagulant de synthèse à base de citrate est mis au point. Dans les années 1920, la transfusion sanguine est de plus en plus utilisée. Des structures se mettent en place afin d'exploiter le potentiel et les connaissances en cours d'acquisition. En 1928, la Société des Nations adopte la nomenclature ABO, d'après les trois lettres utilisées pour

Introduction générale

définir les groupes sanguins. La même année en France, A. Tzanck ouvre le premier centre de transfusion sanguine à l'hôpital Saint-Antoine à Paris. Au cours de cette décennie, aux USA, en Grande-Bretagne et en France, plusieurs dizaines de milliers de transfusions ont été pratiquées. Toutefois, plus on a recourt au sang, plus on se confronte aux difficultés liées à son utilisation, au premier rang desquelles se pose le problème de sa conservation. Des idées fleurissent rapidement. Parmi elles, l'utilisation du plasma dont le stockage est plus facile.

En 1940, K. Landsteiner et A. Wiener découvrent le facteur rhésus [3] et mettent en avant son importance. Les transfusions deviennent de plus en plus sûres pour les receveurs. La même année, aux Etats-Unis, E. Cohn met au point une technique de fractionnement du plasma en ses différentes protéines [4] permettant ainsi la préparation de l'albumine. Le fractionnement du plasma est né ; la technique de Cohn reste encore employée de nos jours permettant la purification d'un grand nombre de protéines plasmatiques. Dans le même temps, C. Drew conceptualise et organise la première banque du sang permettant d'apporter du sang aux Britanniques durant la seconde guerre mondiale. De plus, dans le cadre de l'effort de guerre, J.F. Loutit et P. Mollison mettent au point « la » solution de conservation (dite « ACD ») contenant de l'Acide citrique, du Citrate et du Dextrose [5]. Elle permet de conserver le sang total pendant 21 jours. Cette solution ACD est encore très largement utilisée aujourd'hui dans la pratique transfusionnelle.

L'après-guerre voit deux autres étapes décisives pour le développement de la transfusion. Tout d'abord, les travaux de C. Walter et W. Murphy publiés en 1952 décrivent la première poche de sang en matière plastique [6]. De plus, la pratique de la transfusion dans les hôpitaux devient routinière. Le sang collecté est soumis à une série d'analyses pour s'assurer de la compatibilité entre le receveur et le donneur. En effet, J. Dausset met en avant en 1958 les groupes tissulaires HLA (Human Leucocyte Antigen) [7] ouvrant ainsi la voie aux premières greffes d'organes. Il recevra le prix Nobel de médecine en 1980.

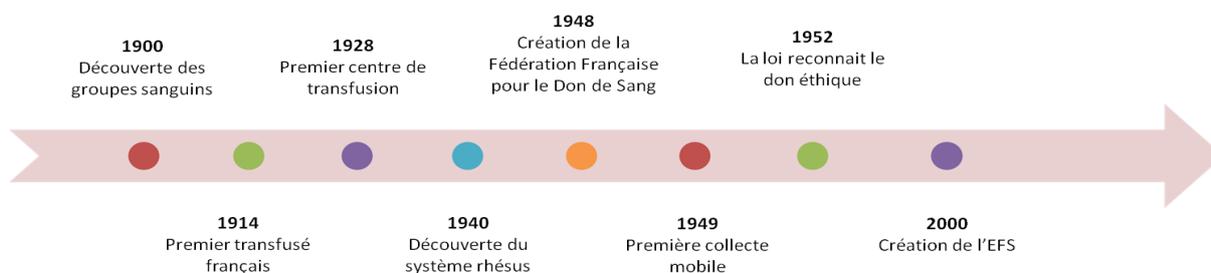


Figure 1 : Les grandes dates de la transfusion sanguine

L'Etablissement Français du Sang (EFS)

En 1949, A. Tzanck crée le Centre National de Transfusion Sanguine à Paris. La première collecte a été organisée la même année pour répondre aux besoins en plasma d'ouvriers brûlés par l'explosion de leur usine. A cette époque, le don de sang (ou de plasma) est rémunéré. A. Tzanck milite pour que ce geste devienne gratuit et volontaire. Ainsi, en 1950, la Fédération Française de Donneurs de Sang Bénévoles est créée. Deux ans plus tard, le Parlement vote la première loi sur la transfusion sanguine précisant que « le sang et ses dérivés ne sont pas des médicaments, ne constitue pas un bien du commerce, comme issus du corps humain ». Cette loi et ses circulaires d'applications régissent l'organisation de la transfusion jusqu'en 1993. La loi du 4 janvier 1993, inhérente à la sécurité en matière de transfusion sanguine et de médicament, instaure une nouvelle organisation.

L'Etablissement Français du Sang est créé le 1^{er} janvier 2000, en application de la loi du 1^{er} juillet 1998. Il est placé sous la tutelle du ministère en charge de la Santé. Cette nouvelle entité regroupe 17 établissements répartis sur tout le territoire français [8]. Opérateur unique de la transfusion sanguine en France, l'EFS dispose du monopole des activités de collecte, de préparation, de qualification et de distribution des produits labiles sanguins aux 1900 établissements de soins utilisateurs. Il assure également l'approvisionnement en plasma du Laboratoire Français du Fractionnement qui fabrique les médicaments dérivés du sang. L'EFS est chargé de l'ensemble des activités de médecine transfusionnelle : prélèvement, préparation, qualification, distribution des produits sanguins labiles (PSL) et immuno-hématologie receveurs. Sa mission principale, en termes de transfusion sanguine, est donc d'assurer la mise à disposition des produits sanguins labiles au plan national. C'est ainsi le plus grand laboratoire d'analyses de biologie médicale en France.



Figure 2 : Les 17 établissements régionaux de l'EFS

Evolution des techniques de préparation des produits sanguins labiles : inactivation des pathogènes dans les produits sanguins labiles

Des progrès significatifs en matière de réduction de risque de transmission d'agents pathogènes chez les receveurs ont été réalisés au cours des vingt dernières années. Dans les pays industrialisés, le risque transfusionnel est relativement faible grâce aux systèmes de sélections des donneurs et aux méthodes de détection ce qui conduit à la destruction des produits issus de dons dont le résultat est positif aux différents marqueurs sérologiques testés. Jusqu'à présent, la stratégie a été, d'une part, de renforcer la sélection des donneurs et, d'autre part, de développer ainsi que de mettre en place des méthodes de détection des agents pathogènes [9-12]. Néanmoins, il reste encore un risque résiduel de transfusion de ces agents par transfusion [13].

Par ailleurs, les dernières années ont vu la nécessité de prévenir le risque des agents pathogènes émergents pouvant poser de graves problèmes transfusionnels dans les différentes régions du monde, tels que le West Nile Virus, le virus du syndrome respiratoire aigu sévère (Sras) ou le virus du Chikungunya [13]. De fait, au vu du nombre important d'agents pathogènes connus et de l'émergence continue de nouveaux pathogènes, la mise en place systématique de nouvelles méthodes de détection n'est pas envisageable. Les procédés d'inactivation constituent alors une stratégie contre les agents pathogènes connus, émergents

Introduction générale

et ceux encore non-identifiés [9-13]. En effet, bien que la sécurité transfusionnelle soit améliorée, la détection des agents pathogènes reste une démarche réactive car les méthodes n'existent qu'une fois le pathogène identifié. En revanche, l'inactivation des agents pathogènes est au contraire une démarche proactive permettant d'éliminer les éventuels pathogènes. La plupart des méthodes existantes et en cours de développement agissent sur les acides nucléiques de ces pathogènes et permettent ainsi l'inactivation d'un large spectre d'agents pathogènes présents dans les produits sanguins. Cependant, de telles méthodes ne sont mises en place qu'une fois leur efficacité et leur absence de toxicité démontrées [9-12].

Le principe de toute technique d'inactivation est d'utiliser un agent inactivant capable de détruire ou de réduire la charge virale d'agents pathogènes intra- ou extra-cellulaires présents dans les produits sanguins labiles [14]. Les techniques d'inactivation doivent de plus éviter toute altération chimique ou biologique significative avec des produits thérapeutiques. La plupart des techniques d'inactivation utilisent des agents ayant pour cible les membranes ou les enveloppes des agents pathogènes ou leurs acides nucléiques. Il s'agit de traitements (i) physiques comme la filtration pour la déleucocytation des PSL et la pasteurisation, (ii) photochimiques utilisant une molécule photosensible et un rayonnement UV ou (iii) encore biochimiques faisant appel à des solvants et des détergents.

La protéomique

La protéomique est une science récente qui étudie les protéines. Le terme « protéome », proposé en 1995 [15, 16] désigne l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe à un moment précis de son développement et dans des conditions données.

Même si le séquençage du génome humain est aujourd'hui achevé, l'étude du génome comporte des limites. Sa connaissance ne permet pas d'accéder à la complexité du fonctionnement cellulaire. Un même génome conduit à l'expression de plusieurs protéomes en fonction des étapes du cycle cellulaire, de l'état physiopathologique de la cellule, de sa localisation, etc. Enfin, les protéines peuvent subir de nombreuses modifications qui ne sont pas nécessairement identifiables à partir de la seule séquence de leur gène.

L'analyse protéomique permet donc une description dynamique de la régulation de l'expression génique grâce à l'étude des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles. Elle trouve deux champs d'application : d'une part, l'identification des

Introduction générale

protéines pour un organisme donné (localisation intracellulaire, interactions protéine-protéine) et d'autre part, la connaissance des niveaux d'expression des protéines.

Au carrefour de la biologie et de la chimie analytique, l'analyse protéomique repose sur un ensemble de méthodologies : des techniques séparatives (électrophorèse mono- et bidimensionnelle, chromatographie des protéines, nanochromatographie pour les peptides), la spectrométrie de masse (MALDI-TOF et TOF/TOF, nanoLC-nanoESI-qQ-FTICR-MS) et des outils bio-informatiques incluant serveurs et logiciels de traitement des données. Dans sa configuration la plus courante, l'analyse protéomique allie l'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) à la spectrométrie de masse.

La protéomique et la médecine transfusionnelle

Bien que la protéomique ait été déjà utilisée pour l'étude du plasma dès ses prémises, son application au domaine de la médecine transfusionnelle n'est que très récente. Enucléés, les globules rouges [17-19] et les plaquettes [20, 21] furent les premiers étudiés par analyse protéomique car les analyses génomiques étaient impossibles.

Le recours à l'analyse protéomique apparaît évident voire même incontournable pour l'étude du plasma transfusionnel. En effet, les agences de sécurité sanitaire (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) pour la France, Food and Drug Administration (FDA) pour les Etats-Unis) imposent une caractérisation de plus en plus complète des composés d'origine biologique destinés à l'utilisation chez l'Homme. Préserver et assurer la qualité transfusionnelle du plasma est un objectif majeur pour l'EFS. Après collecte, le plasma est stocké et/ou subit différents traitements d'inactivation virale. Même si les études visant à caractériser ces différents plasmas traités sont abondamment documentées, la littérature fait très peu état d'études utilisant l'analyse protéomique. De plus, si chaque procédé mis en place aboutit à une inactivation satisfaisante d'un point de vue sanitaire et transfusionnel, les études menées ne permettent pas de rendre compte des effets susceptibles de ces traitements à l'échelle des protéines. Grâce aux techniques qu'elle met en œuvre, l'analyse protéomique offre des possibilités tant d'études qualitatives que quantitatives, et rend possible la comparaison des différents traitements appliqués au plasma destiné à la transfusion.

Introduction générale

L'objectif de ce travail de thèse est donc de caractériser par une approche protéomique les modifications des protéines d'intérêt transfusionnel en fonction des conditions de conservation et des méthodes d'inactivation vis-à-vis des agents pathogènes. Les axes de recherche qui seront développés ont pour vocation de fournir (i) des études complètes afin de mesurer l'impact des traitements d'atténuation et de conservation tant dans le cadre d'une approche globale que ciblée, (ii) des outils analytiques robustes pouvant être transférés dans les centres régionaux de l'EFS pour évaluer la qualité en routine des plasmas destinés à la transfusion.

Ainsi, les travaux présentés s'articulent selon cinq chapitres. Le premier chapitre introductif aura pour but de démontrer l'apport de l'analyse protéomique dans l'étude du plasma transfusionnel. La méthodologie de l'analyse protéomique et les différents outils qu'elle met en œuvre seront présentés ainsi que les différents traitements d'inactivation des agents pathogènes actuellement appliqués au plasma. Il exposera également les attentes de la médecine transfusionnelle auxquelles la protéomique peut apporter des réponses.

Le deuxième chapitre proposera une étude globale de l'impact du traitement d'inactivation utilisant le bleu de méthylène sur les protéines plasmatiques. Après avoir introduit les caractéristiques du bleu de méthylène, la première partie de cette étude consistera en une étude préliminaire de protéines standards exposées au bleu de méthylène afin d'appréhender les modifications éventuellement induites au cours de ce traitement. La deuxième partie concernera alors la quantification relative *label-free* d'échantillon avant et après traitement au bleu de méthylène. Cette approche utilise des analyses LC-MS/MS à haute résolution et un traitement statistique des données, dont on précisera les caractéristiques.

Le troisième chapitre s'intéressera plus en détails à l'impact du traitement au bleu de méthylène sur le fibrinogène, protéine-clé de la cascade de coagulation. En effet, ce traitement est connu pour altérer l'activité du fibrinogène, mais sans en expliquer la cause. Cette nouvelle étude aura donc pour but de faire le lien entre les modifications observées sur le fibrinogène après traitement et sa perte d'activité au cours du traitement d'inactivation. Elle mettra, tout d'abord, en place une méthode de purification du fibrinogène. Elle comparera également les résultats obtenus par des analyses nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS effectuées sur des digests de fibrinogène purifié avant et après traitement. On s'intéressera également à la caractérisation de la fibrine, produit de conversion du fibrinogène, et des fibrinopeptides, générés au cours de la coagulation.

Le quatrième chapitre sera, quant à lui, dédié à l'impact des conditions de conservation et de stockage sur l'intégrité des protéines plasmatiques. Il s'intéressera à un nouveau

Introduction générale

marqueur de dégradation plasmatique, observé au cours d'une étude de dégradation thermique : la « retinol binding protein IV ». Nous avons donc, une nouvelle fois, cherché à mettre en place une méthode de purification ainsi qu'une stratégie analytique permettant la quantification absolue de cette protéine.

Enfin, le cinquième et dernier chapitre proposera des travaux de développements méthodologiques liés à l'électrophorèse bidimensionnelle, destinés à améliorer la séparation d'échantillons de plasma. Deux approches seront ainsi utilisées afin de proposer deux supports polymériques innovants, dont les performances en termes de séparation électrophorétique sont également présentées. Le premier présentera une formulation optimisée qui utilise l'incorporation d'un polymère préformé à la solution d'acrylamide avant polymérisation. Issu d'une collaboration de longue date avec la société Elchrom Scientific, le deuxième support intègre un N-dérivé d'acrylamide dans sa formulation.

Bibliographie

1. Landsteiner K: Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Centralblatt für Bacteriologie* 1900; **27**:357-62.
2. Schwarz H, Doner F: Historical review: Karl Landsteiner and his major contributions to haematology. *British Journal of Haematology* 2003; **121**:556-65.
3. Landsteiner K, Wiener A: An agglutinable factor of human blood recognizable by immune sera for rhesus blood. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1940; **43**:223.
4. Cohn E, Luetscher J, Oncley J, Armstrong S, Davis B: Preparation and properties of serum and plasma proteins : Size and charge of proteins separating upon equilibration across membranes with ethanol-water mixtures of controlled pH, ionic strength and temperature *Journal of the American Chemical Society* 1940; **62**:3396-33400.
5. Loutit J, Mollison P: Advantages of a disodium citrate-glucose mixture as a blood preservative *British Medical Journal* 1943; **II**:744-5.
6. Walter C, Murphy WJ: A closed gravity technique for the preservation of whole blood in ACD solution utilizing plastic equipment. 1952; **94**:681-892.
7. Dausset J, Colombani J: Importance des anticorps anti-leucocytaires et anti-plaquettaires en pratique transfusionnelle. *Transfusion* 1958; **1**:249-64.
8. David B: L'EFS vous connaissez ? *Réanimation* 2008; **17**:418-25.
9. Klein HG, Anderson D, Bernardi M-J, et al.: Pathogen inactivation: making decisions about new technologies. *Transfusion* 2007; **47**:2338-47.
10. McCullough J: Pathogen inactivation: a new paradigm for blood safety. *Transfusion* 2007; **47**:2180-4.
11. Webert KE, Cserti CM, Hannon J, et al.: Proceedings of a Consensus Conference: Pathogen Inactivation--Making Decisions About New Technologies. *Transfusion Medicine Reviews* 2008; **22**:1-34.
12. Wu YY, Snyder EL: Safety of the blood supply: role of pathogen reduction. *Blood Reviews* 2003; **17**:111-22.
13. Alter HJ, Klein HG: The hazards of blood transfusion in historical perspective. *Blood* 2008; **112**:2617-26.
14. Naegelen C, Isola H, Dernis D, et al.: Evolution of techniques for preparation of labile blood products (LBP): pathogen inactivation in LBP. *Transfusion Clinique et Biologique* 2009; **16**:179-89.
15. Kahn P: Molecular Bioogy : From genome to proteome: Looking at a cell's proteins. *Science* 1995; **270**:369-70.
16. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, et al.: From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Arnino Acid Analysis. *Nature Biotechnology* 1996; **14**:61-5.
17. D'Alessandro A, Righetti PG, Zolla L: The Red Blood Cell Proteome and Interactome: An Update. *Journal of Proteome Research* 2009; **9**:144-63.
18. Goodman SR, Kurdia A, Ammann L, Kakhniashvili D, Daescu O: The Human Red Blood Cell Proteome and Interactome. *Exp Biol Med* 2007; **232**:1391-408.

Introduction générale

19. Pasini EM, Mann M, Thomas AW: Red blood cell proteomics. *Transfusion Clinique et Biologique* 2010; **17**:151-64.
20. Schubert P, Devine DV: Proteomics meets blood banking: Identification of protein targets for the improvement of platelet quality. *Journal of Proteomics* 2010; **73**:436-44.
21. Senzel L, Gnatenko DV, Bahou WF: The platelet proteome. *Current Opinion in Hematology* 2009; **16**:329-33.

Chapitre 1

Analyse protéomique & Médecine transfusionnelle

Sommaire

1	Le plasma transfusionnel	33
1.1	Le plasma humain.....	33
1.2	Le protéome du plasma.....	34
1.3	Les traitements d'inactivation des agents pathogènes	36
1.3.1	Plasma viro-atténué par solvant-détergent	37
1.3.2	Plasma viro-atténué par traitement photochimique.....	38
1.3.3	Pasteurisation du plasma	39
1.4	Mode de conservation et stockage.....	40
2	L'analyse protéomique appliquée à l'étude de plasma	41
2.1	L'électrophorèse sur gel	42
2.1.1	La matrice.....	42
2.1.2	L'électrophorèse monodimensionnelle	43
2.1.3	L'électrophorèse bidimensionnelle	45
2.1.4	Techniques de détection post-électrophorétiques	46
2.2	La spectrométrie de masse.....	47
2.2.1	Les sources les plus utilisées en protéomique	48
2.2.2	Les analyseurs	55
2.3	Couplage avec la nano-chromatographie liquide (nanoLC).....	69
2.3.1	La nanoLC.....	69
2.3.2	Le mode « préconcentration ».....	70
2.3.3	Les nanocolonnes	71
2.4	Identification des protéines.....	71
2.4.1	Stratégie « Bottom-Up »	71
2.4.2	Stratégie « Top-Down »	74
3	La protéomique du plasma et médecine transfusionnelle	74
3.1	La protéomique du plasma	75

Chapitre 1

- 3.2 Impact des traitements d'inactivation sur les protéines plasmatiques 77
- 3.3 Impact de la conservation et des conditions destockage du plasma transfusionnel .. 78

Bibliographie - Annexes

Table des figures

Figure 1.1 : Les principales protéines plasmatiques [1].....	34
Figure 1.2 : Les intervalles de référence de 70 protéines dans le plasma. L'abondance est représentée sur une échelle étendue sur 12 ordres de grandeur [2].....	36
Figure 1.3 : Polymérisation du polyacrylamide pour la préparation de gel d'électrophorèse..	42
Figure 1.4 : Schéma de la 2DE (adaptée de [28])	46
Figure 1.5 : Les principaux éléments d'un spectromètre de masse	47
Figure 1.6 : Principe de l'ionisation MALDI.....	49
Figure 1.7 : Schéma simplifié du fonctionnement d'une source électrospray (d'après [51]) ...	51
Figure 1.8 : Les deux théories de la formation d'ions désolvatés, en phase gazeuse à partir de gouttelettes chargées	52
Figure 1.9 : Exemple de déconvolution. En haut, le spectre de masse nanoESI-Qh-FT-ICR de l'Apolipoprotéine A-1. En bas, massif isotopique correspondant après déconvolution avec l'application MaxEntropy (BrukerDaltonics).	53
Figure 1.10 : Schéma du fonctionnement de l'analyseur TOF en configuration linéaire.	56
Figure 1.11 : Schéma du fonctionnement de l'analyseur TOF en configuration réflectron.....	57
Figure 1.12: Schéma du Voyageur 4800 (adapté de la documentation Applied Biosystems). 58	
Figure 1.13 : Schéma d'un analyseur quadripolaire	59
Figure 1.14 : Diagramme de stabilité en fonction de U_{DC} et V_{RF} pour des ions de masses différentes ($m_1 < m_2 < m_3$). En faisant varier U de façon linéaire en fonction de V , on obtient une droite d'opération qui permet d'observer les ions de façon sélective. Une droite de pente plus grande donne une meilleure résolution, tant qu'elle traverse le diagramme de stabilité. En maintenant $U = 0$, la résolution est nulle : tous les ions ont une trajectoire stable, tant que V reste dans le domaine de stabilité [63, 64]	60
Figure 1.15 : Schéma d'un analyseur de type triple-quadripolaire, comprenant deux filtres de masses (Q1 et Q3), et d'une cellule de collision (q2)	61
Figure 1.16 : Spectromètre de masse hybride Q-TOF composé d'un analyseur quadripolaire (Q1), d'une cellule de collision (q2, qui est souvent un hexapôle) et d'un tube de vol orthogonal.....	62
Figure 1.17 : Spectromètre de masse nanoESI-FT-ICR Bruker Daltonics 9,4 T.....	63
Figure 1.18 : Mouvement cyclotron d'un ion dans un champ magnétique.....	64
Figure 1.19 : Schéma de la cellule ICR cubique simple ou "piège de Penning" [70].....	64
Figure 1.20 : Principe du piégeage dynamique des ions	66

Chapitre 1

Figure 2.21 : Configuration de la boucle d'injection en mode "pré-concentration"	70
Figure 1.22 : L'approche Bottom-Up	72
Figure 1.23 : Voies de fragmentation peptidique	73
Figure 1.24 : Evolution du nombre de publications associant les termes "proteomics" et "plasma", au cours de ces treize dernières années.....	75

Table des annexes

Annexe 1.1: Liste de 289 protéines identifiées dans le plasma en 2002 [2]	88
Annexe 1.2 : Niveau d'inactivation du traitement « Solvant – Détergent »	89
Annexe 1.3 : Niveau d'inactivation du traitement de la pasteurisation	89
Annexe 1.4 : Niveau d'inactivation du traitement au bleu de méthylène	90
Annexe 1.5 : Niveau d'inactivation du traitement par l'amotosalen.....	91

Chapitre 1

Analyse protéomique & Médecine transfusionnelle

L'objectif de ce chapitre est de démontrer l'apport de l'analyse protéomique dans l'étude du plasma transfusionnel en présentant les différents outils et stratégies qu'elle peut mettre en œuvre.

1 Le plasma transfusionnel

D'un point de vue de la collecte, le plasma peut être obtenu soit par centrifugation à partir du sang, soit par plasmaphérèse qui est une technique extracorporelle permettant de prélever du plasma à partir de sang total prélevé et dont les autres composants sanguins sont réinjectés au donneur.

1.1 Le plasma humain

Le plasma est la partie liquidienne du sang dans lequel baignent les cellules sanguines (hématies, leucocytes et plaquettes) ; il représente 55% du volume sanguin total. On retrouve entre 2750 à 3300 mL de plasma chez l'adulte. Composé à 90% d'eau, il sert de milieu de

transport et d'échange de nombreux composés vers les cellules de l'organisme. Liquide jaune légèrement translucide, le plasma sanguin contient un grand nombre de solutés :

- Les solutés minéraux (oligo-éléments et ions). La concentration totale des ions dissous est un facteur important dans le maintien de l'équilibre osmotique du sang. En effet, certains ions ont également un effet tampon qui contribue à maintenir le pH du sang entre 7,35 et 7,45. Ils sont par ailleurs indispensables à la communication cellulaire et à l'activité enzymatique.

- Les gaz du sang. Il s'agit principalement d'oxygène et de dioxyde de carbone dissous dans le sang circulant dans les veines et les artères. Ils permettent d'apprécier l'équilibre acido-basique de l'organisme et de surveiller l'hématose (oxygénation du sang).

- Les solutés organiques (substances en transit (nutriments, métabolites et hormones) et protéines plasmatiques). Ensemble, les protéines plasmatiques ont un effet tampon qui contribue également à maintenir le pH constant, mais aussi à équilibrer les pressions osmotique et oncotique et à conférer sa viscosité au sang.

1.2 Le protéome du plasma

La quantité physiologique normale de protéines présentes dans le plasma oscille entre 60 et 80 mg/mL. Dix protéines représentent à elles seules 90% des protéines plasmatiques. L'albumine constitue à elle seule plus de 50% des protéines totales (Figure 1.1).

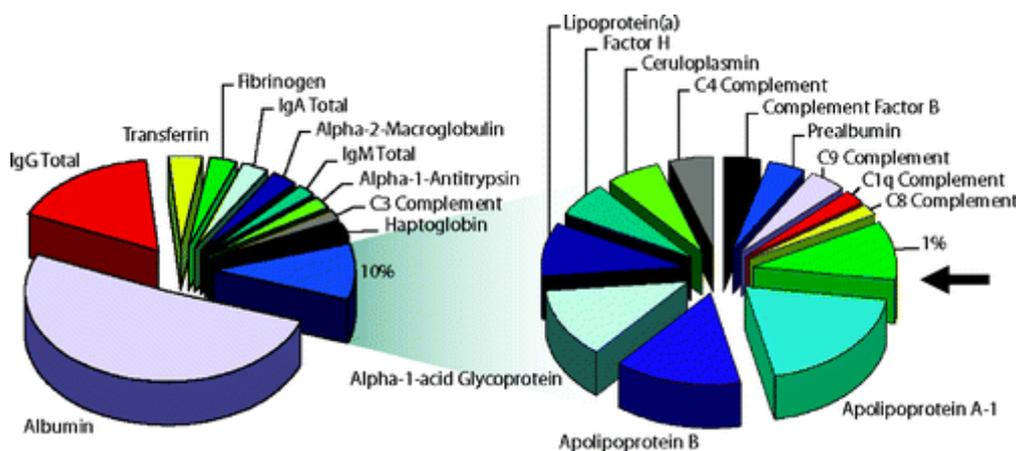


Figure 1.1 : Les principales protéines plasmatiques [1]

En 2002, une classification des protéines plasmatiques basée sur leur fonction a été proposée par Anderson [2]:

- Les protéines sécrétées par les tissus. Elles acquièrent leur fonction biologique dans le plasma dont la plupart est sécrétée par le foie et les intestins.

Chapitre 1

- Les immunoglobulines. Bien que les anticorps acquièrent leur fonction dans le plasma, ils constituent une classe unique par leur complexité.
- Les récepteurs de ligands distants de type hormones. Leur masse moléculaire détermine l'échelle de temps du contrôle de leur action (les modifications de leur taux sont plus rapides pour les petites hormones, et plus longs pour les hormones plus grosses).
- Les récepteurs locaux. Cette classe englobe les cytokines et les médiateurs chimiques. Ce sont généralement des petites molécules qui possèdent une action locale de courte durée.
- Les protéines en transit qui circulent dans le plasma de leur lieu de synthèse et de sécrétion jusqu'à leur site d'action.
- Les produits de dégradation. Cette classe contient des protéines actives à l'intérieur des cellules mais qui peuvent se retrouver dans le sang à la suite de la mort des cellules ou de leur altération. Ils représentent la source de potentiels biomarqueurs de pathologies.
- Les sécrétions aberrantes issues de tumeurs ou d'autres tissus malades, notamment les marqueurs de cancers.
- Les protéines étrangères provenant d'organismes infectieux, de parasites, de pathogènes qui les relarguent dans le plasma.

Cependant, il est important de préciser que chaque protéine possède une demie-vie spécifique en relation avec la masse moléculaire, elle-même régulée par la filtration glomérulaire (le glomérule rénal filtre toute molécule inférieure à 45 kDa).

Une détermination du nombre exact de protéines que peut contenir une telle matrice n'a jamais pu être effectuée. Une estimation simple peut en donner une approximation : tout d'abord si l'on se base sur la classification de Putnam [3] qui estime à environ 500 « vraies » protéines présentes sous 20 formes glycosylées possibles et de 5 tailles différentes (dont les précurseurs, les formes matures, les produits de dégradations, les variants épissés) : cela représenterait pas moins de 50 000 formes moléculaires différentes. Ensuite, si l'on tient compte de l'importance des produits relargués par les tissus, soit l'intégralité du protéome (soit 50 000 produits de gène possédant en moyenne une dizaine de variants d'épissage subissant des modifications post-traductionnelles, des clivages enzymatiques, etc.), on parvient alors à 500 000 formes protéiques différentes. Enfin, à ces deux précédentes catégories, il faut ajouter la classe des immunoglobulines pouvant contenir jusqu'à dix millions de séquences différentes [2].

Enfin, Anderson et al. s'est basé sur les protéines de référence et leur intervalle de référence clinique pour établir la gamme dynamique quantitative du plasma, comme l'illustre

la Figure 1.2 [2]. Du coté des protéines les plus abondantes, on retrouve l'albumine sérique (intervalle normal clinique : 35 – 50 mg/mL, soit 35 - 50 x 10⁹ pg/mL) qui est mesurée dans le cas de dysfonctionnement du foie ou de malnutrition. A l'opposé, l'interleukine 6 (intervalle normal clinique : 0 - 5 pg/mL) est mesurée comme indicateur d'inflammation ou d'infection. En termes d'abondance plasmatique, ces deux protéines sont séparées par un facteur 10¹⁰. Ainsi à titre d'exemple, rechercher une molécule d'une protéine avec une concentration de 10 pg/mL parmi les molécules d'albumines présentes à 55 mg/mL équivaut à rechercher un être humain parmi toute la population mondiale (1 parmi 6,9 milliards de personnes).

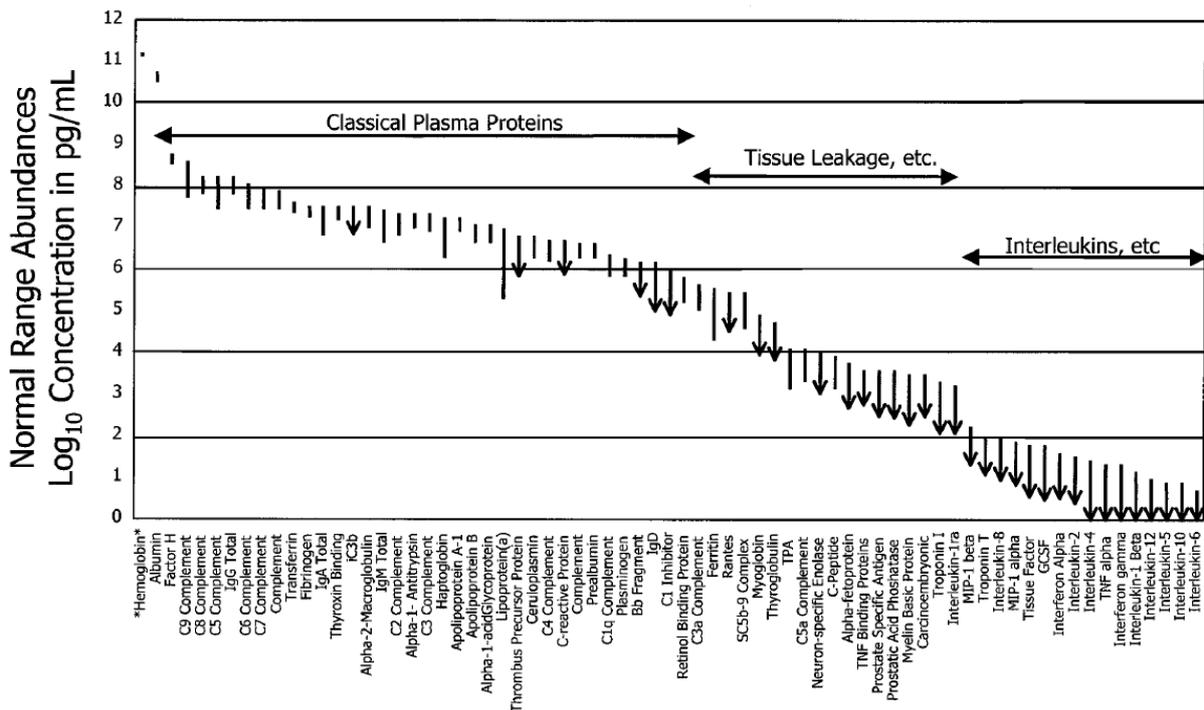


Figure 1.2 : Les intervalles de référence de 70 protéines dans le plasma. L'abondance est représentée sur une échelle étendue sur 12 ordres de grandeur [2].

1.3 Les traitements d'inactivation des agents pathogènes

Les techniques d'inactivation des agents pathogènes dans les produits sanguins labiles apparaissent comme la nouvelle stratégie permettant d'augmenter la sécurité transfusionnelle face aux risques de transmission. Différentes techniques ont été déjà validées en France ou sont en cours de développement [4]. Elles s'appliquent pour la préparation du plasma ou les concentrés plaquettaires. Les mécanismes d'action ainsi que l'efficacité d'inactivation (ou d'atténuation) des agents pathogènes varient en fonction des différentes techniques. Chacune d'elles constitue un procédé de préparation composé d'opérations unitaires dont il faut s'assurer de la maîtrise afin de garantir la qualité et l'efficacité transfusionnelle du produit

traité. Le niveau d'inactivation est évalué en mesurant le \log_{10} de réduction de la charge virale ; celui-ci doit être au moins de 4 \log_{10} .

La méthode la plus simple pour assurer la sûreté bactériologique du plasma est le traitement systématique qui consiste tout d'abord en une conservation du sang total six heures entre +20 et +24°C avant la déleucocytation afin de permettre une éventuelle phagocytose des bactéries présentes par les leucocytes suivie d'une déleucocytation dans la mesure où ces leucocytes sont des vecteurs de virus potentiels. Le plasma est ensuite congelé et conservé entre -40 et -30°C pendant 120 jours, durée qui couvre la fenêtre sérologique. Cette technique s'est malheureusement révélée insuffisante et les techniques d'inactivation des pathogènes dans les PSL apparaissent comme la nouvelle stratégie permettant d'augmenter la sécurité transfusionnelle face aux risques de transmission d'agents pathogènes par les PSL. Différentes techniques sont en place et utilisées à l'heure actuelle en France [5-8]: il s'agit de techniques biochimiques, photochimiques ou encore physiques. Les annexes 1.2 à 1.5 récapitulent les cibles et le niveau d'inactivation de chaque traitement.

1.3.1 Plasma viro-atténué par solvant-détergent

La méthode d'inactivation des agents pathogènes par solvant-détergent (SD) a été initialement utilisée pour la fabrication de médicaments dérivés du sang et a constitué une avancée importante dans la sécurité virale. Cette méthode a ensuite été appliquée au plasma. La méthode SD est l'une des méthodes biochimiques la plus étudiée et utilisée depuis 1985 pour le traitement des facteurs de l'hémostase [7, 9]. En effet, le traitement « solvant-détergent » cible les virus enveloppés potentiellement présents dans le plasma (VIH-1, VIH-2, cytomégalovirus, virus de l'hépatite A, B et C), mais également les bactéries car le processus de production inclut une filtration stérilisante. Plusieurs combinaisons de solvant et de détergent ont été testées ; le traitement SD actuellement le plus utilisé met en œuvre le tri-(n-butyl)-phosphate associé au Triton X-100. Cette méthode s'effectue sur un mélange de plasmas issus de plusieurs donneurs [10]. En pratique, après homogénéisation du mélange et ajustement du pH par addition de tampon phosphate, sont ajoutés le Tri-N-butyl phosphate ou Tnbp (solvant) et le Triton X-100 (détergent) qui restent en contact sous agitation constante pendant quatre heures à 30 °C. L'élimination du Tnbp et du Triton au cours du procédé de préparation se fait, d'une part, par adsorption sur phase lipidique grâce à l'utilisation d'huile de ricin et, d'autre part, par chromatographie hydrophobe. Après élimination de ces agents inactivateurs, des poches de 200 mL sont remplies aseptiquement de plasma, puis congelées.

Depuis 1992, l'unité de production de l'EFS Aquitaine-Limousin permet de fournir la France en plasma viro-atténué par solvant-détergent.

1.3.2 Plasma viro-atténué par traitement photochimique

Les techniques photochimiques utilisent une molécule photosensible et un rayonnement UV. Sous l'action du rayonnement, la molécule induit la formation d'un photo-produit qui agit de manière irréversible sur les acides nucléiques. Leur mode d'action varie en fonction des techniques.

1.3.2.1 Plasma viro-atténué par le bleu de méthylène

La méthode photochimique la plus utilisée en France pour l'inactivation virale du plasma est celle qui utilise le bleu de méthylène (BM), un colorant de la famille des phénothiazines [4, 7, 9]. Ce traitement inactive les virus enveloppés (avec des génomes ADN et ARN), certains virus non-enveloppés ainsi que quelques bactéries. Il est exclusivement réservé à l'inactivation virale du plasma. En effet, le bleu de méthylène se fixe à l'ADN en s'intercalant soit entre les deux brins de l'hélice soit simplement à l'extérieur de l'hélice. Sous exposition à un rayonnement UV en présence d'oxygène, une réaction photochimique conduit à des radicaux libres. Ces radicaux libres conduisent à une dénaturation irréversible des acides nucléiques, empêchant ainsi toute duplication des virus. La technique offre l'avantage de pouvoir être appliquée sur des unités de plasma individuelles dans un centre de prélèvement local, aucune mise en pool du plasma étant nécessaire. Le plasma viro-atténué par traitement au bleu de méthylène est produit dans les EFS Bourgogne Franche-Comté, Bretagne, Ile-de-France, Lorraine-Champagne, Nord-de-France, Normandie, Pyrénées-Méditerranée et Rhône-Alpes. Le traitement photochimique au bleu de méthylène sera plus largement abordé dans le chapitre 2.

1.3.2.2 Plasma viro-atténué par amotosalen

Un autre procédé de photo-inactivation utilise l'amotosalen-HCl, une molécule de synthèse appartenant à la famille des psoralènes. Ce sont des composés actifs d'origine végétale qui sont connus depuis très longtemps comme des molécules photosensibles. De par leur structure plane et leur faible masse moléculaire, la pénétration de ces molécules à travers les membranes plasmiques est facilitée. Ce traitement de viro-atténuation inactive un large spectre d'agents pathogènes (virus enveloppés, virus non-enveloppés, bactéries, parasites,

leucocytes résiduels) du plasma et des plaquettes sous irradiation UVA (320-400 nm) [11]. Cette technique a été validée pour le plasma prélevé par aphérèse. L'amotosalen s'intercale entre les branches de l'ADN ou de l'ARN puis, sous l'effet du rayonnement UVA, la molécule se fixe sur les bases pyrimidine de la thymine, rendant ainsi non-fonctionnels ces acides nucléiques car le cross-linking est permanent (une liaison toutes les 83 paires de bases). La réplication ne peut donc plus avoir lieu. Cette méthode a été validée récemment pour l'inactivation des pathogènes pour le plasma issu d'aphérèse et les plaquettes. Elle n'est pas applicable au traitement des globules rouges car l'hémoglobine absorbe le rayonnement UVA. Le plasma viro-atténué par amotosalen est produit dans les EFS Alsace, Auvergne Loire, Centre Atlantique et Réunion.

1.3.3 Pasteurisation du plasma

Enfin, un procédé physique plus récent consiste en la pasteurisation du plasma [12]. En cours de validation auprès des autorités sanitaires, ce traitement soumet un mélange de plasmas obtenus par plasmaphérèse à un chauffage à 60°C pendant 10 heures en présence d'un mélange de stabilisation (saccharose, sorbitol, gluconate de calcium, lysine et arginine) destiné à minimiser la perte d'activité des protéines plasmatiques labiles, principalement les facteurs de coagulation. Le sorbitol empêche la formation d'agrégats protéiques, et permet d'assurer une stabilisation significative de l'activité biologique de la plupart des facteurs de coagulation (facteur VIII, fibrinogène, facteur V, facteur XI et facteur XIII). Le saccharose vient compléter le rôle du sorbitol ; il cible le maintien d'activité coagulante des composants du complexe prothrombique (facteur IX, facteur II). Le calcium présente un effet stabilisateur vis-à-vis de plusieurs facteurs de coagulation (notamment le facteur VIII). La lysine contribue à maintenir l'activité du fibrinogène et du facteur VIII. Enfin, l'arginine contribue à protéger le facteur IX ou des anticoagulants comme la protéine C. Les stabilisants ajoutés sont ensuite éliminés par une étape de dialyse. La stérilité bactérienne du plasma pasteurisé est assurée par filtration (porosité : 0,22 µm)

Cette méthode est appliquée avec succès depuis plusieurs décennies [4] [12, 13] en tant que traitement d'inactivation virale pour divers dérivés plasmatiques (albumine, antithrombine III, alpha I antitrypsine). La littérature fait état de son efficacité à inactiver une large gamme de virus (parvovirus et picornavirus notamment). L'inactivation de plusieurs virus (Sin, HIV-1, PRV par exemple) a récemment été démontrée [14].

1.4 Mode de conservation et stockage

Idéalement, la conservation des produits sanguins doit préserver les propriétés des produits tout en possédant des coûts logistiques contrôlés. Les conditions de stockage sont différentes d'un produit à un autre car chacun possède une température optimale de conservation ; elle a été fixée entre -25 et -30 °C pour le plasma. Le plasma frais congelé (PFC) doit respecter les recommandations établies par le Conseil de l'Europe à ses états membres relatives à sa préparation, son contrôle qualité et son utilisation : sa conservation vise à préserver les qualités fonctionnelles des facteurs de coagulation et la sécurité microbiologique pendant une durée raisonnable (un an maximum).

Le PFC est défini selon la recommandation n° R (86) 6 de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) comme « *un composant sanguin nécessaire pour reconstituer les propriétés coagulantes du sang du malade (propriétés des différentes protéines de la coagulation) et, très occasionnellement, pour rétablir le volume plasmatique du patient* ». Dans des conditions classiques, le plasma transfusionnel, qu'il soit issu d'un donneur unique ou d'un pool de donneurs, doit être congelé et conservé à -30°C assez rapidement après le don afin de conserver l'activité des facteurs de coagulation. Cela requiert d'importants moyens logistiques pour ne pas briser la chaîne du froid. De plus, le temps de décongélation nécessaire avant son utilisation peut se révéler être un handicap dans certaines situations d'urgence. Il subit une étape de « déleucocytation » (diminution pratiquement totale du nombre de leucocyte), de sécurisation (conservé 120 jours en quarantaine avant d'être libéré) ou de viro-atténuation (traitement d'inactivation de pathogènes ou de réduction de charge virale) avant de pouvoir être utilisé à des fins transfusionnelles.

Introduit pendant la seconde guerre mondiale par l'armée américaine, le stockage du plasma transfusionnel sous forme lyophilisée s'est révélé être une option très intéressante pour le traitement de sévères coagulopathies dans des situations d'extrême urgence où le temps de décongélation du PFC peut être un élément fatal dans la survie du malade [15]. Contrairement au PFC, le plasma lyophilisé peut être conservé à température ambiante et être reconstitué peu avant l'acte de transfusion. Cependant, il a arrêté d'être utilisé suite à la découverte du risque de transmission d'agents pathogènes par ces produits. Il est aujourd'hui très rarement employé sauf en Allemagne où son utilisation en association d'un traitement d'inactivation d'agents pathogènes a été validée. Il n'a été démontré aucune efficacité réduite de ce produit comparé au « standard » congelé ni aucune réaction transfusionnelle.

Enfin, ce n'est que très récemment qu'a été émise l'idée de conservation du plasma transfusionnel sous forme liquide à +4 °C (entre +2 et +8 °C) après décongélation d'un PFC même si celui-ci a été conservé plusieurs mois à -30°C [16, 17] .

En effet, en France, son utilisation est limitée à 6 h après sa décongélation complète pour un PFC homologue (jusqu'à 24 heures dans d'autres pays) et jusqu'à 72 h pour un PFC autologue. Le processus de décongélation est également soumis à une réglementation stricte et doit être effectué par le site transfusionnel ou le dépôt de sang. Cela peut entraîner un certain « gaspillage » si l'on considère que c'est un processus assez lent, qui doit donc être planifié (au vue d'une opération à risque par exemple) sans tenir compte des aléas pouvant survenir. Sa re-congélation est interdite. La validation de ce mode de stockage est en cours à l'heure actuelle.

2 L'analyse protéomique appliquée à l'étude de plasma

Le terme « protéome » proposé en 1995 désigne l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu ou encore d'un organe à un moment précis de son développement [18, 19]. L'analyse protéomique permet une description dynamique de la régulation de l'expression génique à partir des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles.

Les protéines peuvent être envisagées comme les effecteurs fonctionnels des gènes. En effet, même si le séquençage du génome humain est aujourd'hui achevé, l'étude du génome comporte des limites. Sa connaissance ne permet pas d'accéder à la complexité du fonctionnement cellulaire. Un même génome conduit à l'expression de plusieurs protéomes en fonction des étapes du cycle cellulaire, de l'état physiopathologique de la cellule, de sa localisation ou des conditions environnementales. Enfin, les protéines peuvent subir de nombreuses modifications qui ne sont pas nécessairement identifiables à partir de la seule séquence de leur gène.

L'analyse protéomique trouve deux champs d'applications : d'une part, l'identification des protéines pour un organisme donné (localisation intracellulaire, interactions protéine-protéine) et d'autre part, la connaissance des niveaux d'expressions des protéines. L'analyse protéomique repose principalement sur une méthodologie couplant l'électrophorèse bidimensionnelle (2DE), technique possédant un pouvoir résolutif très élevé, et la spectrométrie de masse.

2.1 L'électrophorèse sur gel

Développées respectivement dans les milieux des années 1960 [20] et 1970 [21], les électrophorèses mono- et bidimensionnelle (1DE et 2DE) sont les techniques de purification et de séparation de protéines les plus utilisées pour leur haut pouvoir résolutif. L'électrophorèse s'effectue généralement sur gel d'acrylamide, sur lequel les protéines migrent suivant leur point isoélectrique et/ou leur masse.

2.1.1 La matrice

Le support de séparation, ou « matrice », est principalement composé d'acrylamide sous forme polymérisée. La polymérisation du gel (Figure 1.3) s'effectue en présence d'acrylamide, de N,N'-méthylène bis-acrylamide et d'initiateurs de polymérisation (persulfate d'ammonium (APS) et le N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED)).

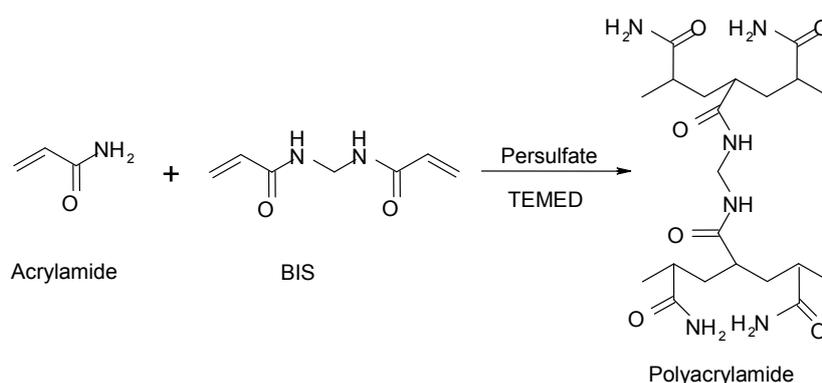


Figure 1.3 : Polymérisation du polyacrylamide pour la préparation de gel d'électrophorèse

Il est important de noter que plusieurs facteurs influent sur la qualité de polymérisation (homogénéité, taux de réticulation) :

- La vitesse de polymérisation varie avec la concentration d'initiateurs, cependant une polymérisation trop rapide (< 10 min) ou trop lente (> 60 min) conduit à une polymérisation non homogène [20].
- L'effet du pH de la solution d'acrylamide peut avoir des répercussions sur la polymérisation. Par exemple, l'APS a une efficacité maximale entre les pH 7 et 10. Pour un pH inférieur, le taux de polymérisation chute. A pH < 4, aucune polymérisation n'est observable.

- La température a un effet non-négligeable sur la polymérisation. Une température élevée favorise une polymérisation rapide et, inversement, une température peu élevée ralentit la vitesse de polymérisation. La température optimale se situe entre 20 et 25 °C. Dans un souci de reproductibilité, les gels doivent être polymérisés toujours à la même température.

La composition de solution d'acrylamide est définie par les lettres T et C selon la nomenclature de Hjerten[22] où T fixe le pourcentage total de deux monomères (acrylamide et N,N'-méthylène bis-acrylamide) en grammes pour 100 mL, et C le pourcentage massique relatif de N,N'-méthylène bis-acrylamide (cross-linker) par rapport à la masse totale de monomères. Le choix de la concentration d'acrylamide est un point essentiel pour optimiser une séparation électrophorétique. Dans la pratique, les concentrations varient en fonction de l'utilisation d'un gel : (i) gel de concentration qui facilite la pénétration des protéines dans le gel, (ii) gel de séparation qui sépare les protéines, et (iii) gel d'iso-électrofocalisation. En effet, le gel sert de tamis moléculaire dont le maillage est plus ou moins serré [22] : une faible réticulation permet une bonne séparation des protéines de hautes masses moléculaires, alors qu'un taux de réticulation plus important favorise la séparation de protéines de faibles masses moléculaires.

2.1.2 L'électrophorèse monodimensionnelle

La première électrophorèse en conditions dénaturantes a été décrite par Laemmli [23]. Sous l'effet d'un champ électrique, les protéines préalablement dénaturées et chargées de manière homogène par le dodécylsulfate de sodium (SDS) [24] migrent le long du gel de polyacrylamide qui agit comme un tamis moléculaire. Le SDS est un détergent anionique fort possédant une longue queue hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. Il interagit avec les protéines par son extrémité hydrophobe ; en se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative. Ceci permet sa migration dans la matrice à l'aide d'un courant électrique. La séparation des protéines s'effectue ainsi selon la masse moléculaire apparente, et non réelle. Ainsi, les protéines sont immobilisées dans le gel, sous forme de bandes avec les protéines de hautes masses moléculaires sur le haut du gel et les protéines de basses masses moléculaires en bas du gel.

La migration des protéines est permise grâce à un tampon électrolytique (pH ~ 8,7), composé d'un tampon type Tris, de glycine et de SDS. Dans la pratique, les protéines sont

Chapitre 1

concentrées dans un premier gel dit « de concentration » (ou encore « stacking gel ») puis séparées sur un second gel dit « de séparation » (ou encore « running gel »). Les protéines migrent plus vite dans le premier gel, s'accumulent à l'interface des deux gels et pénètrent le second. Cela permet d'augmenter la résolution de la séparation.

Plus en détails, dans le tampon électrolytique, la glycine possède une charge partielle moyenne négative. En pénétrant le premier gel au pH avoisinant 6,8, la glycine adopte une forme zwitterionique où sa charge nette est nulle, la forçant à arrêter de se déplacer. De plus, la résistance (R) au sein du gel augmente : en effet, pour maintenir le courant (I) constant, le potentiel local (U) augmente, d'après la loi d'Ohm ($U=RI$). Cela provoque une migration plus rapide des protéines ; elles s'alignent dans le gel derrière les ions Cl^- dont la mobilité est due à une densité de charge importante. Ensuite, à l'interface des deux gels, sous l'effet du tamisage du gel de séparation, plus réticulé et à pH 8,7, les protéines ne peuvent se déplacer à la même vitesse. Elles commencent alors à se séparer. La glycine finit par entrer dans ce second gel, redevient globalement chargée négativement, et dépasse les protéines. Facile à mettre en place, le gel en conditions SDS-PAGE est utilisé en routine comme indicateur de masses moléculaires protéiques mais aussi comme un outil de suivi de purification d'échantillon. Il existe une corrélation entre $\log(\text{masse moléculaire})$ et la mobilité relative .

La séparation électrophorétique de protéines en conditions natives est plus rarement employée. En effet, l'analyse de protéines natives rencontre deux problèmes majeurs. Le premier réside dans le fait que les protéines sont toujours en équilibre avec une forme libre et une forme complexée. Le deuxième tient à la propension des protéines à s'agréger, formant des complexes artefactuels, ou tout simplement à précipiter par manque de solubilité. Toutefois une méthode décrite par Schägger rend possible l'analyse de complexes protéiques [25, 26]. Cette approche, appelée « *Blue-Native PAGE* » permet de séparer des protéines ou des complexes protéiques à pH neutre. Afin de limiter l'agrégation des protéines, des agents solubilisants sont ajoutés : typiquement le bleu de Coomassie pour uniformiser la charge des complexes et l'acide aminocaproïque pour renforcer la solubilisation des protéines. Ainsi les répulsions électrostatiques sont maximisées entre les protéines prévenant leur agrégation et leur précipitation. La séparation est ainsi basée sur la différence de taille et de charge des protéines. Toutefois, cette technique est délicate à optimiser ; la résolution des bandes est souvent faible à cause de problèmes liés à la faible solubilité des protéines dans ces conditions.

2.1.3 L'électrophorèse bidimensionnelle

Dans le cadre d'une analyse protéomique, l'électrophorèse bidimensionnelle occupe une position centrale entre la préparation de l'échantillon et l'analyse par spectrométrie de masse. Développée en 1975 [21] et constamment améliorée [27], l'électrophorèse bidimensionnelle combine deux principes de séparations successives : la première dimension s'effectue selon le point isoélectrique des protéines, on parle alors de focalisation isoélectrique (IEF) ; tandis que la deuxième dimension orthogonale se déroule en conditions SDS-PAGE, c'est-à-dire selon les masses moléculaires des protéines. De cette manière, les protéines qui ont été focalisées dans la même zone de pH sont ensuite séparées selon leur masse moléculaire. Il est donc possible de séparer des protéines aux propriétés proches provenant de mélanges protéiques complexes, comme le plasma, avec une grande résolution.

Dans la pratique, l'étape d'IEF requiert une première dénaturation du matériel biologique. Typiquement, pour un échantillon de plasma, un mélange composé de chaotropes (type Urée, Thiourée), de détergents (type CHAPS), de réducteurs (type DTT) et d'un ampholyte est employé. Cette dénaturation a principalement pour but de dissocier les complexes protéiques et d'augmenter la solubilité des protéines. Cet aspect est essentiel dans l'IEF dans la mesure où au point isoélectrique, la charge électrique nette de la protéine immobilisée est nulle : il n'existe plus aucune répulsion électrostatique entre les analytes. C'est pourquoi le point isoélectrique est également caractérisé par un minimum de solubilité. Le support pour l'IEF le plus utilisé à l'heure actuelle est celui qui utilise des gradients de pH immobilisés (IPG, « Immobilized pH Gradient »). Le gradient de pH est obtenu par copolymérisation d'acrylamide, de BIS mais également de monomères à squelette acrylamide fonctionnalisés soit avec des groupes « acide faible », soit avec des groupes « base faible ». Ces derniers créent ainsi le gradient de pH, et lui confèrent un fort pouvoir tampon. Après polymérisation, le gradient de pH est ainsi greffé de façon covalente à la structure intrinsèque du gel de polyacrylamide. Ces gradients de pH offrent un fort pouvoir tampon, ce qui permet de travailler avec des quantités importantes pouvant atteindre plusieurs mg.

Après cette première étape, il est nécessaire de ré-équilibrer les strips par des bains successifs de réduction (DTT), d'alkylation (iodoacétamide) en présence de SDS pour dénaturer complètement les protéines et les charger négativement. Les strips sont ensuite transférées en tête de gel de séparation pour la seconde dimension en conditions SDS-PAGE. Il est important de noter qu'il s'agit d'un processus continu dans la mesure où aucun fractionnement n'est réalisé entre la première et la deuxième dimension (Figure 1.4).

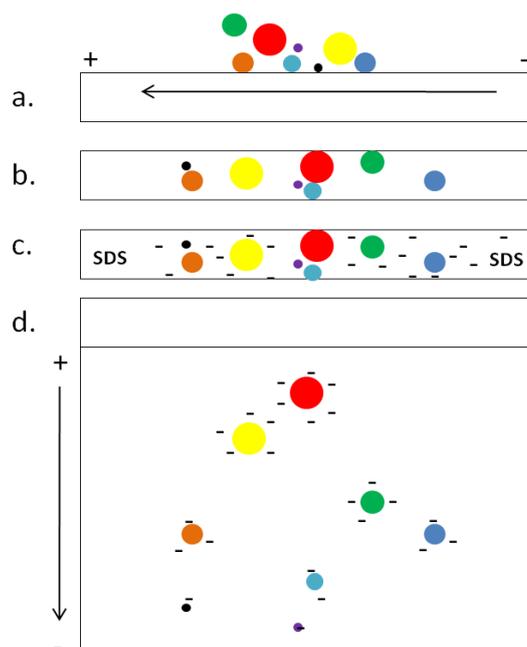


Figure 1.4 : Schéma de la 2DE (adaptée de [28])

2.1.4 Techniques de détection post-électrophorétiques

Par rapport aux autres techniques séparatives utilisées en analyse protéomique, l'électrophorèse sur gel (1DE et 2DE) est la seule qui permette une visualisation de la séparation avant même l'analyse par spectrométrie de masse. Les gels de 2DE sont une véritable cartographie de l'échantillon.

De nombreuses méthodes de détection protéique post-électrophorétique sont actuellement présentes sur le marché. Ainsi, parmi ces techniques, les plus utilisées sont les colorations au Bleu de Coomassie [29], au nitrate d'argent [30] ou encore par fluorescence [31]. Cependant, il est important de veiller à la compatibilité des colorants employés avec l'analyse par spectrométrie de masse : c'est le cas pour la coloration par fluorescence. Au cours de ces travaux de thèse, seule cette dernière technique a été utilisée à partir d'un colorant synthétisé par notre équipe, un dérivé de $\text{Ru}(\text{BPS})_3$.

La coloration par fluorescence est l'une des méthodes les plus sensibles [32]. Elle offre un potentiel de détection linéaire au moins sur trois ordres de grandeur [33], rendant son utilisation idéale pour l'analyse d'un protéome tant d'un point de vue dynamique et que quantitatif [34, 35].

Vers la fin des années 1980, on retrouve les premières traces d'utilisation de fluorophores pour la coloration post-électrophorétique qui utilisait des complexes de Fer, le $\text{Fe}(\text{BPS})_3$ [36]. A partir de 1999, le premier complexe à base de Ruthénium (Ru) est apparu

[37]. Depuis, d'autres fluorophores à base de Ru ont été développés [31, 38]. Plusieurs fluorophores (SYPRO Red [34, 39], SYPRO Orange [39, 40], SYPRO Tangerine [41] et SYPRO Ruby [37]) ont été commercialisés récemment répondant aux attentes de sensibilité des utilisateurs en une seule étape de coloration, rivalisant avec les autres techniques de coloration classiques. Ce dernier est de loin le plus utilisé à l'heure actuelle. Des quantités de protéines inférieures au nanogramme peuvent être détectées sur quatre ordres de grandeurs par ce fluorophore. Cependant, le coût excessif du produit incite les utilisateurs à le diluer ou à développer leur propre formulation à partir de complexes de Ruthénium (exemple du RuBPS). De nouveaux fluorophores (Deep Purple, ASCQ_RU, Flamingo) sont constamment développés avec des sensibilités accrues et une gamme linéaire dynamique importante [31]. Tous ces fluorophores sont par ailleurs compatibles avec la spectrométrie de masse dans la mesure où ils interagissent avec les protéines par l'intermédiaire de liaisons non-covalentes. En effet, les SYPRO Red et Orange interagissent avec les complexes SDS/Protéines, tandis que le SYPRO Ruby cible les amines primaires des protéines.

2.2 La spectrométrie de masse

Depuis 1980, la spectrométrie de masse (MS) a joué un rôle important dans l'analyse d'échantillons biologiques. Classiquement, l'identification des protéines exige la détermination partielle ou totale de leurs séquences par la méthode d'Edman [42], mais celle-ci est limitée à l'étude des polypeptides purifiés et non bloqués au niveau du N-terminal. Aujourd'hui, la MS est indispensable lors d'une étude protéomique. La Figure 1.5 présente de façon très schématique un spectromètre de masse, dont les deux éléments principaux sont : (i) la source d'ionisation qui génère les ions en phase gazeuse, (ii) l'analyseur qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Parmi les spectromètres disponibles sur le marché, seuls quelques uns trouvent leur application en protéomique.

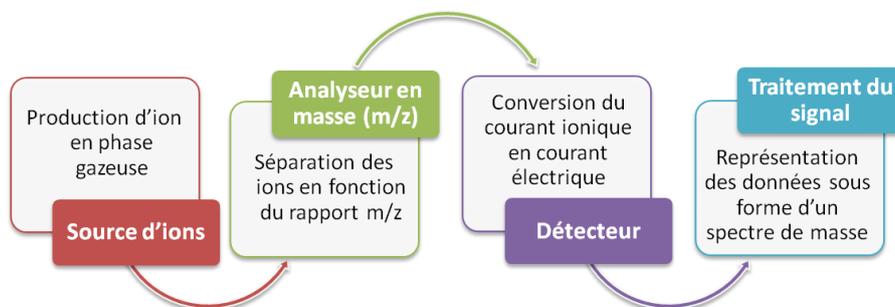


Figure 1.5 : Les principaux éléments d'un spectromètre de masse

Contrairement aux techniques d'ionisation à haute énergie qui conduisent à un grand nombre de fragmentation lors de l'étape d'ionisation (source à impact électronique, source à plasma couplé), les sources MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation) et ESI (Electrospray Ionisation) sont les deux techniques d'ionisation « douce » les plus utilisées en protéomique [43], dans la mesure où elles permettent l'ionisation d'espèces en phase liquide et les ions produits sont stables.

Les analyses effectuées au cours de ces travaux de thèse ont été réalisées sur divers instruments: un MALDI-TOF/TOF MS (AB 4800, Applied Biosystems), un spectromètre hybride Q-TOF (Q-STAR Pulsar I, Applied Biosystems – MDS Sciex) et un spectromètre à très haute résolution FT-ICR doté d'un aimant 9,4 T (ApexQE, BrukerDaltonics). Ces deux derniers appareils sont équipés d'une source nanoélectrospray, et offrent la possibilité de couplage avec de la nanochromatographie liquide.

De ce fait, le principe de ces deux principales sources d'ionisation utilisées en protéomique seront détaillées ainsi que les analyseurs (ou combinaisons d'analyseurs). Les spectromètres de masse qui ont été utilisés dans ces travaux de thèse sont présentés d'après leur performance en termes de résolution croissante. Le couplage de la nano-chromatographie à la spectrométrie de masse sera également décrit.

2.2.1 Les sources les plus utilisées en protéomique

2.2.1.1 La source MALDI

En 1978, les premiers essais utilisant la désorption par un impact laser ont été réalisés pour ioniser en phase gazeuse des peptides à partir d'échantillons solides [44]. Mais ces résultats préliminaires n'ont permis d'étudier que des peptides de petites masses. Ce n'est qu'à la fin des années 1980 que la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) a été décrite simultanément par Karas et Hillenkamp [45] et par une équipe japonaise menée par K. Tanaka [46]. Celle-ci correspond à la technique utilisée aujourd'hui. Depuis, la source MALDI s'est largement répandue et a su s'imposer dans les laboratoires de spectrométrie de masse pour l'analyse de biomolécules [47]. Les avancées accomplies grâce au développement de la source MALDI ont été reconnues par la communauté scientifique jusqu'à être couronnées par le prix Nobel de Chimie en 2002 décerné à K. Tanaka pour le développement d'une méthode d'identification et d'analyse structurale des macro-biomolécules.

La première étape de l'analyse MALDI est la préparation de l'échantillon. Avant d'être ionisé, ce dernier est déposé sur un support solide en acier/inox appelé « cible », et co-

cristallisé avec une matrice présente en excès vis-à-vis du nombre de molécules d'analyte. Le choix de la matrice se fait suivant deux principaux critères : sa solubilité dans les solvants utilisés pour l'analyse de macro-biomolécules et ses propriétés d'absorption de la longueur d'onde du laser. Les cristaux résultants sont ensuite irradiés sous vide par une série de pulses laser pendant quelques nanosecondes (figure 1.6). Dans la plupart des cas, il s'agit d'un laser pulsé à azote fonctionnant à une longueur d'onde d'excitation de 337 nm. Des lasers de type Nd-YAG équipent à présent les nouvelles générations d'appareils ; ils offrent une fréquence de tir plus rapide.

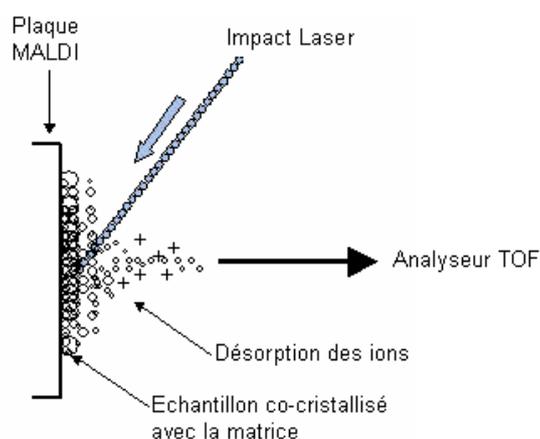


Figure 1.6 : Principe de l'ionisation MALDI.

La matrice est généralement un composé organique conjugué (acide organique faible) pour permettre une forte absorption de l'énergie laser. Les matrices se différencient par la quantité d'énergie qu'elles induisent pendant la désorption et l'ionisation, et par le degré de fragmentation qu'elles produisent. Son rôle est multiple puisqu'elle évite à l'échantillon de se dégrader sous l'impact laser, et transfère l'énergie du laser aux analytes pour former des ions en phase gazeuse. Elle est également une source de protons H^+ permettant l'ionisation des analytes. Plusieurs matrices ont été testées depuis le développement de la source MALDI ; les plus couramment utilisées sont l'acide α -cyano-4-hydrocinnamique (CHCA) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) pour l'analyse de peptides et de protéines entières.

Le processus exact d'ionisation MALDI reste encore mal connu. Cependant, il est possible de le décomposer en plusieurs étapes : tout d'abord les molécules de matrice sont excitées sous l'effet du laser. Ensuite, il y a une émission des ions en phase gazeuse ; cette redistribution d'énergie abaisse les forces de cohésion des cristaux, les molécules de matrice sont co-éjectées et créent un gaz dense en expansion (ou plasma) dans le vide formant un jet supersonique (ou « plume »). Les molécules d'analytes sont alors entraînées dans ce gaz en expansion et ionisées à leur tour majoritairement par transfert de protons, soit avant

désorption dans la phase solide, soit par collision après désorption avec la matrice excitée ou avec d'autres molécules du plasma. La source MALDI possède une grande tolérance vis-à-vis des sels, des tensio-actifs et d'autres interférents.

Les ions générés sont préférentiellement des ions mono-chargés $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$ suivant le mode d'ionisation. Les protéines ou les peptides sont le plus souvent analysés en mode positif. Toutefois, il est possible d'observer les ions d'adduits dus aux sels ou tampons ($[M+NH_4]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Na]^+$). La source MALDI est très souvent associée à un analyseur à temps de vol (*partie 2.3.2.1*).

2.2.1.2 La source « electrospray »

La naissance des sources « electrospray » (ou électronébulisation, ESI) date de la fin des années 1960 quand Dole met en évidence la formation d'ions directement à partir de la surface d'un liquide sous l'action d'un champ électrique intense [48]. Les potentialités de la source ESI ont été démontrées pour la première fois en 1984 par Yamashita et Fenn [49], et la pertinence de leur travail a pu être démontrée sur l'application d'analyse de protéines, à la fin des années 1980 [50]. Il s'agit d'une technique d'ionisation douce à pression atmosphérique qui permet de former des ions en phase gazeuse par des mécanismes de désolvatation peu énergétiques n'induisant quasiment pas de fragmentation. De plus, les ions sont formés directement à partir des molécules en solution, ce qui permet d'éviter une étape de vaporisation qui peut conduire à la dégradation des analytes et faciliter le couplage avec la chromatographie liquide.

Trois étapes principales permettent la formation des ions en phase gazeuse : (i) la formation des gouttelettes chargées à l'extrémité d'un capillaire métallisé, (ii) l'évaporation progressive du solvant et des explosions coulombiennes, et enfin (iii) l'obtention d'ions désolvatés en phase gazeuse. Les mécanismes précis de la formation des espèces ionisées et désolvatées dans les deux premières étapes sont, aujourd'hui encore, sujets à controverses.

- Formation de gouttelettes

L'échantillon est introduit dans un capillaire métallisé porté à un fort potentiel électrique de plusieurs kilovolts (kV). La Figure 1.7 présente le principe de la formation des ions dans une source ESI. La forte différence de potentiel présente entre ce capillaire et une contre-électrode, placée quelques millimètres plus loin, induit une séparation des charges au sein du liquide par un phénomène électrophorétique de migration des électrolytes (cations, anions). Lorsque le capillaire représente l'électrode positive, les espèces cationiques vont

alors s'accumuler à son extrémité tandis que les anions vont effectuer un déplacement inverse en s'accumulant à l'intérieur du capillaire jusqu'à s'oxyder à sa surface.

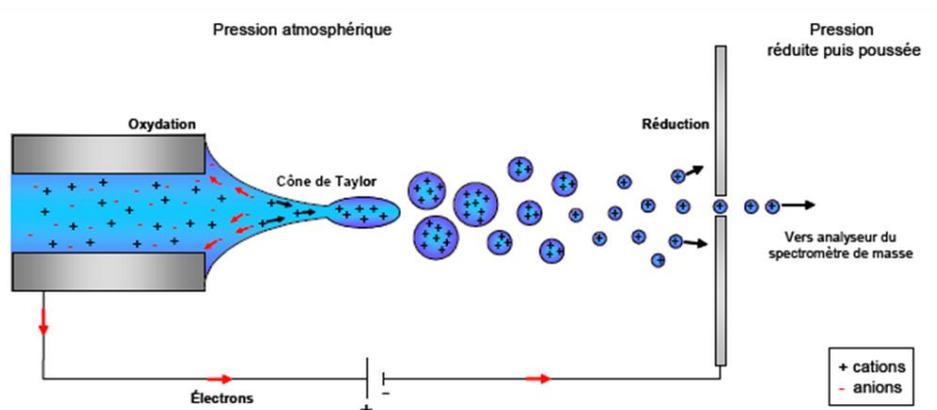


Figure 1.7 : Schéma simplifié du fonctionnement d'une source électrospray (d'après [51])

Les cations vont être attirés par l'électrode négative (contre-électrode) et les anions par l'électrode positive (capillaire). La séparation des charges va induire une déformation du liquide à l'extrémité du capillaire, déformation qui met en jeu un équilibre entre les forces électrostatiques (répulsives) et la tension de surface (attractive) du liquide. Lorsque les forces électrostatiques atteignent la valeur de la tension de surface du liquide, la déformation est conique et porte le nom de « cône de Taylor ». Une faible augmentation du champ électrique suffit alors pour déstabiliser le cône qui se rompt à son extrémité, dispersant la solution en nombreuses gouttelettes multichargées. Après cette étape, les gouttelettes se déplacent sous l'influence du champ électrique.

- Processus d'évaporation du solvant et explosions coulombiennes

Les gouttelettes issues du cône de Taylor vont se déplacer vers l'interface du spectromètre de masse, entrer en collision avec le gaz résiduel et subir une évaporation du solvant alors que le nombre de charges reste constant. L'évaporation du solvant est favorisée par la température souvent élevée du capillaire d'entrée (180°C). La dimension du rayon R des gouttelettes possédant une charge constante q conduit à l'augmentation de la répulsion électrostatique des charges à sa surface jusqu'à atteindre la limite de stabilité de Rayleigh donnée par :

$$q_R = 8 \pi (\gamma \epsilon_0 R^3)^{1/2}$$

avec γ la tension superficielle stabilisant la goutte, ϵ_0 la permittivité du vide et R le rayon de densité de charge.

Cette équation donne les conditions pour lesquelles les forces de répulsion électrostatique deviennent égales à celles de la tension de surface. A partir de la limite de

Rayleigh, la gouttelette chargée devient instable ; il se produit alors une explosion coulombienne (fission des gouttelettes). Abordé brièvement par Rayleigh en 1882 puis confirmé par Gomez et Tang [52], la fission des gouttelettes s'effectue par émission d'un jet très fin de gouttelettes. Ce phénomène d'évaporation se reproduit jusqu'à ce que les nouvelles gouttelettes aient à nouveau atteint la limite de Rayleigh.

- Formation d'ions désolvatés

Deux mécanismes sont proposés pour expliquer ce phénomène, comme l'illustre la figure 1.8. Le premier, modèle des résidus chargés (« charged residue model », CRM), a été énoncé par Dole en 1968 [48]. Il propose que la succession d'explosions coulombiennes peut conduire à des gouttelettes de plus en plus petites jusqu'à ce que la dernière ne possède plus qu'un seul et unique ion. L'évaporation totale du solvant résiduel permet ainsi d'obtenir des ions multichargés en phase gazeuse.

En 1976, une seconde théorie est apparue, proposée par Iribarne et Thomson[53] : le modèle de l'évaporation ionique (« ion evaporation model », IEM). Comme Dole, ils invoquent une succession de fissions de types coulombiennes qui réduit la taille des gouttelettes en augmentant leur densité de charge. Cependant, ils proposent que, lorsque les gouttelettes atteignent un rayon très petit (de l'ordre de 10 nm) et une densité de charge très élevée, le champ électrostatique à leur surface est tel qu'il est possible d'expulser directement des ions en phase gazeuse. Ce modèle suggère ainsi que l'explosion coulombienne ne constitue pas le mécanisme majoritaire pour des gouttelettes dont le rayon est inférieur à 10 nm.

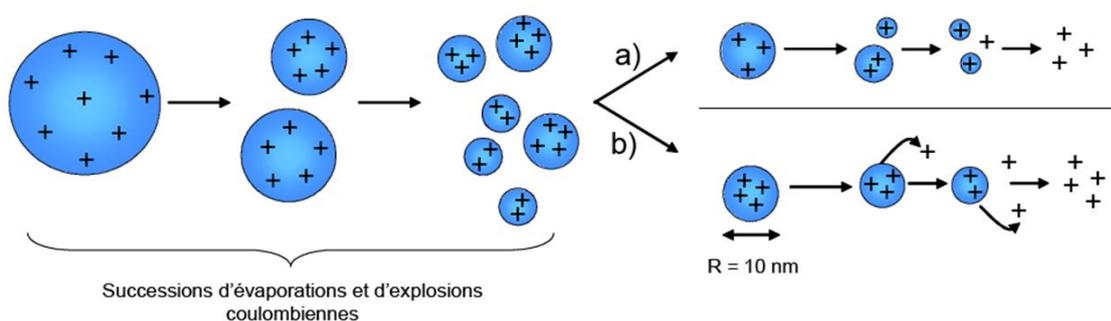


Figure 1.8 : Les deux théories de la formation d'ions désolvatés, en phase gazeuse à partir de gouttelettes chargées
a) Modèle des résidus chargés par Dole b) Modèle de l'évaporation ionique par Iribarne et Thomson

Aucun de ces deux modèles n'est aujourd'hui encore validé comme applicable à l'ensemble des phénomènes observés en ESI. Le consensus semble être l'existence de phénomènes de taille de l'analyte, les grosses molécules étant plutôt orientées vers une

formation par le mécanisme CRM de Dole. Fenn a émis l'hypothèse que cette théorie s'applique aux molécules de hautes masse moléculaire à partir du moment où les dimensions linéaires de ces molécules sont sensiblement plus grandes que la gouttelette qui les contient.

Contrairement à l'ionisation MALDI, les ions produits sont le plus souvent multichargés. L'obtention d'ions multichargés a comme avantage de permettre l'analyse de molécules pouvant atteindre des masses moléculaires supérieures à 100 kDa à des valeurs comprises entre 1000 et 3000 u.m.a. de gamme de masse, et par conséquent compatibles avec l'utilisation d'analyseurs à gamme de masse limitée, comme les pièges ioniques. En mode positif, les ions sont du type $(M+zH)^{z+}$, où M est la masse moléculaire, z le nombre de charges porté par l'ion considéré, et H la masse du proton (ou plus généralement, la masse de l'élément responsable de la charge). Ils ont donc une masse apparente de $m_n = (M+zH)/z$. d'après la relation $M = z_1(X_1 - m_H)$, on peut, par calcul ou à l'aide de logiciels dédiés à la déconvolution [54] de spectres, déterminer la masse moléculaire de l'analyte (figure 1.9). Quelque soit le mécanisme responsable de la formation des ions en phase gazeuse, l'ESI est aujourd'hui une méthode d'ionisation extrêmement utilisée dans des domaines variés (protéomique, biologie, chimie, pharmacie...).

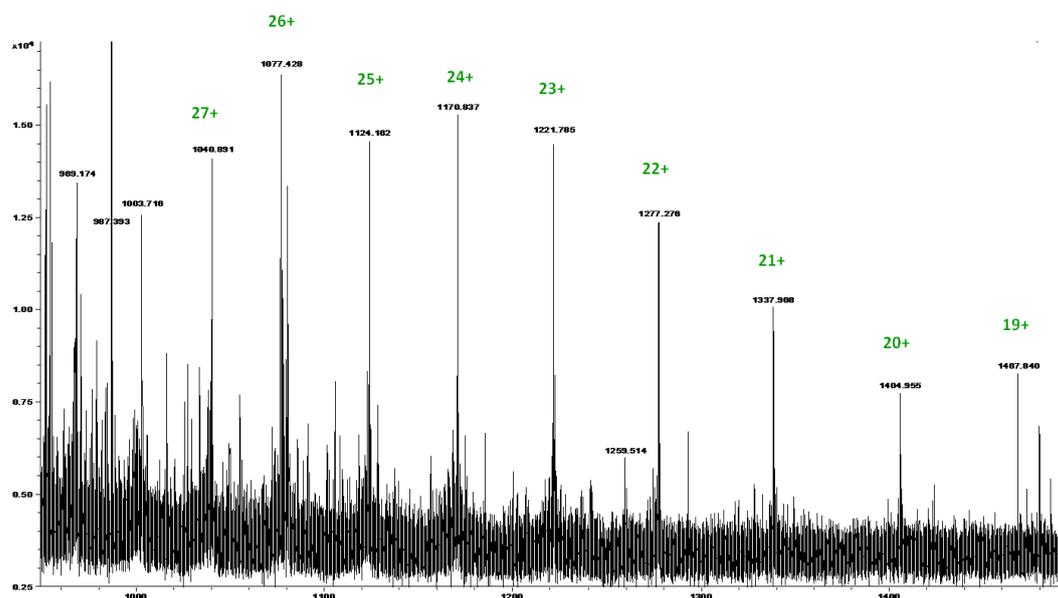
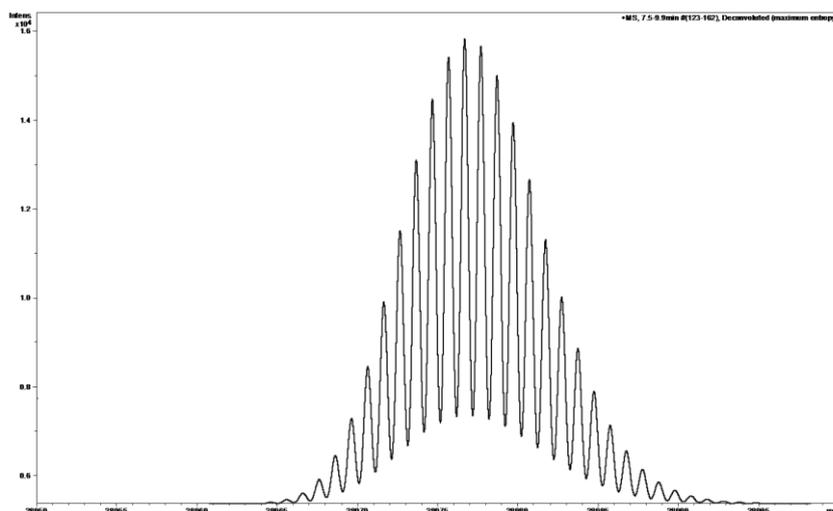


Figure 1.9 : Exemple de déconvolution. En haut, le spectre de masse nanoESI-Qh-FT-ICR de l'Apolipoprotéine A-1. En bas (page suivante), massif isotopique correspondant après déconvolution avec l'application MaxEntropy (BrukerDaltonics).



2.2.1.3 Nano-electrospray (nanoESI)

La miniaturisation de l'ESI, dans sa version nanoESI, a été développée par Wilm et Mann en 1984 [55, 56]. Le capillaire de la source ESI est remplacé par une aiguille en verre couverte d'un alliage conducteur (souvent à base d'or ou de palladium). La source nanoESI en place sur le spectromètre à transformée de Fourier est la source ApolloII (BrukerDaltonics) ; celle qui équipe notre Q-TOF est le modèle NanoSpray II (Applied Biosystems - MDS Sciex).

Le principe est le suivant : un faible volume d'échantillon est introduit dans l'aiguille, une différence de potentiel est alors appliquée entre cette aiguille et la contre-électrode (plaque d'entrée) placée quelques millimètres plus loin afin de créer un spray avec un débit variable, n'excédant pas 200 nL/min. La position de l'aiguille est ajustée à l'aide d'un réglage x , y , et d'une caméra pour visualiser sa position et contrôler la stabilité du nanospray. Les gouttes formées sont 100 à 1000 plus petites qu'avec une source ESI classique ; par conséquent, le potentiel appliqué doit être plus faible, et se situe entre 800 et 1500 V.

On distingue deux configurations concernant les sources nanoESI :

- La source *off-line* où 1 à 5 μL d'échantillon sont introduits directement dans l'aiguille. D'une dimension de 1-2 μm , la pointe de l'aiguille permet de travailler avec des débits de quelques dizaines de nL/min.
- La source *on-line* est utilisée pour les couplages avec une nano-chromatographie liquide (voir partie 2.4.1). Généralement en silice fondue, les aiguilles ont des diamètres internes de 20 μm et une taille d'orifice légèrement supérieure (8 μm) à celle des aiguilles *off-line* pour supporter les débits de la nanoLC, qui est en général de 200 nL /min.

La nanoESI présente plusieurs avantages par rapport à l'ESI. Il est évident que la consommation d'échantillon est plus faible, seulement quelques microlitres d'une solution à une concentration de l'ordre du pmol/L suffisent. Cet aspect est particulièrement important lorsque les échantillons étudiés sont disponibles en faible quantité, ce qui est généralement le cas pour les études protéomiques. De plus, les sources nanoESI sont plus sensibles que l'ESI classique. Wilm et Mann décrivent un gain de sensibilité 510 fois supérieur [56]. Bien que cette valeur soit difficilement généralisable, il est admis que le nanoESI permet d'obtenir une sensibilité au moins 100 fois plus élevée à celle de l'ESI classique. La raison principale tient au faible diamètre de l'aiguille nanoESI. En effet, cela permet de former des gouttelettes initiales très petites et de conduire aussi plus rapidement à la formation d'ions en phase gazeuse puisque le volume de solvant à évaporer est très faible. Ceci a pour conséquence d'améliorer l'efficacité d'ionisation. Cependant, à l'instar de l'ESI, leur faible tolérance à la présence de sels dans l'échantillon implique une étape supplémentaire de dessalage de l'échantillon avant l'analyse, en particulier lorsqu'il s'agit d'échantillons de plasma.

Ainsi depuis plus d'une dizaine d'années, la source nanoESI est devenue incontournable dans le domaine de l'analyse de protéines, et plus largement de biomolécules.

2.2.2 Les analyseurs

2.2.2.1 L'analyseur à temps de vol (TOF, Time of Flight)

La source MALDI est généralement utilisée avec un analyseur à temps de vol. Le concept de cet analyseur date des années 1950. Un peu plus tard, en 1955, Wiley et McLaren apportent des développements majeurs pour ce type d'analyseur [57]. Schématiquement, le principe d'un analyseur à temps de vol consiste à mesurer le temps de vol d'un ion, préalablement accéléré, au travers d'une région libre de champ (ou « tube de vol ») avant d'atteindre le détecteur. Le rapport m/z est directement lié au temps de vol et à la vitesse des ions d'après les relations suivantes :

$$\frac{1}{2} m v^2 = z V_0 \quad \text{avec} \quad V_0 = \frac{t}{d}$$

$$\text{D'où} \quad \frac{m}{z} = 2 V_0 \left(\frac{t}{d} \right)^2$$

avec m la masse, v la vitesse, z le nombre de charge, d la distance à parcourir (soit la longueur du tube de vol), t le temps, et V_0 le potentiel.

Les ions de rapport m/z plus petit atteindront le détecteur en premier. Il existe deux modes d'analyse des ions : le mode linéaire et le mode réflectron.

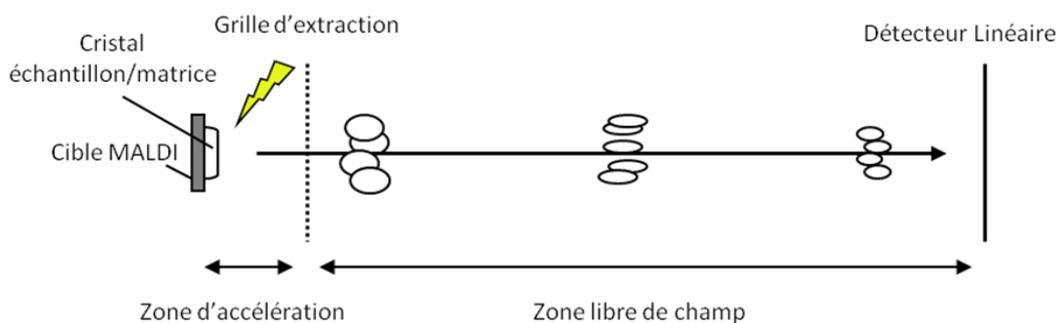


Figure 1.10: Schéma du fonctionnement de l'analyseur TOF en configuration linéaire.

Le mode linéaire est de conception assez simple (figure 1.10). Après irradiation laser, les ions sont expulsés de la source par paquets (ou « pulses »), accélérés vers le tube de vol par une différence de potentiel appliquée entre une électrode et la grille d'extraction de sorte à conférer la même cinétique à tous les ions formés. L'analyseur en mode linéaire possède une très bonne sensibilité mais est très peu résolutif. Les facteurs principaux affectant la résolution du signal sont la distribution temporelle, la distribution spatiale et la distribution en énergie cinétique initiale des ions.

Afin d'améliorer la résolution, un réflecteur électrostatique a été ajouté à l'extrémité du TOF (figure 1.11). Ce réflecteur est composé d'une série d'anneaux ou de grilles de potentiels croissants qui agissent comme un miroir électrostatique. Il va permettre de refocaliser les ions de même masse ayant été accélérés à des temps différents afin de les synchroniser à leur arrivée au niveau du détecteur. Pour cela, ces ions sont ralentis, réfléchis puis ré-accelérés par le réflecteur. Ainsi, cette refocalisation des ions permet un gain en résolution mais diminue la sensibilité. Le mode réflectron ne pourra cependant s'appliquer qu'à des molécules de masse inférieure à environ 10 kDa, et convient donc particulièrement à l'analyse de peptides tandis que le mode linéaire sera préféré pour l'analyse de protéines entières.

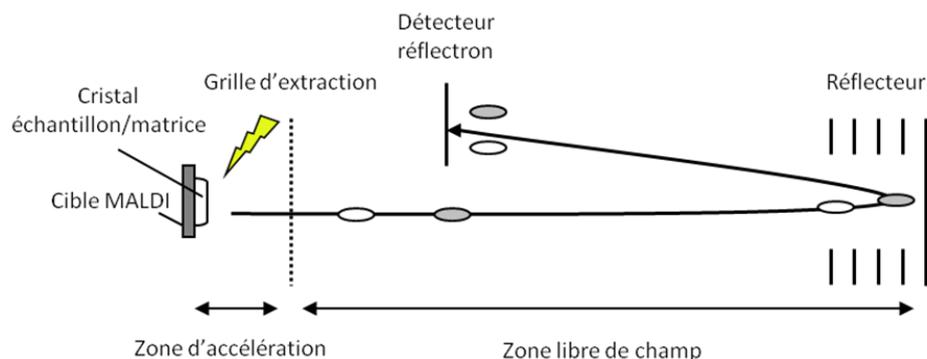


Figure 1.11 : Schéma du fonctionnement de l'analyseur TOF en configuration réflectron

L'inconvénient majeur des appareils à temps de vol est la difficulté à réaliser des expériences MS/MS. Le mode PSD (Post Source Decay) permet d'observer des ions fragments (ions métastables) produits par dégradation, dans la zone libre de champs, des molécules de l'échantillon ionisées dans la source. Même si l'analyse en mode PSD permet d'obtenir des informations de séquences, cette technique souffre de certaines limitations en termes de sensibilité, de résolution et de manque de contrôle sur les conditions d'activation des ions précurseurs. Aussi ont été développés et introduits sur le marché ces dernières années des appareils qui associent deux analyseurs à temps de vol (MALDI-TOF/TOF) séparés par une cellule de collision [58]. La Figure 1.12 représente le schéma interne de l'ABI 4800 (Applied Biosystems) qui équipe notre laboratoire.

Après sélection des ions parents par un TIS (*Timed Selector System*), ces derniers sont décélérés avant d'entrer dans la chambre de collision. Après collisions avec les molécules de gaz présentes (air ou argon dans notre cas) et fragmentation, les ions précurseurs restants et les ions fragments sont ré-accélérés par extraction pulsée et analysés par le deuxième analyseur à temps de vol. Ainsi la réalisation de spectres MS/MS sur ce type d'appareil est plus rapide, plus résolutive et plus sensible permettant le développement de l'analyse protéomique à haut débit.

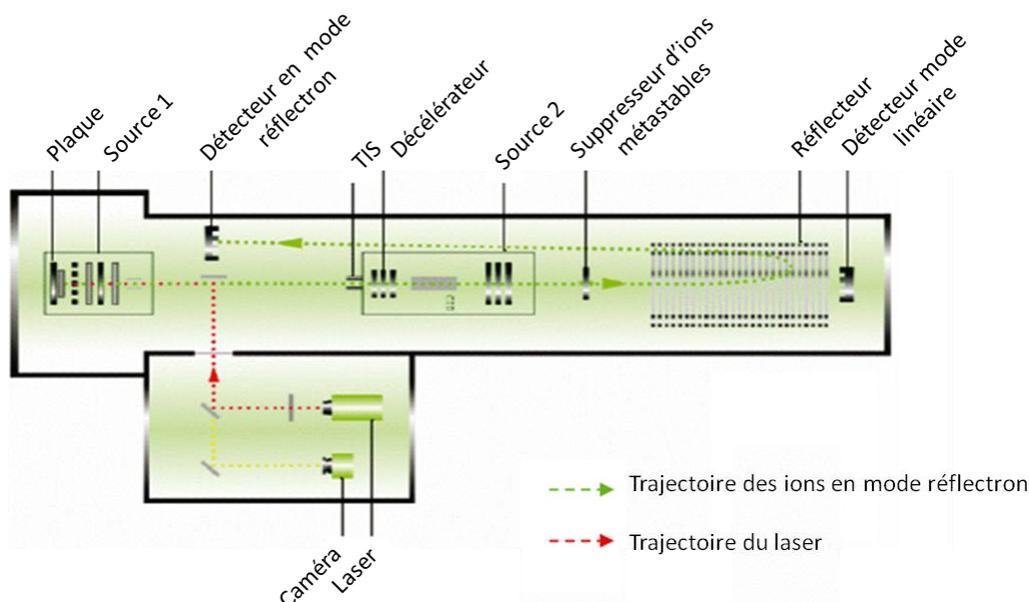


Figure 1.12: Schéma du Voyageur 4800 (adapté de la documentation Applied Biosystems)

2.2.2.2 Spectromètre hybride Q-TOF

Au milieu des années 1990, des instruments hybrides ont été développés. Ils associent des analyseurs différents qui permettent ainsi de cumuler leurs performances respectives. Les analyseurs Quadripôle-Temps de vol (Q-TOF) combinent ainsi un analyseur de type quadripolaire suivi d'une cellule de collision, et d'un analyseur à temps de vol à injection orthogonale [59, 60]. Une partie des analyses de ces travaux de thèse (*voir chapitre 4*) a été effectuée sur un instrument de type Q-TOF un Q-STAR Pulsar I (Applied Biosystems – MDS Sciex), en couplage avec une chaîne de nano-chromatographie liquide. Afin de comprendre le fonctionnement de ce type d'instrument, on s'attachera dans un premier temps à présenter le principe et les caractéristiques des analyseurs quadripolaires. L'analyseur Q-TOF sera ensuite décrit, on détaillera également ses spécificités ainsi que ses performances.

- L'analyseur quadripolaire

Les analyseurs de type quadripolaire sont apparus dans le milieu des années 1950 par W.Paul. Basé sur le principe de transmission sélective des ions à travers un quadripôle [61], le premier spectromètre de masse utilisant cet analyseur a été présenté en 1958 [62]. En 1989, Paul a reçu le prix Nobel de Physique pour ses travaux sur le développement de la technique du piège à ions.

Un analyseur quadripolaire (ou filtre quadripolaire, Q) est constitué de quatre barreaux métalliques (ou électrodes) parallèles sur lesquels sont appliquées des tensions qui permettent

de guider les ions. Idéalement, la surface de ces électrodes est hyperbolique, mais en réalité elle est souvent cylindrique. La tension appliquée sur les électrodes est de la forme :

$$V(t) = U_{DC} + V_{RF} \cos(\omega t)$$

où U_{DC} est une tension continue, V_{RF} l'amplitude de la tension sinusoïdale et ω la pulsation de cette tension. Si l'on applique la tension V sur une électrode, on applique une $-V$ sur les deux électrodes adjacentes (Figure 1.13).

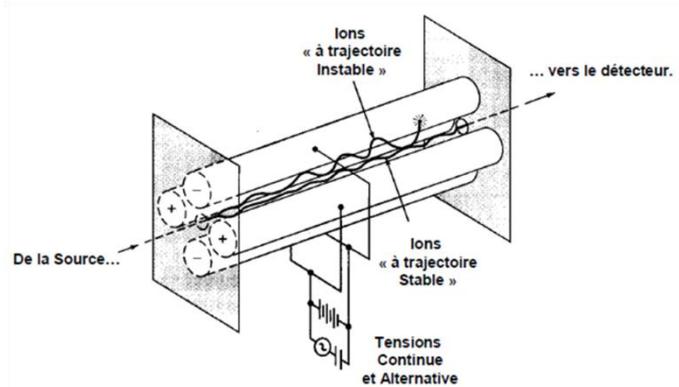


Figure 1.13 : Schéma d'un analyseur quadripolaire

Le champ électrique créé dans un quadripôle est de forme quadripolaire, c'est-à-dire que le potentiel électrique s'exprime en fonction de x^2 et y^2 . Il existe également des filtres composés de six et huit électrodes, dont les champs électriques sont respectivement de formes hexapolaires (x^3 et y^3) et octopolaires (x^4 et y^4).

Les ions extraits de la source sont accélérés et focalisés par un jeu de lentilles électrostatiques jusqu'à leur entrée dans l'analyseur quadripolaire. Un ion traversant un quadripôle possède un mouvement qui est régi par l'équation de Mathieu :

$$\frac{d^2u}{d^2\xi} + (a - 2q \cos 2\xi) u = 0$$

avec $\xi = \frac{\Omega t}{2}$ et a et q sont des paramètres tels que :

$$|a| = a_x = -a_y = \frac{8ZeU}{mr^2\Omega^2}$$

$$|q| = q_x = -q_y = \frac{4ZeV}{mr^2\Omega^2}$$

Dans un quadripôle, la trajectoire de l'ion est donc confinée à l'intérieur des électrodes selon la position de l'ion dans le diagramme de stabilité. Il est intéressant de noter que selon

l'axe z , il n'y a globalement pas de champ électrique, ce qui signifie que l'ion traverse le quadripôle avec une énergie cinétique axiale constante.

Un quadripôle peut non seulement être utilisé comme analyseur en spectrométrie de masse, mais aussi comme guide d'ions. Dans le premier cas, on applique à la fois une tension radiofréquence V_{RF} et une tension continue U_{DC} de façon à maintenir un rapport U_{DC}/V_{RF} constant. Ce rapport est choisi de sorte à se placer près de l'apex du diagramme de stabilité (figure 1.14). U_{DC} et V_{RF} sont augmentées de manière linéaire, et à chaque incrément de tension, seule une gamme de masse très faible adopte une trajectoire stable selon x et y . Si la trajectoire de l'ion n'est pas stable, ce dernier entre en contact avec l'une des électrodes, s'y décharge avant d'atteindre l'extrémité de l'analyseur, et ne pourra donc pas être détecté. Par conséquent, en choisissant la gamme de masse transmise, il est possible d'ajuster la résolution ou la sensibilité de la détection. Dans le cas de guidage d'ions, seule une tension radiofréquence est appliquée : ainsi, tous les ions sont transmis, quelque soit leur rapport m/z à condition que la tension V_{RF} leur permette une trajectoire stable.

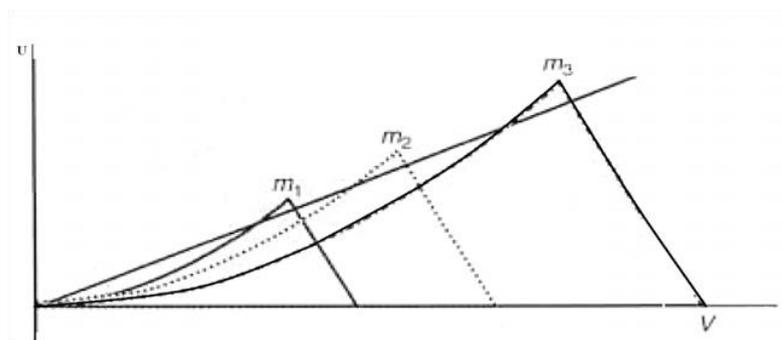


Figure 1.14 : Diagramme de stabilité en fonction de U_{DC} et V_{RF} pour des ions de masses différentes ($m_1 < m_2 < m_3$). En faisant varier U de façon linéaire en fonction de V , on obtient une droite d'opération qui permet d'observer les ions de façon sélective. Une droite de pente plus grande donne une meilleure résolution, tant qu'elle traverse le diagramme de stabilité. En maintenant $U=0$, la résolution est nulle : tous les ions ont une trajectoire stable, tant que V reste dans le domaine de stabilité [63, 64]

L'intérêt majeur du quadripôle réside dans la possibilité d'associer plusieurs de ces analyseurs en série [65] (figure 1.15). L'association de trois quadripôles (QqQ) en série permet des analyses de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Pour analyser la fragmentation d'un ion précurseur, le premier quadripôle est utilisé pour la sélection d'un ion à fragmenter. Le quadripôle central, qui est souvent remplacé par un hexapôle pour des raisons de transfert d'ions, joue le rôle de cellule de collision dans laquelle est introduit un gaz inerte (typiquement de l'argon) afin d'induire des collisions avec l'ion sélectionné (fragmentation par collision : CID (*Collision Induced Dissociation*), ou CAD (*Collision Activated Dissociation*)); enfin, le troisième quadripôle analyse les fragments générés au cours de la fragmentation.

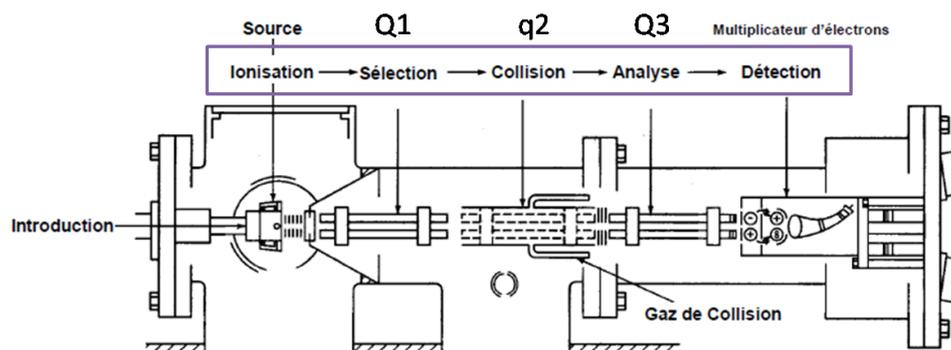


Figure 1.15 : Schéma d'un analyseur de type triple-quadripolaire, comprenant deux filtres de masses (Q1 et Q3), et d'une cellule de collision (q2)

Les QqQ permettent diverses configurations d'analyse : les balayages d'ions fragments d'un parent constant, d'ions précurseurs d'un fragment constant, de perte de neutre (perte d'un fragment de rapport m/z constant). Un mode est particulièrement intéressant : le mode SRM (*Selected Reaction Mode*) qui fixe les analyseurs Q1 et Q3 pour isoler simultanément un ion précurseur et un ion fragment (ou une transition). Il est, par ailleurs, possible de suivre plusieurs transitions à partir d'un ion parent, on parle alors de mode MRM (*Multiple Reaction Mode*). Ces deux derniers modes sont largement mis en place pour la quantification d'analytes présents au sein d'une matrice complexe, comme les échantillons biologiques.

- Le Q-TOF

Dans l'optique de combiner les avantages des analyseurs quadripolaires (en termes notamment de sélection d'ions) et ceux des analyseurs à temps de vol (en termes de sensibilité/détection et précision de mesure/résolution) sont apparus des analyseurs hybrides quadripôle-temps de vol [59, 60], dont le schéma est représenté sur la figure 1.16.

Ce type d'appareil peut être perçu comme un QqQ dont le dernier quadripôle a été remplacé par un tube de vol. Les ions formés en source (nanoESI ou MALDI par exemple) sont focalisés (q_0), sélectionnés (Q1), fragmentés (q_2), puis re-focalisés avant d'être injectés par paquets d'ions (ou pulses d'ions) dans l'analyseur à temps de vol où ils sont ré-accélérés orthogonalement pour détection. Les pulses d'ions permettent un effet de concentration qui se traduit par une sensibilité importante : ce gain de sensibilité est dû à la capacité du TOF à mesurer simultanément et avec précision la masse des ions sur une large gamme de masses alors que le QqQ doit effectuer un balayage au cours du temps. La résolution en masse est également nettement supérieure [59] ($R = 10\ 000$) facilitant l'identification des composés inconnus. Notre appareil permet d'obtenir des résolutions proches de 9000 à m/z 800, en analyse de routine. Ce sont pour ces raisons que cet analyseur de masse hybride est

massivement employé dans des thématiques biologiques. En effet, il est très utilisé pour des analyses protéomiques puisqu'il permet d'identifier facilement les états de charge des ions fragments produits par collision, et donc de lever certaines ambiguïtés lors des identifications de biopolymères ou de peptides.

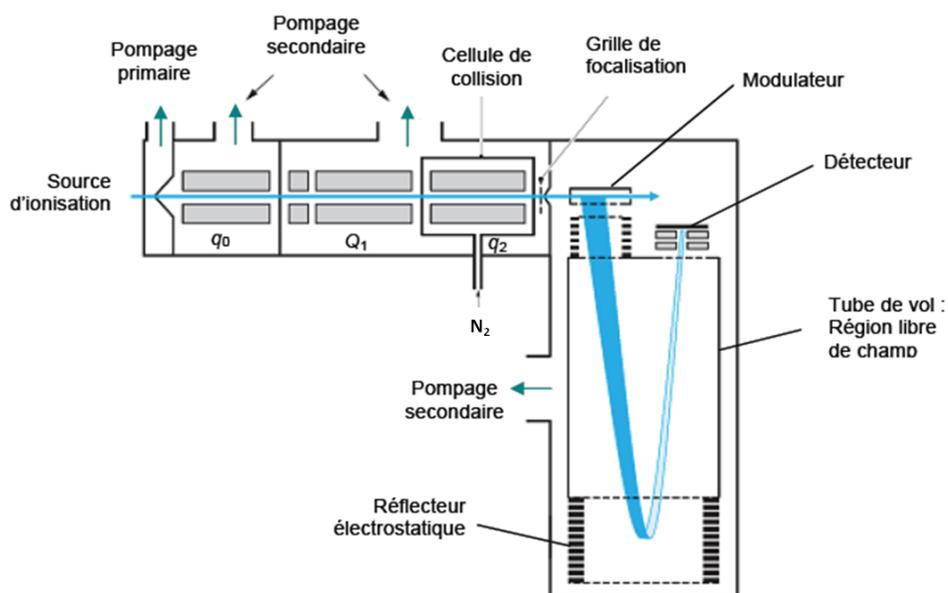


Figure 1.16: Spectromètre de masse hybride Q-TOF composé d'un analyseur quadripolaire (Q1), d'une cellule de collision (q2, qui est souvent un hexapôle) et d'un tube de vol orthogonal.

2.2.2.3 L'analyseur à transformée de Fourier

Pour réaliser des analyses MS/MS, il n'est pas obligatoire d'avoir recours à des spectromètres de masse hybrides. Les spectromètres à piège ionique offrent également des possibilités de MSⁿ. Parmi ceux-là, les analyseurs à Transformée de Fourier tiennent une place particulière, du fait de leurs très grandes performances en termes de résolution et de précision de masse. En effet, la mise en place de la résonance ionique cyclotronique (ICR) dans le domaine de la spectrométrie de masse a été introduite par Sommer [66]. Toutefois, il faudra attendre les années 1980 pour que les premiers spectromètres de masse à transformée de Fourier apparaissent sur le marché. Cette évolution a été rendue possible grâce aux travaux de Comisarow et Marshall [67-69] qui ont démontré les potentialités de ce type d'analyseur en termes de résolution et de précision de masse. Le principe utilisé dans cet analyseur pour la détection des ions est basé sur la mesure de leur fréquence de rotation dans un champ magnétique intense.

Une grande partie des analyses réalisées au cours de ces travaux de thèse a été effectuées sur un spectromètre ApexQe (BrukerDaltonics) équipé d'un aimant

supraconducteur de 9,4 T et d'une cellule ICR de type Infinity Cell. Cet appareil permet une configuration d'ionisation de type MALDI ou nanoESI. Seule la source nanoESI a été utilisée. La MS/MS peut être effectuée par CID, par IRMPD ou encore ECD. Pour la fragmentation des peptides, nous avons eu recours au mode CID.

Dans notre spectromètre de masse, les ions sont formés dans une source externe à la cellule de piégeage puis acheminés *via* un ensemble de lentilles électrostatiques au centre de la cellule située au cœur de l'électroaimant supraconducteur (Figure 1.17).

Un hexapôle de stockage est inséré entre la source ESI, après un capillaire de transfert, et avant le système de transfert électrostatique afin d'y accumuler les ions avant de les envoyer dans la cellule ICR. Cette dernière, placée dans un vide poussé (de l'ordre de 10^{-10} mbar) représente l'élément clé du spectromètre puisqu'elle va servir d'analyseur et de détecteur par mesure de la fréquence cyclotron des ions piégés.

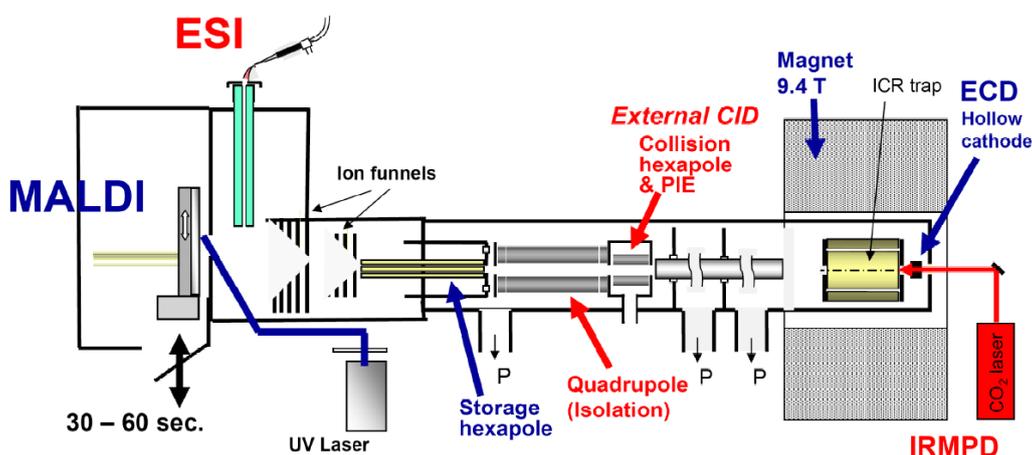


Figure 1.17 : Spectromètre de masse nanoESI-FT-ICR Bruker Daltonics 9,4 T.

- Principe général

Le principe de la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique repose sur le fait qu'une particule chargée, animée d'une vitesse v , se déplaçant dans un champ magnétique uniforme B subit la force de Lorentz (figure 1.18). Cette force la conduit à adopter une trajectoire hélicoïdale autour d'un axe parallèle à celui du champ magnétique B (conventionnellement axe z) dont la projection dans le plan orthogonal (yx) est un mouvement circulaire uniforme.

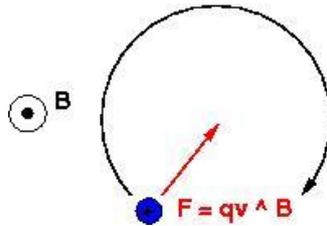


Figure 1.18 : Mouvement cyclotron d'un ion dans un champ magnétique

Ce mouvement de rotation est appelé mouvement « cyclotron » et, en l'absence de champ électrique, sa fréquence ν ne dépend que du champ magnétique et du rapport de masse sur charge. Ainsi, l'ion a une trajectoire circulaire résultant de l'équilibre de ces deux forces permettant de déterminer la fréquence de rotation cyclotronique. On conçoit dès lors qu'une mesure de cette fréquence de rotation permet de déterminer le rapport m/z de l'espèce considérée :

$$m \omega r^2 = q B \omega r$$

$$\omega = \frac{q B}{m} \text{ soit } \omega = \frac{e B}{m/z}, \text{ et } \nu = \frac{e B}{2 \pi m/z}$$

$$\text{d'où } \nu = \frac{1,535611 * 10^7}{m/z} B$$

avec ν en Hertz et B en Tesla.

- Le piégeage des ions

Jusqu'ici seul le mouvement dans le plan (xy) a été considéré. En l'absence d'autres champs, la vitesse, suivant l'axe z , reste constante et la trajectoire résultante est un mouvement hélicoïdal autour d'un axe parallèle à z , qui se poursuivra indéfiniment. Pour construire un piège, une possibilité est de « fermer » le mouvement suivant z par deux plaques de piégeage perpendiculaire à l'axe z portées à un potentiel répulsif. Ce système définit la cellule ICR (appelée aussi « piège de Penning ») dont le premier modèle a été une cellule cubique (figure 1.19).

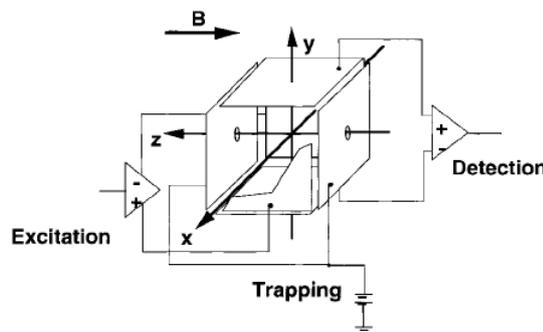


Figure 1.19 : Schéma de la cellule ICR cubique simple ou "piège de Penning" [70]

Chapitre 1

S'il était possible d'appliquer un champ électrique homogène parallèle au champ magnétique avec des plaques de longueurs infinies, le mouvement d'un ion serait hélicoïdal avec des oscillations périodiques suivant l'axe z . Cette fréquence d'oscillation ou fréquence de piégeage ν_{trap} est principalement due aux répulsions successives des deux plaques de piégeage et peut être exprimée par l'équation suivante :

$$\nu(\text{trap}) = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{2 \alpha q V_{\text{trap}}}{m a^2}}$$

avec V_{trap} le potentiel de piégeage, a la distance entre les deux plaques et α le facteur géométrique égal à 2, dans un cas idéal.

Cependant, il n'est pas possible de se placer dans le cas idéal d'un champ électrique homogène qui suppose des plaques infinies. Il faut ainsi prendre en compte une composante radiale. Par conséquent, un troisième mouvement propre au mouvement de déplacement des charges piégées s'ajoute aux deux précédents mouvements (cyclotron et piégeage). Ce mouvement appelé mouvement « magnétron » s'oppose à la force de Lorentz et se traduit par une diminution de la fréquence cyclotronique.

Ce piégeage suppose toutefois que la trajectoire des ions les ait amenés à être confinés dans la cellule. Cela peut être obtenu en produisant des ions *in situ* (ionisation électronique, MALDI) mais des difficultés supplémentaires sont à prendre en compte lorsque les ions sont formés initialement à l'extérieur de la cellule. En effet, la conservation de l'énergie cinétique impose que, pour des ions transportés suivant l'axe z , s'ils ont suffisamment d'énergie pour entrer dans la cellule et que le potentiel des plaques ne change pas, ils en ont assez pour ressortir.

Le piégeage dynamique des ions est une solution à ce problème : au lieu d'appliquer des tensions continues sur les plaques de piégeage, des variations de tension sont utilisées pour s'assurer du piégeage des ions. Les tensions sur la plaque de la cellule située du côté de la source sont synchronisées avec le déplacement des ions (Figure 1.20).

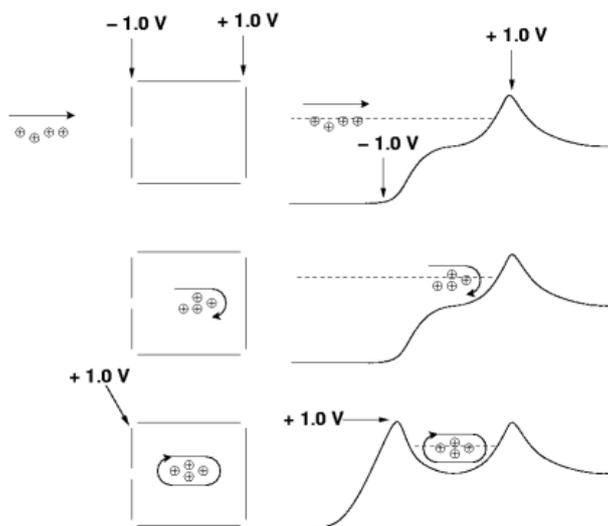


Figure 1.20 : Principe du piégeage dynamique des ions

- Obtention des spectres de masse

La mesure de la fréquence cyclotronique des ions n'est pas possible directement. Bien qu'ayant une fréquence de rotation identique, tous les ions de même rapport m/z ne présentent pas un mouvement cohérent. En effet, des ions ont été produits à des temps variables et avec des énergies cinétiques différentes, ce qui se traduit par une phase (position de l'orbite) et un rayon variables. Afin de pouvoir mesurer les fréquences cyclotroniques, il est nécessaire que ce mouvement global devienne cohérent, ce qui signifie que tous les ions de même rapport m/z aient la même phase et le même rayon. Ce résultat est obtenu par une procédure d'excitation-détection.

- Excitation des ions piégés

Une fois piégés, les ions de même rapport m/z ont la même fréquence cyclotronique, mais ne forment pas un paquet cohérent : la position de leur axe de rotation et la phase de leur mouvement ne sont pas égales. L'application d'un pulse de tension radiofréquence sur les plaques d'excitation à leur fréquence cyclotron permet de rendre le mouvement des ions cohérent et de les conduire sur une trajectoire de même rayon, à proximité des plaques de détection. En effectuant un balayage de fréquences, il est possible d'exciter des populations d'ions de rapport m/z différents qui adoptent alors une même trajectoire circulaire avec des fréquences de rotation différentes. Cette étape permet non seulement d'obtenir des paquets d'ions décrivant un mouvement cohérent mais aussi de les rapprocher des deux plaques de détection afin de pouvoir détecter ce mouvement.

Dans le cas idéal, il conviendrait d'exciter les ions sur une orbite la plus grande possible afin d'augmenter le signal et la sensibilité obtenus. Cependant, ceci n'est pas

Chapitre 1

applicable puisque la non-homogénéité du champ électrique près des plaques conduirait à l'éjection progressive des ions. C'est pourquoi il est courant de ne pas exciter les ions sur des rayons plus grands que 0,8 fois le rayon de la cellule. Il existe trois types d'excitation différents. Le premier utilise une seule fréquence, mais ne s'avère pas très adapté lorsqu'il faut détecter des ions de rapports m/z différents, cas le plus fréquent. Il est alors possible d'effectuer une excitation mono-fréquence par balayage de fréquence qui va balayer toute la gamme de fréquence des ions en une seule impulsion. Enfin, le balayage en mode SWIFT (*Stored Waveform Inverse Fourier Transform*) permet de calculer l'onde d'excitation à partir du domaine des m/z étudié. Le mode utilisé pour les analyses FT-ICR MS dans ces travaux de thèse utiliseront le mode par balayage de fréquences.

- Détection des ions

La fréquence cohérente des ions sur une orbite large crée un courant induit sur les deux plaques de détection. L'amplitude de ce courant est proportionnelle à la charge totale du paquet d'ions ayant un mouvement cohérent et ne dépend pas de la fréquence cyclotronique des ions.

La collision des ions avec des molécules de gaz résiduelles pendant le temps de mesure conduit à une perte de cohérence du paquet d'ions et donc à une perte d'intensité du signal. De ce fait, le signal obtenu correspond à une sinusoïde amortie exponentiellement. La précision en masse est, quant à elle, directement liée à la précision sur la mesure de la fréquence de rotation cyclotron des ions piégés. L'un des facteurs les plus importants qui influent sur la résolution et la sensibilité est la pression dans la cellule.

- Transformée de Fourier

Comme l'indique le nom de l'appareil, c'est la transformée de Fourier qui permet de mesurer en une seule expérience l'ensemble des fréquences de rotations des ions. Le courant induit mesuré sur les plaques de détection correspond à un interférogramme où les sinusoïdes amorties de l'ensemble des ions présents dans la cellule sont additionnées. La numérisation de ce signal suivie d'une transformation de Fourier permet de convertir cet interférogramme en un spectre contenant les informations sur les fréquences, facilement convertibles en rapport masse sur charge et les abondances des ions piégés dans la cellule. En additionnant plusieurs détections successives, il est ainsi possible d'améliorer le rapport signal sur bruit du spectre transformé.

- **Les performances de la spectrométrie de masse FT-ICR**

La particularité de la spectrométrie de masse FT-ICR, qui est de ramener la mesure des rapports m/z à la mesure d'une fréquence, lui confère ses caractéristiques en termes de résolution. Dans des conditions adéquates, c'est-à-dire avec un vide très poussé dans la cellule permettant un enregistrement pendant un temps suffisamment long avec un grand nombre de données et sans perte de signal, il est possible d'atteindre sur une fenêtre de fréquences réduite des résolutions supérieures à 10^6 pour un ion à m/z 1 000 dans un champ magnétique de 9.4 T. En mode large bande, il est possible d'atteindre des résolutions de 200 000. Plus généralement, dans les analyses de routines où la résolution n'est pas optimisée, il est courant d'obtenir des résolutions de l'ordre de 60 000.

La précision de masse dépend principalement de la résolution mais également d'autres paramètres comme la charge d'espace. En effet, la présence d'un très grand nombre d'ions piégés dans la cellule modifie le champ électrique et génère une force de répulsion qui va, à son tour, modifier la trajectoire des ions, et par-là même les mesures de masse. C'est pourquoi il est recommandé de travailler avec des faibles quantités d'ions pour limiter au maximum la déviation due à ce phénomène. On obtient dans ces conditions des précisions de masse de l'ordre de quelques ppm.

Un point sur lequel la FT-ICR n'est pas particulièrement bien placée est la gamme dynamique qui représente la capacité à discriminer des ions d'abondances différentes dans un même spectre. Le problème est lié à celui de la charge d'espace dans la mesure où les mouvements des ions de faible abondance sont perturbés par ceux des ions majoritairement présents dans la cellule. Il est admis qu'il est difficile de mesurer avec une bonne précision la masse d'un ion dont l'abondance est inférieure à 1% de celle de l'ion le plus abondant.

La gamme de masse, quant à elle, est en théorie quasi-illimitée. La limite de masse inférieure dépend uniquement de l'électronique, et plus précisément des capacités du digitaliseur et du générateur de fréquences. Pour un aimant de 9,4 T, équipé d'un digitaliseur de 5 MHz, cela équivaut à une limite inférieure de m/z 28,8. En ce qui concerne la limite supérieure, elle dépend de la capacité de la cellule à piéger les ions. Dans le cas d'un aimant de 9,4 T, cette limite est atteinte pour un ion de m/z 47 000 dans la cellule ICR. Malheureusement, ces problèmes apparaissent avant cette limite, notamment à cause des limites liées à la durée d'acquisition du signal (4,19 s pour notre instrument, ce qui revient à mesurer une fréquence de 0,34 Hz) et aux fréquences d'excitation (la gamme de fréquences pour l'excitation de notre appareil se situe entre 3 kHz et 10 MHz). De plus, il faut également

tenir compte des optiques de transfert (quadripôles, hexapôles) entre la source d'ionisation et l'entrée de la cellule ICR, qui ont leurs propres limites en rapport m/z .

2.3 Couplage avec la nano-chromatographie liquide (nanoLC)

2.3.1 La nanoLC

Pour optimiser les conditions d'analyse de mélanges complexes comme les digests de plasma, l'utilisation d'une chromatographie liquide en amont du spectromètre de masse est indispensable. Ce type de combinaison n'a cessé d'évoluer depuis les premiers essais décrits à la fin des années 1960 [71], avec en particulier le développement permanent de nouvelles interfaces d'ionisation et l'amélioration des techniques de vide installées sur les spectromètres de masse. L'avancée majeure est apparue dans les années 1980 avec les sources à pression atmosphérique. Elles ont permis d'adapter les débits de la chromatographie liquide tout en conservant une bonne sensibilité de l'analyse. C'est donc naturellement qu'elles sont combinées avec des spectromètres de masse à source microESI et nanoESI. Initialement conçues pour des configurations *off-line*, ces sources ont été ensuite utilisées *on-line* grâce au développement des chromatographies liquides à nanodébit (nanoLC). Ainsi ces dix dernières années, le couplage nanoLC-nanoESI/MS s'est largement répandu pour devenir aujourd'hui un outil indispensable dans l'analyse protéomique.

Au cours de nos études, les deux spectromètres de masses couplés à de la nanochromatographie liquide utilisent une chaîne nanoLC fournie par Dionex LC-Packings. La nanoLC présente un avantage important : l'augmentation de la sensibilité. En effet, il est démontré que la sensibilité croît significativement (près de 3800 fois) entre une nanoLC équipée d'une nanocolonne de 75 μm i.d et une HPLC conventionnelle avec une colonne de 4.6 mm i.d comme l'illustre la relation suivante [72, 73]:

$$\left(\frac{i.d \text{ HPLC}}{i.d \text{ nanoLC}}\right)^2 = \left(\frac{4.6}{0.075}\right)^2 = 3762$$

avec i.d respectivement les diamètres internes en millimètre d'une colonne conventionnelle et d'une nanocolonne. Ainsi, pour une même quantité d'analyte injectée et une même efficacité de colonne, la concentration sous un pic d'élution sera d'autant plus grande que le diamètre interne de la colonne sera petit. On démontre ainsi que la sensibilité est dépendante du diamètre interne de la colonne chromatographique.

2.3.2 Le mode « préconcentration »

Dans le but de maintenir les performances du système de nanoséparation, le débit, les capillaires de connection, le volume d'injection et la quantité de chargement d'échantillon doivent être réduits et adaptés au diamètre interne de la nanocolonne. En principe, le volume optimum d'injection et la capacité de chargement sont réduits proportionnellement au carré du diamètre interne de la colonne. Toutefois, il est possible de démontrer que la diminution du volume d'injection entraîne une perte en limite de détection. Pour pallier à ce problème, l'utilisation *in-line* de colonnes permet d'injecter de plus grands volumes : il s'agit du mode « pré-concentration ». Ce système nécessite deux vannes d'injection et deux systèmes de pompages indépendants (figure 2.21) ; en ce qui concerne la précolonne, elle est, en général, de faible longueur (quelques millimètres), sa phase stationnaire est similaire à celle de la colonne analytique, et son diamètre interne est d'une centaine de microns.

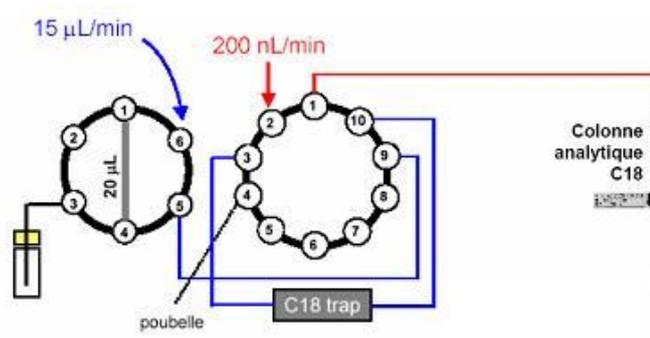


Figure 1.21 : Configuration de la boucle d'injection en mode "pré-concentration".

L'injection se déroule en trois étapes. Après avoir été chargé dans la boucle d'injection, l'échantillon est envoyé à l'aide d'un solvant ayant une faible force éluante en tête de précolonne pour y être concentré quelques minutes ; il sera ensuite élué par une élution inverse (« *back flush* ») et amené en tête de la colonne analytique pour y être séparé. En raison d'une capacité de chargement plus faible que les colonnes de diamètres internes supérieurs, un volume d'injection trop important peut provoquer une surcharge de la colonne voire la boucher, notamment lorsque l'on travaille avec des matrices complexes. C'est le cas de l'analyse de plasma, ou plus largement d'échantillons biologiques qui possèdent des concentrations en sel élevées. Pour éviter ce type de problèmes, l'utilisation d'une précolonne est nécessaire. Le mode « préconcentration » permet ainsi de concentrer mais également de dessaler et purifier un échantillon en ligne avant qu'il soit séparé sur la colonne analytique.

2.3.3 Les nanocolonnes

Les premières tentatives de développement de colonnes capillaires de très faible diamètre interne ont été réalisées dans les années 1980 par le groupe de Novotny [74, 75] et Jorgenson [76, 77]. Aujourd'hui les nanocolonnes sont proposées par plusieurs constructeurs (Waters, Dionex, etc). Diverses longueurs, types de phase stationnaire, de remplissage sont disponibles avec des coûts variables. Même si plusieurs tentatives ont été menées pour développer des colonnes dont le diamètre interne est de 20 μm [76, 78], le diamètre interne le plus couramment utilisé en nanoLC est de 75 μm .

2.4 Identification des protéines

La spectrométrie de masse représente un outil analytique de choix pour déterminer la structure primaire des protéines afin de les identifier de façon univoque. Il existe deux grandes stratégies en analyse protéomique, la stratégie « Bottom-Up » qui est la plus largement appliquée, et la stratégie « Top-Down ». Dans ces travaux de thèse, seule la première approche a été employée.

2.4.1 Stratégie « Bottom-Up »

La stratégie d'analyse Bottom-Up consiste à identifier une protéine à partir de ses peptides constitutifs. La Figure 1.22 présente les trois principales étapes de cette approche. Les protéines peuvent préalablement être séparées sur gel d'électrophorèse ou par chromatographie ; ainsi la première étape d'hydrolyse enzymatique s'effectue respectivement *in-gel* ou en solution (*off-gel*). La trypsine est l'enzyme la plus couramment utilisée dans la mesure où elle génère des peptides de masses relativement homogènes. Par ailleurs, d'autres enzymes (AspN, GluC etc) peuvent être employées en fonction de la composition en acides aminés des protéines d'intérêt. Il est également possible d'hydrolyser les protéines chimiquement, en ayant recours par exemple au bromure de cyanogène, qui cible les résidus méthionine et qui génère des peptides plus grands. La seconde étape consiste à analyser le mélange de peptides, et la dernière s'attache à identifier les protéines présentes dans l'échantillon initial par des outils bio-informatiques. A ce niveau, il existe deux méthodologies :

- La première méthode d'analyse s'appuie sur l'empreinte peptidique de la protéine (« *Peptide Mass Fingerprint* ») à partir d'un spectre MS comportant les rapports m/z de

chaque peptide du mélange. Cette étape est généralement effectuée par analyse MALDI-TOF MS. Les pics mono-isotopiques des peptides sont ensuite sélectionnés par un logiciel de retraitement (souvent spécifique de l'instrument) puis confrontés aux banques de données accessibles en ligne (par exemple, Swissprot, National Center for Biotechnology Information (NCBI)) via des interfaces d'interrogation de banques de données (MatrixScience/Mascot, ProteinProspector, Peaks).

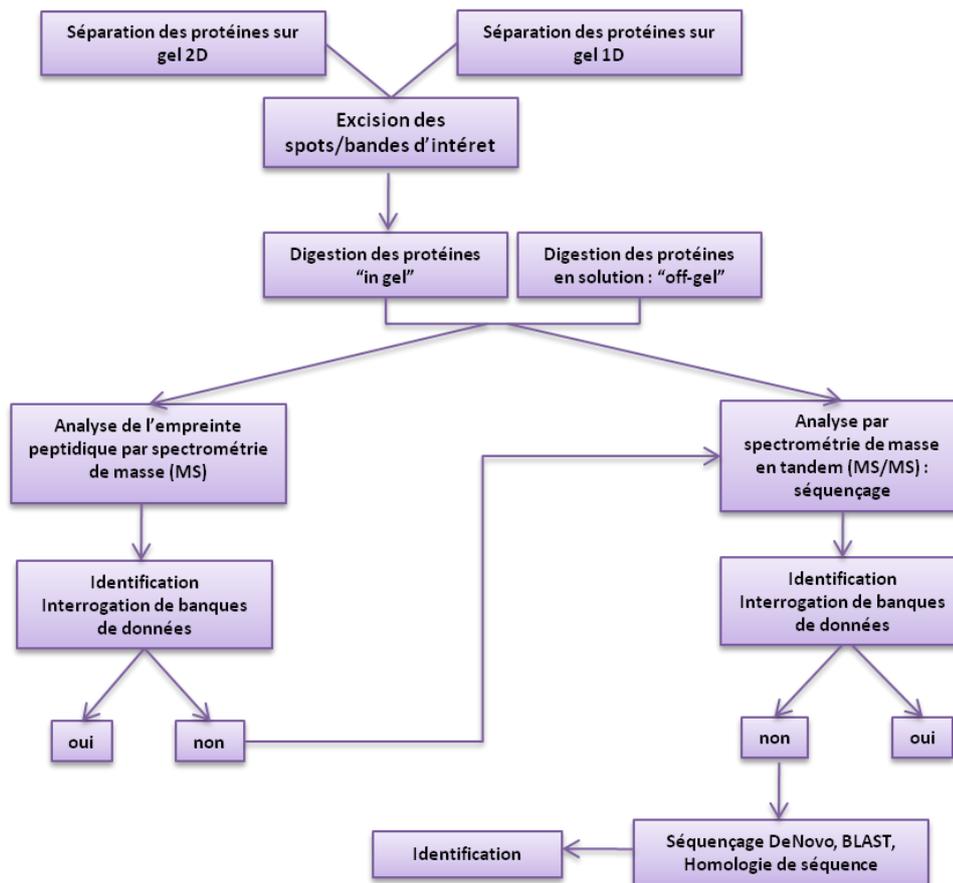


Figure 1.22 : L'approche Bottom-Up

- La seconde méthode d'analyse consiste à séquencer chaque peptide par spectrométrie de masse en tandem pour obtenir une information plus précise : la séquence en acides aminés des peptides. Ici, les peptides sont sélectionnés à partir de leur rapport m/z puis fragmentés dans le spectromètre de masse. Généralement, la fragmentation est réalisée dans une cellule de collision (multipôle rempli d'un gaz inerte, technique CAD/CID). La fragmentation peut être effectué par des lasers ; elle peut être ainsi générée (i) en source par un laser de type Nd/YAG (domaine infrarouge) que l'on trouve sur des instruments de type MALDI-TOF/TOF, on parle alors de technique LID [79] (*Laser-Induced Dissociation*), (ii) dans l'analyseur par un laser de type CO₂ pour la technique IRMPD [80] (*InfraRed Multiphoton*

PhotoDissociation). D'autres fragmentations peptidiques peuvent être réalisées par capture d'électrons [80][81] (*Electron Capture Dissociation*, ECD) ou par une technique similaire mettant en œuvre un radical anion pour le transfert de charge (*Electron Transfer Dissociation*, ETD). Toutes deux sont principalement employées pour l'identification de modifications peptidiques (glycosylation, phosphorylation) car celles-ci restent liées à la chaîne peptidique contrairement à la CID classique, ou pour la fragmentation de protéines intactes (cf approche Top-Down).

D'un point de vue structural, en fonction de la technique de fragmentation utilisée (plus ou moins énergétique), la structure peptidique est coupée sur différentes liaisons. La nomenclature de fragmentations des ions a été établie par Roepstorff et Fohlman en 1984 [82]. Ainsi, la figure 1.23 présente les sites de coupure d'un peptide composé de trois acides aminés, formant des ions *a*, *b*, *c* si la charge est portée du côté N-terminal du fragment, et des ions *y*, *x*, *z* si la charge est portée du côté C-terminal du fragment. Les (*a*,*x*), (*b*,*y*) et (*c*,*z*) sont complémentaires et forment des séries d'ions. L'indice correspond au nombre de résidus présents dans l'ion. Lors de la fragmentation de type CID/CAD, les ions de type *b* et *y* sont principalement observés ; lors de fragmentations plus énergétiques (type LID, ECD, ETD, IRMPD), les autres séries d'ions peuvent être observées.

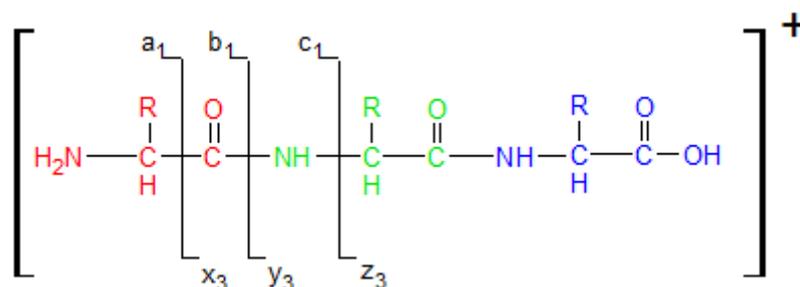


Figure 1.23 : Voies de fragmentation peptidique

Le séquençage peptidique par MS/MS devient incontournable lors d'études relatives (i) à la structure des peptides (substitutions d'acides aminés), (ii) aux modifications peptidiques (oxydation, phosphorylation, déamidation, glycosylation etc.) et (iii) aux espèces non-séquencées où la notion de séquençage prend ici toute sa valeur.

2.4.2 Stratégie « Top-Down »

La technique appelée « protéomique Top-Down » permet l'analyse d'une protéine native sans étape d'hydrolyse chimique ou enzymatique préalable. La protéine native est directement fragmentée dans le spectromètre de masse (source ou analyseur en fonction de l'instrument utilisé). Le terme Top-Down a été introduit par McLafferty dès la fin des années 1990 [83]. Pour ce type d'approche, il est nécessaire d'être équipé d'un spectromètre de masse comportant une technique de fragmentation énergétique ; par exemple un appareillage de type MALDI-TOF-TOF peut convenir pour la fragmentation de protéines de faibles masses moléculaires, par exemple avec l'utilisation de la fragmentation en source ISD (*In Source Decay*) [84]. Cependant, par la complexité des spectres obtenus, les analyseurs de très haute résolution restent plus adaptés à l'analyse protéomique *top-down* [83]. Ainsi, utilisant la fragmentation de type ECD (*Electron Capture Dissociation*) des protéines de masses moléculaires supérieures à 200 kDa ont pu être analysées et identifiées [85]. La technique ETD (*Electron Transfert Dissociation*) est au même titre que l'ECD utilisée pour l'analyse Top-Down [86]. L'analyse de protéine native trouve également son intérêt dans l'étude de modifications protéiques puisqu'aucun traitement préalable à l'analyse n'est effectué contrairement à l'approche Bottom-Up [87].

3 La protéomique du plasma et médecine transfusionnelle

En médecine transfusionnelle, l'analyse protéomique a été particulièrement appliquée pour l'étude des globules [88-90] et des plaquettes [91, 92] (figure 1.24). Toutefois, sa méthodologie n'a commencé à être employée que très récemment pour la caractérisation du plasma transfusionnel [93-95]. En effet, plusieurs traitements existent pour l'inactivation des pathogènes afin d'assurer la qualité des plasmas destinés à la transfusion [8, 9, 96, 97]. Très peu de travaux sont publiés en lien avec ces traitements ou avec les conditions de stockages de poches de plasma et utilisent une approche protéomique. Après avoir fait un état des connaissances de la protéomique du plasma, un tour d'horizon des études protéomiques menées sur les traitements d'inactivation et des conditions de conservation du plasma sera présenté.

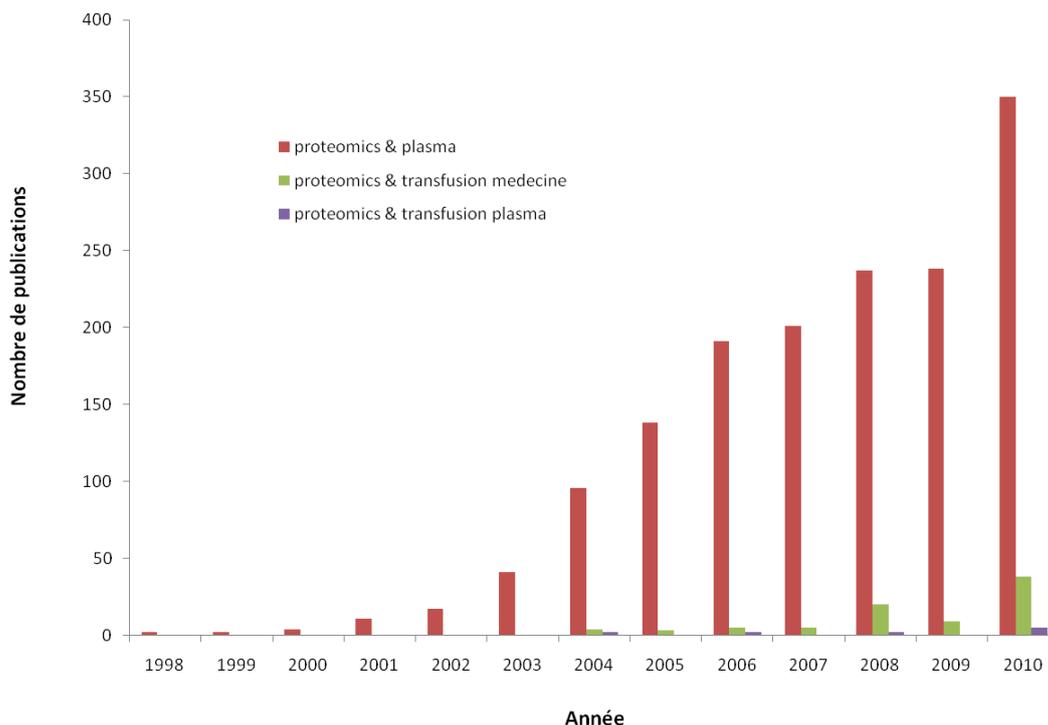


Figure 1.24 : Evolution du nombre de publications associant les termes "proteomics" et "plasma", au cours de ces treize dernières années.

3.1 La protéomique du plasma

L'histoire du protéome plasmatique [2, 5-8, 98, 99] est étroitement liée à celui de la protéomique elle-même [94] du fait de sa corrélation avec le protéome entier humain et de son hétérogénéité.

Peu après que Sverdberg ait découvert que les protéines possédaient des masses moléculaires uniques par ultracentrifugation [100], Tiselius [101] a démontré qu'il était possible de séparer les éléments du sérum en se basant sur les propriétés électrophorétiques. Sa méthode d'électrophorèse utilisait différents supports, tout d'abord liquide puis des matrices anti-convectives comme le papier, l'acétate de cellulose, l'amidon ou encore le polyacrylamide. Dès lors, les techniques n'ont fait qu'évoluer, améliorant constamment la résolution de la séparation.

Immédiatement après l'introduction de l'électrophorèse bidimensionnelle en 1975 par Klose et O'Farrell, la technique a été appliquée à la séparation de protéines plasmatiques, permettant ainsi le premier criblage du protéome du plasma [98] et identifiant 40 polypeptides. En 1991, une banque de données a été établie, basée sur la 2DE du plasma humain : 727 spots protéiques étaient résolus dont 376 avaient pu être identifiés sous la forme de 49 protéines différentes [102]. L'année suivante, une cartographie du plasma établie à partir d'un gradient de pH immobilisé pour la première dimension de séparation a été

Chapitre 1

présentée en utilisant du micro-séquençage pour l'identification d'une quarantaine de protéines [103].

La forte abondance de quelques protéines dans le plasma (albumine, transferrine, immunoglobulines etc.) ainsi que la diversité des glycoprotéines et des immunoglobulines contribuent à limiter l'analyse de plasma non-fractionné par 2DE. Ainsi, en combinant la 2DE avec une (ou plusieurs) étape de fractionnement, cette limitation peut être repoussée. On parle alors de déplétion ; elle s'effectue le plus souvent à partir d'immuno-affinité [85]. Il est possible de s'affranchir des 14 protéines les plus abondantes [104] ; une étude récente a reporté une déplétion de 89 protéines [105]. D'autres approches chromatographiques peuvent être employées (gel filtration, échange ionique, interaction hydrophobe) générant de nombreuses fractions qui peuvent être ensuite séparées par 2DE. Ainsi, plus de 250 protéines avec un numéro d'accession unique ont pu être au total identifiées par spectrométrie de masse.

Une organisation scientifique internationale s'est constituée en 2001, l'HUman Proteome Organization (<http://www.hupo.org/>) dans le but d'accélérer le développement de la protéomique et de stimuler les collaborations internationales. Elle regroupe plusieurs thématiques, dont un projet spécifique d'étude du plasma : le HUPO-PPP (Plasma Proteome Project). L'apparition de nouvelles approches complémentaires et l'évolution des techniques préparatives ont définitivement contribué à la croissance de ce projet et ont progressivement fait augmenter les connaissances sur les protéines plasmatiques. La recherche de nouvelles protéines plasmatiques est loin d'être terminée et de nombreux auteurs y ont encore contribué ces dernières années [106-108]. En 2002, une liste de 289 protéines était établie à partir d'une approche protéomique classique présentée dans l'annexe 1.1. Depuis l'intérêt pour ce protéome si particulier n'a cessé de croître comme en témoigne la Figure 1.24, et son étude a su profiter du développement technologique des sciences analytiques. Ce dernier a permis un élargissement des applications (clinique, diagnostique, thérapeutique) grâce à la combinaison d'appareillages de grande sensibilité et rapidité. Ainsi, actuellement, plus de 7500 protéines et isoformes, et plus de 5200 modifications post-traductionnelles sont enregistrées dans la base de données du protéome plasmatique accessible en ligne (<http://www.plasmaproteomedatabase.org/>).

3.2 Impact des traitements d'inactivation sur les protéines plasmatiques

Il existe plusieurs procédés d'inactivation virale qui peuvent être appliqués au plasma. Ils reposent sur des traitements physico-chimiques (solvant/détergent), traitements photochimiques (bleu de méthylène (BM), riboflavine, amotosalen) ou encore traitements thermiques (pasteurisation). L'analyse protéomique est encore peu utilisée ; seul le traitement au bleu de méthylène a été l'objet d'études protéomiques. Les autres traitements ont été caractérisés par des études biologiques basées, le plus souvent, sur des tests d'activités.

En 1994, Tissot a comparé par une 2DE de haute résolution un PFC traité au bleu de méthylène et un PFC non traité [109]. Aucune modification majeure ne semblait s'opérer. Plus récemment, des travaux [110] se sont intéressés aux effets de ce traitement suivi de l'élimination du BM à différentes concentrations et différents temps d'exposition à la lumière grâce à la combinaison de la 2DE et de la LC-ESI-MS/MS. Des modifications ont été notées : altérations fonctionnelles de la chaîne gamma du fibrinogène, une présence accrue d'un des isoformes de la transthyréline ainsi qu'un changement du profil électrophorétique de l'apolipoprotéine A-I suggérant l'existence de modifications. D'autres facteurs de coagulation se trouvent également impactés [9, 111]: réduction de l'ordre de 24 à 39 % du fibrinogène, de 4 à 32% du facteur V, de 13 à 33 % du facteur VIII, de 11 à 23 % du facteur IX et de 17 à 27 % du facteur XI.

Concernant le traitement au solvant/détergent, ce n'est que très récemment que des modifications ont été observées. On note une diminution de l'alpha-2-antitrypsine et de la protéine S et quelques altérations des alpha-1- et 2- antitrypsines, l'alpha-1-anti-chymotrypsine, l'alpha-2-antiplasmine, la clustérine et les apolipoprotéines E et L-1 [5, 94].

Le traitement à l'amotosalen présente des altérations similaires à celles observées dans le traitement au bleu de méthylène (diminution du taux de fibrinogène, du facteur V, VII, VIII et X de 17 à 30%) [112-115].

Les recherches sur le plasma pasteurisé sont également très peu documentées mais les premières études ne montrent aucune diminution significative du taux des protéines de la coagulation par rapport aux valeurs physiologiques normales [4].

3.3 Impact de la conservation et des conditions destockage du plasma transfusionnel

La législation impose que les poches de plasmas collectées doivent être traitées et congelées dans les douze heures qui suivent la collecte. En effet, les plasmas doivent être filtrés pour être déleucocytés dans les 6 heures et viro-atténués (bleu de méthylène, amotosalen, solvant-détergent). Si la durée excède 12 heures après la collecte, les poches sont dirigées vers les établissements de fractionnement (LFB, Diagast) qui produiront des produits dérivés du sang.

Améliorer les conditions de stockage et le temps de conservation du plasma transfusionnel engendre des répercussions tant cliniques qu'économiques. Le domaine de la protéomique a déjà permis certaines observations qui pourront guider les scientifiques au développement de nouvelles stratégies de conservation.

Des études ont été menées sur les températures de stockage du plasma notamment dans le cadre de la standardisation des paramètres d'analyse des échantillons de plasmas pour le HUPO-PPP [116]. Des analyses SELDI-TOF n'ont montré aucune différence significative durant les 2 premiers mois de stockage de plasmas à -20°C, -80°C et sous azote liquide alors que certaines modifications ont été observées lors de conservation à température ambiante (23°C) et réfrigérée (4°C). Dans ces conditions, il a été montré que la quantité de lactate deshydrogénase, d'aspartate-amino transférase et de lipase décroît à température ambiante au bout de plus de 2 mois de stockage. Des altérations de l'amylase et de l'alanine-amino transférase à température ambiante et à -20°C sont observées au bout de la même période. On relève des taux de LDL et de HDL en augmentation après un long moment à température ambiante.

D'un point de vue protéomique, peu d'informations sont disponibles sur la stabilité des protéines dans le plasma lyophilisé. Toutefois, en 2008, une étude protéomique quantitative [117] s'est intéressée aux caractéristiques d'un pool de plasma lyophilisé et traité au solvant/détergent, après 24 mois de stockage. Elle a permis de montrer, par une analyse 2D-DIGE, qu'aucune modification de sa composition protéique n'était imputable à ce mode de conservation.

Enfin, en ce qui concerne le plasma conservé sous forme liquide, il a été démontré que les tests d'activité des facteurs de coagulation étaient remarquablement stables après plusieurs jours de conservation [16, 17]. Cependant, aucune étude protéomique n'a été réalisée à ce jour pour confirmer la stabilité des protéines plasmatiques.

Conclusion

Jusqu'à présent, le contrôle qualité du PFC est basé sur des épreuves systématiques de pesage de la poche, des épreuves par sondage sur le produit fini (absence de floculats après décongélation, absence de fuites des poches...) et des tests biologiques (immunoélectrophorèse, dosage du fibrinogène, des protéines totales...).

La protéomique a prouvé qu'elle pouvait être un outil très utile dans l'analyse des produits sanguins, notamment les globules rouges et les plaquettes. Durant la dernière décennie, la protéomique a permis de mettre en avant des modifications de protéines plasmatiques selon les traitements subis par le plasma (inactivation virale, conservation, stockage) mais sans être complètement exploitée. Encore peu d'investigations ont eu lieu sur le plasma transfusionnel mais, avec l'évolution des connaissances du protéome plasmatique, les applications protéomiques sont en constante augmentation dans la médecine transfusionnelle.

Ainsi, les analyses protéomiques peuvent venir compléter les tests biologiques et les études cliniques déjà réalisées sur les produits sanguins labiles avant leur administration. Certaines hypothèses dans la compréhension des mécanismes menant aux effets cliniques observés peuvent ainsi être validées par des analyses protéomiques complémentaires.

La protéomique peut jouer une part importante dans le contrôle-qualité afin d'assurer la qualité du plasma transfusionnel. L'analyse protéomique apparaît donc comme un outil de validation supplémentaire à ceux existants déjà.

C'est pourquoi, le domaine de la protéomique et de la médecine transfusionnelle apparaissent comme complémentaires pour améliorer la qualité des PSL.

Bibliographie

1. Issaq HJ, Xiao Z, Veenstra TD: Serum and Plasma Proteomics. *Chemical Reviews* 2007; 107:3601-20.
2. Anderson NL, Anderson NG: The Human Plasma Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* 2002; 1:845-67.
3. Putnam FW, Editor. The Plasma Proteins: Structure, Function, and Genetic Control, Vol. 5. 2nd Ed; 1987.
4. Naegelen C, Isola H, Dernis D, et al.: Evolution of techniques for preparation of labile blood products (LBP): pathogen inactivation in LBP. *Transfusion Clinique et Biologique* 2009; 16:179-89.
5. Bryant BJ, Klein HG: Pathogen inactivation. The definitive safeguard for the blood supply. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2007; 131:719-33.
6. Pamphilon D: Viral inactivation of fresh frozen plasma. *British Journal of Haematology* 2000; 109:680-93.
7. Allain JP, Bianco C, Blajchman MA, et al.: Protecting the Blood Supply From Emerging Pathogens: The Role of Pathogen Inactivation. *Transfusion Medicine Reviews* 2005; 19:110-26.
8. McCullough J: Pathogen inactivation: a new paradigm for blood safety. *Transfusion* 2007; 47:2180-4.
9. Solheim BG: Pathogen reduction of blood components. *Transfusion and Apheresis Science* 2008; 39:75-82.
10. Petermann R, Piquet Y, Lapeyre M, et al.: Détection du génome viral du parvovirus B19 dans les pools de plasmas servant à la préparation du plasma frais congelé traité pour viro-atténuation par solvant-détergent : expérience de l'Afssaps et de l'EFS Aquitaine-Limousin. *Transfusion Clinique et Biologique*; 17:54-62.
11. Ciaravino V, McCullough T, Cimino G, Sullivan T: Preclinical safety profile of plasma prepared using the INTERCEPT Blood System. *Vox Sanguinis* 2003; 85:171-82.
12. Burnouf-Radosevich M, Burnouf T, Huart JJ: Industrial pasteurization of plasma and criteria of quality. *Revue française de transfusion et d'hémodiologie : bulletin de la Société nationale de transfusion sanguine* 1993; 36:93-102.
13. Burnouf-Radosevich M, Burnouf T, Huart JJ: A Pasteurized Therapeutic Plasma. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 1992; 19:91-4.
14. Schlegel A, Immelmann A, Kempf C: Virus inactivation of plasma-derived proteins by pasteurization in the presence of guanidine hydrochloride. *Transfusion* 2001; 41:382-9.
15. Bakaltcheva I, O'Sullivan AM, Hmel P, Ogbu H: Freeze-dried whole plasma: Evaluating sucrose, trehalose, sorbitol, mannitol and glycine as stabilizers. *Thromb Res* 2007; 120:105-16.
16. von Heymann C, Keller Mareike K, Spies C, et al.: Activity of clotting factors in fresh-frozen plasma during storage at 4 degrees C over 6 days. *Transfusion* 2009; 49:913-20.

17. Lamboo M, Poland DCW, Eikenboom JCJ, et al.: Coagulation parameters of thawed fresh-frozen plasma during storage at different temperatures. *Transfusion Medecine* 2007; 17:182-6.
18. Kahn P: Molecular Bioogy : From genome to proteome: Looking at a cell's proteins. *Science* 1995; 270:369-70.
19. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, et al.: From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Arnino Acid Analysis. *Nature Biotechnology* 1996; 14:61-5.
20. Shapiro A, Viñuela E, Maizel J: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 28:815-20.
21. O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 1975; 250:4007-21.
22. Hjertén S, Mosbach R: "Molecular-sieve" chromatography of proteins on columns of cross-linked polyacrylamide. *Analytical Biochemistry* 1962; 3:109-18.
23. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London, U K)* 1970; 227:680-5.
24. Swank RT, Munkres KD: Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Analytical Biochemistry* 1971; 39:462-77.
25. Wittig I, Braun H-P, Schagger H: Blue native PAGE. *Nature Protocols* 2006; 1:418-28.
26. Schägger H, von Jagow G: Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 1991; 199:223-31.
27. Zilberstein G, Bukshpan S, Righetti PG: Third generation of focusing: Gel matrices with immobilized cation gradients. *Electrophoresis* 2010; 31:1747-53.
28. Rabilloud T, Vaezzadeh AR, Potier N, Lelong C, Leize-Wagner E, Chevallet M: Power and limitations of electrophoretic separations in proteomics strategies. *Mass Spectrometry Reviews* 2009; 28:816-43.
29. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W: Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988; 9:255-62.
30. Rabilloud T: Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: A 10-year synthesis. *Electrophoresis* 1990; 11:785-94.
31. Tokarski C, Cren-Olivé C, Fillet M, Rolando C: High-sensitivity staining of proteins for one- and two-dimensional gel electrophoresis using post migration covalent staining with a ruthenium fluorophore. *Electrophoresis* 2006; 27:1407-16.
32. Patton WF: Detection technologies in proteome analysis. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2002; 771:3-31.
33. Nishihara JC, Champion KM: Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain. *Electrophoresis* 2002; 23:2203-15.

34. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R: Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97:9390-5.
35. Shaw J, Rowlinson R, Nickson J, et al.: Evaluation of saturation labeling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* 2003; 3:1181-95.
36. Graham G, Nairn RS, Bates GW: Polyacrylamide gel staining with Fe²⁺-bathophenanthroline sulfonate. *Analytical Biochemistry* 1978; 88:434-41.
37. Berggren K, Steinberg TH, Lauber WM, et al.: A Luminescent Ruthenium Complex for Ultrasensitive Detection of Proteins Immobilized on Membrane Supports. *Analytical Biochemistry* 1999; 276:129-43.
38. Rabilloud T, Strub J-M, Luche S, Girardet JL, van Dorsselaer A, Lunardi J: Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate), a powerful fluorescent stain for detection of proteins in gel with minimal interference in subsequent mass spectrometry analysis. *Proteome* 2000; 1:1-14.
39. Steinberg TH, Haugland RP, Singer VL: Applications of SYPRO Orange and SYPRO Red Protein Gel Stains. *Analytical Biochemistry* 1996; 239:238-45.
40. Malone JP, Radabaugh MR, Leimgruber RM, Gerstenecker GS: Practical aspects of fluorescent staining for proteomic applications. *Electrophoresis* 2001; 22:919-32.
41. Steinberg TH, Lauber WM, Berggren K, Kemper C, Yue S, Patton WF: Fluorescence detection of proteins in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using environmentally benign, nonfixative, saline solution. *Electrophoresis* 2000; 21:497-508.
42. Edman P, Begg G: A Protein Sequenator. *European Journal of Biochemistry* 1967; 1:80-91.
43. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A: Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 2001; 70:437-73.
44. Posthumus MA, Kistemaker PG, Meuzelaar HLC, Ten Noever de Brauw MC: Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules. *Analytical Chemistry* 1978; 50:985-91.
45. Karas M, Hillenkamp F: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 1988; 60:2299-301.
46. Tanaka K, Waki H, Ido Y, et al.: Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1988; 2:151-3.
47. Hillenkamp F, Karas M, Ingendoh A, Stahl B: Matrix assisted UV-laser desorption/ionization: a new approach to mass spectrometry of large biomolecules. 1990:49-60.
48. Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB: Molecular Beams of Macroions *Journal of Chemical Physics* 1968; 49:2240-9.
49. Yamashita M, Fenn JB: Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry* 1984; 88:4451-9.
50. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM: Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (Washington, D C, 1883-)* 1989; 246:64-71.

51. Kebarle P: A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2000; 35:804-17.
52. Gomez A, Tang K: Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. *Physics of Fluids* 1994; 6:404-15.
53. Iribarne J, Thomson B: On the evaporation of small ions from charged droplets *Journal of Chemical Physics* 1976; 64:2287-94.
54. Ferrige AG, Seddon MJ, Green BN, Jarvis SA, Skilling J, Staunton J: Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1992; 6:707-11.
55. Wilm MS, Mann M: Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 1994; 136:167-80.
56. Wilm M, Mann M: Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source. *Analytical Chemistry* 1996; 68:1-8.
57. Wiley WC, McLaren IH: Time of Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Review of Scientific Instruments* 1955; 26:1150-7.
58. Medzihradszky KF, Campbell JM, Baldwin MA, et al.: The Characteristics of Peptide Collision-Induced Dissociation Using a High-Performance MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* 1999; 72:552-8.
59. Morris HR, Paxton T, Dell A, et al.: High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 1996; 10:889-96.
60. Shevchenko A, Chernushevich I, Ens W, et al.: Rapid 'de novo' peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1997; 11:1015-24.
61. Paul W, Steinwedel H: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Zeitschrift Naturforschung Teil A* 1953; 8.
62. Paul W, Reinhard HP, von Zahn U: Das elektrische Massenfilter als Massenspektrometer und Isotopentrenner. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* 1958; 152:143-82.
63. March R, Hughes R. In: Quadrupole Storage Mass Spectrometry.
64. De Hoffmann E, Stroobant V. In: Mass Spectrometry : Principles and Applications.
65. Yost RA, Enke CG: Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer. *Journal of the American Chemical Society* 1978; 100:2274-5.
66. Hipple J, Sommer H, Thomas H: A Precise Method of Determining the Faraday by Magnetic Resonance. *Physical Review* 1949; 76:1877-8.
67. Comisarow M, Marshall A: Selective-phase Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy. *Canadian Journal of Chemistry* 1974; 52:1997-9.
68. Comisarow MB, Marshall AG: Frequency-sweep fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chemical Physics Letters* 1974; 26:489-90.

69. Comisarow MB, Marshall AG: Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chemical Physics Letters* 1974; 25:282-3.
70. Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS: Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews* 1998; 17:1-35.
71. Tal'roze V, Skurat V, Karpov G: Use of a mass spectrometer with a capillary system for admitting the sample as a liquid chromatograph detector. *Russ J Phys Chem* 1969; 43:452-3.
72. Abian J, Oosterkamp AJ, Gelpí E: Comparison of conventional, narrow-bore and capillary liquid chromatography/mass spectrometry for electrospray ionization mass spectrometry: practical considerations. *Journal of Mass Spectrometry* 1999; 34:244-54.
73. Chervet JP, Ursem M, Salzmänn JP: Instrumental Requirements for Nanoscale Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* 1996; 68:1507-12.
74. Karlsson KE, Novotny M: Separation efficiency of slurry-packed liquid chromatography microcolumns with very small inner diameters. *Analytical Chemistry* 1988; 60:1662-5.
75. McGuffin VL, Novotný M: Optimization and evaluation of packed capillary columns for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1983; 255:381-93.
76. Kennedy RT, Jorgenson JW: Preparation and evaluation of packed capillary liquid chromatography columns with inner diameters from 20 to 50 micrometers. *Analytical Chemistry* 1989; 61:1128-35.
77. Kennedy RT, Jorgenson JW: Efficiency of packed microcolumns compared with large-bore packed columns in size-exclusion chromatography. *Journal of Microcolumn Separations* 1990; 2:120-6.
78. Ivanov AR, Zang L, Karger BL: Low-Attomole Electrospray Ionization MS and MS/MS Analysis of Protein Tryptic Digests Using 20- μ m-i.d. Polystyrene-Divinylbenzene Monolithic Capillary Columns. *Analytical Chemistry* 2003; 75:5306-16.
79. Marshall A, Clark A, Jennings R, Ledingham KWD, Sander J, Singhal RP: Laser-induced dissociation, ionization and fragmentation processes in nitroaromatic molecules. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 1992; 116:143-56.
80. Hakansson K, Cooper HJ, Emmett MR, Costello CE, Marshall AG, Nilsson CL: Electron capture dissociation and infrared multiphoton dissociation MS/MS of an N-glycosylated tryptic peptide to yield complementary sequence information. *Anal Chem* 2001; 73:4530-6.
81. Cooper HJ, Hakansson K, Marshall AG: The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis. *Mass Spectrom Rev* 2005; 24:201-22.
82. Roepstorff P, J JF: Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry* 1984; 11:601.
83. Kelleher NL, Lin HY, Valaskovic GA, Aaserud DJ, Fridriksson EK, McLafferty FW: Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* 1999; 121:806-12.

84. Wynne C, Fenselau C, Demirev PA, Edwards N: Top-Down Identification of Protein Biomarkers in Bacteria with Unsequenced Genomes. *Analytical Chemistry* 2009; 81:9633-42.
85. Gong Y, Li X, Yang B, et al.: Different Immunoaffinity Fractionation Strategies to Characterize the Human Plasma Proteome. *Journal of Proteome Research* 2006; 5:1379-87.
86. Whitelegge J: Tandem mass spectrometry of integral membrane proteins for top-down proteomics. *Trends in Analytical Chemistry* 2005; 24:576-82.
87. Siuti N, Kelleher NL: Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. *Nature Methods* 2007; 4:817-21.
88. D'Alessandro A, Righetti PG, Zolla L: The Red Blood Cell Proteome and Interactome: An Update. *Journal of Proteome Research* 2009; 9:144-63.
89. Goodman SR, Kurdia A, Ammann L, Kakhiashvili D, Daescu O: The Human Red Blood Cell Proteome and Interactome. *Exp Biol Med* 2007; 232:1391-408.
90. Pasini EM, Mann M, Thomas AW: Red blood cell proteomics. *Transfusion Clinique et Biologique* 2010; 17:151-64.
91. Schubert P, Devine DV: Proteomics meets blood banking: Identification of protein targets for the improvement of platelet quality. *Journal of Proteomics* 2010; 73:436-44.
92. Senzel L, Gnatenko DV, Bahou WF: The platelet proteome. *Current Opinion in Hematology* 2009; 16:329-33.
93. Devine DV, Schubert P: Proteomic applications in blood transfusion: working the jigsaw puzzle. *Vox Sanguinis* 2011; 100:84-91.
94. Thiele T, Steil L, Voelker U, Greinacher A: Proteomics of blood-based therapeutics: a promising tool for quality assurance in transfusion medicine. *BioDrugs* 2007; 21:179-93.
95. D'Alessandro A, Zolla L: Proteomics for quality-control processes in transfusion medicine. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398:111-24.
96. Pelletier JPR, Transue S, Snyder EL: Pathogen inactivation techniques. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2006; 19:205-42.
97. Prowse C: Pathogen inactivation of blood components. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine* 2008; 10:139-46.
98. Anderson L, Anderson NG: High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1977; 74:5421-5.
99. Anderson NL, Anderson NG: Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 1998; 19:1853-61.
100. Svedberg TP, K. O. . The Ultracentrifuge; 1940.
101. Tiselius A: Electrophoresis of serum globulin. II. Electrophoretic analysis of normal and immune serum. *Biochemical Journal* 1937; 31:1464-77.
102. Anderson NL, Anderson NG: A two-dimensional gel database of human plasma proteins. *Electrophoresis* 1991; 12:883-4.
103. Hughes GJ, Frutiger S, Paquet N, et al.: Plasma protein map: an update by microsequencing. *Electrophoresis* 1992; 13:707-14.
104. Pieper R, Su Q, Gatlin CL, Huang S-T, Anderson NL, Steiner S: Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: An innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome. *Proteomics* 2003; 3:422-32.

105. Lin B, White JT, Wu J, et al.: Deep depletion of abundant serum proteins reveals low-abundant proteins as potential biomarkers for human ovarian cancer. *Proteomics – Clinical Applications* 2009; 3:853-61.
106. Zheng X, Wu S-l, Hincapie M, Hancock WS: Study of the human plasma proteome of rheumatoid arthritis. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216:3538-45.
107. Qian W-J, Kaleta DT, Petritis BO, et al.: Enhanced detection of low abundance human plasma proteins using a tandem IgY12-SuperMix immunoaffinity separation strategy. *Molecular & Cellular Proteomics* 2008; 7:1963-73.
108. Schenk S, Schoenhals G, de Souza G, Mann M: A high confidence, manually validated human blood plasma protein reference set. *BMC Medical Genomics* 2008; 1:41.
109. Tissot JD, Hochstrasser DF, Schneider B, Morgenthaler JJ, Schneider P: No evidence for protein modifications in fresh frozen plasma after photochemical treatment: an analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *British Journal of Haematology* 1994; 86:143-6.
110. Crettaz D, Sensebe L, Vu D-H, et al.: Proteomics of methylene blue photo-treated plasma before and after removal of the dye by an absorbent filter. *Proteomics* 2004; 4:881-91.
111. Solheim BG, Seghatchian J: Update on pathogen reduction technology for therapeutic plasma: an overview. *Transfusion and Apheresis Science* 2006; 35:83-90.
112. Smith J, Rock G: Protein quality in Mirasol pathogen reduction technology-treated, apheresis-derived fresh-frozen plasma. *Transfusion* 2010; 50:926-31.
113. Solheim BG, Seghatchian J: The six questions of pathogen reduction technology: An overview of current opinions. *Transfusion and Apheresis Science* 2008; 39:51-7.
114. Bihm DJ, Ettinger A, Buytaert-Hoefen KA, et al.: Characterization of plasma protein activity in riboflavin and UV light-treated fresh frozen plasma during 2 years of storage at -30°C . *Vox Sang* 2010; 98:108-15.
115. Osselaer J-C, Debry C, Goffaux M, et al.: Coagulation function in fresh-frozen plasma prepared with two photochemical treatment methods: methylene blue and amotosalen. *Transfusion (Malden, MA, United States)* 2008; 48:108-17.
116. Rai A, Gelfand C, Haywood B, et al.: HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: Towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics* 2005; 5:3262-77.
117. Steil L, Thiele T, Hammer E, et al.: Proteomic characterization of freeze-dried human plasma: providing treatment of bleeding disorders without the need for a cold chain. *Transfusion* 2008; 48:2356-63.

Annexes

Annexe 1.1: Liste de 289 protéines identifiées dans le plasma en 2002 [2]

5'-Nucleotidase	Collagen I n-terminal propeptide	Growth Hormone	N-Acetylmuramyl-L-alanine amidase
Acid labile subunit of IGFBP	Collagen I n-terminal telopeptide (NTx)	Growth Hormone Binding Protein	Neuron-specific Enolase
Acid phosphatase, tartrate-resistant	Collagen III c-terminal propeptide	Haptoglobin alpha-1	Neutrophil-activating peptide 2
Acid phosphatase, prostatic	Collagen III n-terminal propeptide	Haptoglobin alpha-2-chain	Osteocalcin
Actin beta (from platelets)	Collagen IV 7S n-terminal propeptide	Haptoglobin beta chain	Osteonectin
Actin gamma (from platelets)	Complement C1 Inhibitor	Haptoglobin beta chain, cleaved	Pancreatic zymogen granule membrane protein GP-2
Adenosine Deaminase	Complement C1q, A	Haptoglobin-related gene product	Paraoxonase
Adiponectin	Complement C1q, B	Hemoglobin, alpha	Parathyroid Hormone
Alanine aminotransferase (ALT)	Complement C1q, C	Hemoglobin, beta	Parathyroid Hormone-Related Protein
Albumin	Complement C1r	Hemopexin (Beta-1B-glycoprotein)	PASP
Aldolase (muscle type)	Complement C1s	Histidine-rich Alpha-2-glycoprotein	Pepsinogen A
Alkaline Phosphatase (bone)	Complement C2	ICAM-1, soluble	Plasma hyaluronan binding protein
Alpha1,3-fucosyltransferase (FUT6)	Complement C3A anaphylotoxin	Ig Kappa light chain	Plasma kallikrein
Alpha-1-acid Glycoprotein	Complement C3B, alpha'	Ig Lambda light chain	Plasma serine protease inhibitor
Alpha-1-Antichymotrypsin	Complement C3B, beta	IgA1	Plasminogen - Glu
Alpha-1-Antitrypsin	Complement C4 anaphylotoxin	IgA2	Plasminogen - Lys
Alpha-1-B Glycoprotein	Complement C4, alpha	IgD	Platelet Factor 4
Alpha-1-Microglobulin	Complement C4, beta	IgE	Pre-alpha trypsin inhibitor, H3
Alpha-2-Antiplasmin	Complement C4, gamma	IGFBP-3	Pregnancy-associated plasma protein-A
Alpha-2-HS Glycoprotein	Complement C4-binding protein, alpha	IgG1	Pregnancy-associated plasma protein-A2
Alpha-2-Macroglobulin	Complement C4-binding protein, beta	IgG2	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 3
Alpha-fetoprotein	Complement C5A anaphylotoxin	IgG3	Prolactin
Amylase (pancreatic)	Complement C5B, alpha'	IgG4	Prolyl hydroxylase, alpha
Angiostatin	Complement C6	IgJ-chain	Prolyl hydroxylase, beta
Angiotensin converting enzyme (ACE)	Complement C7	IgM	Prostaglandin-H2 D-isomerase
Angiotensinogen	Complement C8, alpha	Inhibin (activin), beta A	Prostate Specific Antigen
Antithrombin III (AT3)	Complement C8, beta	Inhibin (activin), beta B	Protein C, H
Apolipoprotein A-I	Complement C8, gamma	Inhibin (activin), beta C	Protein C, L
Apolipoprotein A-II	Complement C9	Inhibin (activin), beta E	Protein S
Apolipoprotein A-IV	Complement Factor B	Inhibin, alpha	Protein Z
Apolipoprotein B-100	Complement Factor B - Bb Fragment	Insulin C-Peptide	P-selectin, soluble
Apolipoprotein B-48	Complement Factor D	Insulin, A chain	Rantes
Apolipoprotein C-I	Complement Factor H	Insulin, B chain	Renin
Apolipoprotein C-II	Complement Factor I	Insulin-like growth factor IA	Retinol Binding Protein
Apolipoprotein C-III	Connective Tissue Activating Peptide III	Insulin-like growth factor II	S100 protein
Apolipoprotein C-IV	Corticotropin Releasing Hormone (CRH)	Inter-alpha trypsin inhibitor, H1	Secretogranin V
Apolipoprotein D	C-reactive Protein	Inter-alpha trypsin inhibitor, H2	Serum Amyloid A
Apolipoprotein E	Creatine Kinase, B	Inter-alpha trypsin inhibitor, H4	Serum Amyloid P
Apolipoprotein F	Creatine Kinase, M	Inter-alpha-trypsin inhibitorL	Sex Hormone Binding Globulin
Apolipoprotein H	Cystatin C	Interferon Alpha	Tetranectin
Apolipoprotein J (Clusterin)	Elastase (neutrophil)	Interferon Beta	Thyroglobulin
Apolipoprotein(a)	Eosinophil granule major basic protein	Interferon Gamma	Thyroid Stimulating Hormone
Aspartate aminotransferase (AST)	E-selectin, soluble	Interleukin-1 Beta	Thyrotropin-releasing hormone
Beta Thromboglobulin	Ferritin, H	Interleukin-10	Thyroxin Binding Globulin
Beta-2-microglobulin	Ferritin, L	Interleukin-12, alpha	Tissue Factor
CA 125	Fibrin fragment D-dimer	Interleukin-12, beta	Tissue inhibitor of metalloproteinases-1
CA 19-9	Fibrinogen extended gamma chain	Interleukin-13	Tissue inhibitor of metalloproteinases-2
CA 72-4	Fibrinogen, alpha	Interleukin-15	Tissue Plasminogen Activator
CA27.29/15-3 (MUC1 mucin antigens)	Fibrinogen, beta	Interleukin-16	Tissue Plasminogen Activator Inhibitor
Calreticulin	Fibrinogen, gamma	Interleukin-8	TNF-Alpha
Carboxypeptidase N, regulatory	Fibronectin	IP-10, Small inducible cytokine B10	TNF-Binding Protein 1
Carboxypeptidase N, catalytic	Fibulin-1	Isocitrate dehydrogenase	TNF-Binding Protein 2
Carcinoembryonic Antigen	Ficolin 1	Kininogen	Transcobalamin
Cathepsin D	Ficolin 2	Ksp37	Transcortin
CD5 antigen-like protein	Ficolin 3	Laminin, alpha	Transferrin
Ceruloplasmin	Follicle stimulating hormone	Laminin, beta	Transferrin (asialo-, tau-, beta-2-)
Cholinesterase Plasma	G-6-PD	Laminin, gamma	Transferrin Receptor (Soluble)
Chorionic Gonadotropin Beta (hCG)	Galactoglycoprotein (Leukosialin)	LDH (heart)	Transthyretin
Chromogranin A	Gamma-glutamyl transferase alpha	Lecithin-cholesterol acyltransferase	Triacylglycerol lipase (pancreatic)
Chromogranin B (secretogranin I)	Gc-globulin	Leucine-rich Alpha-2-glycoprotein	Troponin I (cardiac)
Coagulation Factor II (Prothrombin)	GCSF	LHRH	Troponin I, (skeletal)
Coagulation Factor IX	Gelsolin	Lipase	Troponin T (cardiac)
Coagulation Factor V	GHRH	Luteinizing hormone (LH), beta	Tryptase, beta-2
Coagulation Factor VII, H	Glutamate carboxypeptidase II	Mannose-binding Protein	Tyrosine hydroxylase
Coagulation Factor VII, L	Glutathione Peroxidase	Matrix metalloproteinase-2	Urokinase (High MW kidney type)A
Coagulation Factor VIII	Glutathione S-transferase	M-CSF	Urokinase (High MW kidney type)B
Coagulation Factor X	Glycoprotein hormones alpha chain	Melastatin	VCAM-1, soluble
Coagulation Factor XI	GM-CSF	MIP-1 alpha	Vitronectin
Coagulation Factor XII		MIP-1 beta	Von Willebrand Factor
Coagulation Factor XIII A		MSE55	Zn-Alpha-2-glycoprotein
Coagulation Factor XIII B		Myelin Basic Protein	
Collagen I c-terminal propeptide		Myoglobin	
Collagen I c-terminal telopeptide (ICTP)		N-Acetyl-B-D-Glucosaminidase, alpha	
		N-Acetyl-B-D-Glucosaminidase, beta	

Annexe 1.2 : Niveau d'inactivation du traitement « Solvant – Détergent »

Virus enveloppés		Virus enveloppés	
Nom	log réduction (log ₁₀)	Nom	log réduction (log ₁₀)
VHC	> 5,0	VIH-1	> 11,0
Virus de la stomatite vésiculeuse (modèle VHC)	> 5,1	VIH-2	> 6,0
Virus Sindbis (modèle VHC)	> 8,8	CMV	> 5,8
VHB	> 6,6	<i>Herpes simplex virus-1</i>	> 5,8
DHBV (modèle pour VHB)	> 7,3	West Nile Virus	> 5,5

Annexe 1.3 : Niveau d'inactivation du traitement de la pasteurisation

Virus enveloppés		Virus nus	
Nom	log réduction (log ₁₀)	Nom	log réduction (log ₁₀)
VIH	> 6 (> 10 min)	Virus Poliomyélitique (Sabin)	> 6,2 (< 2 h)
Virus de la pseudo-rage	> 4,2 (< 2 h)	Reovirus	3,2 (< 10 h)
Virus Sindbis	> 5,5 (< 5 h)	Bactéries/Parasites	
Virus de la vaccine	> 4,3 (< 1 h)	Stérilisation filtrante	optimal
Virus de la parainfluenza	> 6,3 (< 2 h)		

Annexe 1.4 : Niveau d'inactivation du traitement au bleu de méthylène

Virus enveloppés		Virus nus	
Nom	log réduction (log ₁₀)	Nom	log réduction (log ₁₀)
VIH	> 5,5	VHA	0
BVDV (modèle HCV)	> 6,2	Encéphalomyocardite	0
DHBV (modèle HBV)	3,9	Parovirus porcin	0
Influenza	5,1	Virus poliomyélitique	0
Pseudorabies	5,4	Simian adénovirus, type40	4,3
Herpes Simplex	> 6,5	Adénovirus	4
Vesicular Stomatitis	> 4,9	Parvovirus humain B19	> 4
West Nile virus	> 6,5	Calicivirus (modèle VHE)	> 3,9

Annexe 1.5 : Niveau d'inactivation du traitement par l'amotosalen

Virus enveloppés		Virus nus		Bactéries / Parasites / Spirochètes	
Nom	log réduction (log ₁₀)	Nom	log réduction (log ₁₀)	Nom	log réduction (log ₁₀)
DHBV (modèle pour VHB)	4,6	HAV 5	6,9	Maladie de Chagas	> 5,0
BVDV (modèle pour VHC)	≥ 6,0	Parovirus B19	1,8 – 2,8	Paludisme	≥ 6,9
VIH-1 libre	> 6,8	Staphylococcus epidermidis	> 7,3	Babesia microti	> 5,3
VIH-1 intracellulaire	> 6,4	klebsiella pneumonia	≥ 7,4	Syphilis	> 5,9
HLTV-1	≥ 4,5			Maladie de Lyme	> 10,6
HLTV-2	> 5,7	<p style="text-align: center;">UVA Illumination</p> <p style="text-align: center;">1 Amotosalen molecule (red) targets helical regions of nucleic acid</p> <p style="text-align: center;">2 Docking</p> <p style="text-align: center;">3 Permanent Crosslinking</p> <p style="text-align: center;">4 Locked DNA or RNA unable to replicate</p>			
SARS-CoV	≥ 5,5				
West Nile Virus	≥ 5,5				
Virus Chikungunya	≥ 6,8				
Virus de la Dengue	≥ 7,6				
Virus H5N1	≥ 5,7				

Chapitre 2

Le traitement d'inactivation au bleu de méthylène

Sommaire

1	Généralités	101
1.1	Le bleu de méthylène.....	101
1.1.1	Son action.....	101
1.1.2	L'inactivation virale par le bleu de méthylène	102
1.1.3	La mise en œuvre de ce traitement au sein de l'EFS Nord-de-France.....	102
1.2	La protéomique et la quantification différentielle	103
1.2.1	La notion de « shotgun proteomics »	103
1.2.2	La quantification relative appliquée au plasma.....	105
1.2.3	La quantification différentielle et ses limitations	107
1.2.4	La quantification différentielle et la détection MS.....	108
2	Etude des traitements sur standards protéiques.....	108
2.1	Standards protéiques.....	109
2.1.1	La substance P.....	109
2.1.2	L' α -lactalbumine	110
2.1.3	L'albumine sérique bovine.....	112
2.2	Photochimie et photophysique du bleu de méthylène	115
2.3	L'oxydation des protéines	116
2.4	Effet du traitement au bleu de méthylène sur les modèles	118
2.4.1	Substance P	118
2.4.2	L' α -lactalbumine	118
2.4.3	L'albumine sérique bovine.....	119
3	Approche « label-free »	121
3.1	La LC-comparative : son principe	121
3.2	Différentes étapes pour la LC-MS comparative	122
3.3	Eléments statistiques.....	124
3.3.1	Test statistique.....	125

Chapitre 2

3.3.2	Notion de la puissance d'un test.....	126
3.3.3	Analyse de variance (ANOVA)	126
3.3.4	Analyse en composante principale	128
3.3.5	Le FDR	128
3.4	Résultats.....	129
3.4.1	Protéines majoritaires	130
3.4.2	Protéines minoritaires.....	132
4	Conclusion	135

Bibliographie - Annexes

Table des figures

Figure 2.1 : Structure du bleu de méthylène	101
Figure 2.2 : Schéma du dispositif utilisé pour le procédé de viro-inactivation photochimique au bleu de méthylène.....	103
Figure 2.3 : Principe du Shotgun (d'après [11]).....	104
Figure 2.4 : La technique iCAT (www.imsb.ethz.ch).....	106
Figure 2.5 : Principe de comptage de spectres pour la quantification label-free	108
Figure 2.6 : Séquence peptidique de la substance P.....	109
Figure 2.7 : Spectre de la substance P, avant traitement	110
Figure 2.8 : Séquence de 142 acides aminés de l' α -lactalbumine. Les acides aminés en italique correspondent au propeptide.	110
Figure 2.9 : Spectre MS de l' α -lactalbumine intacte	111
Figure 2.10 : PMF de l' α -lactalbumine avant traitement (recouvrement de séquence de 53 %).	112
Figure 2.11 : Séquence de la BSA. Les acides aminés en italique correspondent au peptide signal.	113
Figure 2.12 : PMF de la BSA, avant traitement (recouvrement de séquence de 82%).....	113
Figure 2.13 : Spectre de fragmentation du peptide 469-482 de la BSA après traitement, portant une oxydation. Cependant, il n'est pas possible de la localiser précisément : elle est peut être portée soit par le résidu M1, soit par le résidu P2.	114
Figure 2.14 : Spectre de fragmentation du peptide 45-75 de la BSA après traitement. Les deux oxydations sont portées par les résidus P15 et H19. Elles correspondent respectivement à l'oxydation de la proline en acide pyro-glutamique (résidu E) et de l'histidine en asparagine (résidu N).....	115
Figure 2.15 : Mécanisme d'action d'un photosensibilisateur [32]	116
Figure 2.16 : Spectre MS de la substance P, après traitement au BM/UV-VIS. Seule la forme oxydée existe.	118
Figure 2.17 : Spectre MS/MS du peptide 114-127 de l' α -lactalbumine, portant une double oxydation sur le résidu W10.....	119
Figure 2.18 : Spectre de fragmentation du peptide 421-426 de la BSA, présentant une oxydation sur le résidu F6	120
Figure 2.19 : Représentation graphique du LC-MS issue de l'analyse d'un échantillon de plasma (fraction majoritaire), après l'étape de "peak modeling". Ici, l'axe des ordonnées correspond aux temps de rétention et l'axe des abscisses aux rapports m/z.	123

Chapitre 2

Figure 2.20 : Etape d'alignement des analyses LC-MS (ProgenesisLC-MS). En rose, le run LC-MS de référence ; en vert, le run LC-MS qui doit être aligné. Dans la figure (b), les points bleus correspondent aux vecteurs générés pour l'alignement des deux runs LC-MS.....	124
Figure 2.21 : Risque de première espèce (test bilatéral)	125
Figure 2.22 : Résultat de la PCA réalisée sur les données issues des protéines majoritaires, avant (rose) et après (bleu) traitement au BM/UV-VIS	131
Figure 2.23 : Quantification du peptide EPGVYTLPPSRDELTK oxydé de l'immunoglobuline G, avant (rose) et après (bleu) traitement au BM/UV-VIS.	131
Figure 2.24 : Résultat de la PCA réalisée sur les données issues des protéines minoritaires, avant (rose) et après (bleu) traitement au BM/UV-VIS.	132
Figure 2.25 : Bilan de la quantification des peptides oxydés (protéines minoritaires)	133
Figure 26 : Déamidation sur la chaîne alpha du fibrinogène dont l'expression est amplifiée après le traitement au BM/UV-VIS.....	134
Figure 2.27 : Spectre de MS/MS correspondant au peptide MELERPGGNEITR déamidé de la chaîne alpha du fibrinogène, après traitement.....	134

Table des annexes

Annexe 2.1 : Spectre MS/MS de la substance P oxydée (MALDI-TOF/TOF).	142
Annexe 2.2 : Spectre MS/MS du peptide 128-142 de l' α -lactalbumine avant traitement (MALDI-TOF/TOF).....	142
Annexe 2.3 : Spectre MS/MS du peptide 35-44 de la BSA, après traitement (FT-ICR MS). Les oxydations sont portées par les résidus F9 et K10.	143
Annexe 2.4 : Spectre MS/MS du peptide 233-241 oxydé de la BSA, après traitement (FT-ICR MS). La double oxydation est portée par les résidus W5.....	143
Annexe 2.5 : Les principaux logiciels développés pour l'alignement des analyses LC-MS (extrait de [26]).....	144
Annexe 2.6 : Spectre MS/MS correspondant au peptide EPQVYTLPPSRDELTK appartenant à l'immunoglobuline G (chaîne lourde), après traitement.	145
Annexe 2.7 : Spectre de MS/MS correspondant au peptide ANKSSKLVSANR oxydé de l'anti-thrombine III, après traitement.	145
Annexe 2.8 : Spectre de MS/MS correspondant au peptide LLLQQVSLPELPGEYSMK oxydé de l'alpha-2-macroglobuline, après traitement.....	146

Chapitre 2

Annexe 2.9 : Spectre de MS/MS correspondant au peptide FSGYCPTTCGIADFLSTYQTK oxydé de la chaîne gamma du fibrinogène, après traitement.	146
Annexe 2.10 : Spectre de MS/MS correspondant au peptide ILLQGTPVAQMTEDAVDEAR oxydé du complément C3, après traitement.	147
Annexe 2.11 : Spectre de MS/Ms correspondant au peptide SGFPQVSMFFTHTFPK oxydé de la glycoprotéine riche en histidine, après traitement.	147

Chapitre 2

Le traitement d'inactivation au bleu de méthylène

Le plasma humain à visée thérapeutique doit pouvoir conserver les activités des facteurs de coagulation et autres inhibiteurs pour être cliniquement efficace. Malgré un dépistage renforcé sur les dons de sang, le risque résiduel de transmission d'un agent pathogène par transfusion existe. C'est au nom de ce risque que se sont développés les traitements d'inactivation des pathogènes appliqués aux PSL visant à garantir la sûreté des plasmas destinés à la transfusion.

Actuellement en Europe, il existe différentes méthodes reconnues pour sécuriser le plasma. Historiquement « la quarantaine », c'est-à-dire le stockage du plasma jusqu'à la réalisation des tests sur le prélèvement sécurisé du donneur, a été largement utilisée. Par la suite, le traitement physico-chimique de pools de plasma par Solvant/Détergent a fait son apparition. Cependant depuis quelques années, plusieurs méthodes de traitement du plasma unitaire basées sur l'activation d'une molécule photosensible par une énergie lumineuse sont disponibles. C'est le cas de la technique de viro-inactivation par le BM/UV-VIS. L'un des principaux avantages de ce traitement est qu'il s'effectue directement sur des poches individuelles, après collecte. De plus, il obéit à une mise en œuvre standardisée selon les bonnes pratiques de préparations. Il est utilisé dans plusieurs pays européens, comme l'Allemagne, le Danemark et l'Espagne.

Ce traitement de viro-atténuation est le plus utilisé en France. Au cours de l'année 2010, plus de 246 000 poches de plasmas traitées au bleu de méthylène ont été cédées à des

Chapitre 2

Etablissements de Soins, soit près de 65% du nombre total de poches cédées. Huit EFS sont producteurs de plasma traité par ce procédé photochimique, dont l'EFS Nord-de-France.

Les travaux dans ce chapitre ont pour but d'évaluer l'impact du traitement photochimique au bleu de méthylène sur les protéines plasmatiques. En effet, ce traitement est déjà connu pour altérer les activités de certaines protéines, mais sans expliquer l'origine de ces altérations. La stratégie analytique de cette approche globale mise en place consiste en trois grandes étapes :

- l'identification de modifications caractéristiques induites par le traitement au bleu de méthylène à partir de standards protéiques
- la comparaison des protéines plasmatiques avant et après exposition au bleu de méthylène
- la quantification différentielle par une approche « label-free » des protéines altérées par ce traitement.

Dans une première partie, les caractéristiques du traitement au bleu de méthylène seront détaillées, ainsi que sa mise en œuvre au sein de l'EFS Nord-de-France. On abordera la notion de protéomique quantitative différentielle appliquée au plasma, ainsi que les différentes stratégies qui peuvent être mises en œuvre. Dans une deuxième partie, on posera les bases de l'étude du bleu de méthylène à travers une étude de standards protéiques exposés au bleu de méthylène dans les mêmes conditions que celles employées pour l'inactivation des plasmas par l'EFS Nord-de-France. Cela aura pour but d'identifier les modifications induites par le traitement au bleu de méthylène. L'identification reposera sur des analyses MALDI-TOF/TOF et nanoLC-nanoESI-FT-ICR MS. Enfin, pour finaliser cette étude, on proposera une approche innovante de protéomique quantitative « label-free » sur des échantillons de plasma avant et après traitement au bleu de méthylène. Cette approche utilisera la spectrométrie de masse haute résolution en s'appuyant sur des analyses nanoLC-nanoESI-FT-ICR-MS.

1 Généralités

1.1 Le bleu de méthylène

1.1.1 Son action

Le bleu de méthylène (ou chlorure de méthylthioninium, noté BM) appartient à la famille des phénothiazines. Sa structure est représentée dans la figure 2.1. Sa couleur est due à une forte absorption dans la région de 550-700 nm. Son spectre d'absorption est concentration-dépendant : la dimérisation possède en effet une constante d'équilibre dans l'eau non-négligeable, de l'ordre de $3,8 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ [1]. Cette dimérisation augmente avec la force ionique de la solution. Les monomères et les dimères du bleu de méthylène ont des spectres d'absorbances distincts. Le maximum est observé à 664 nm pour les monomères, tandis qu'il est de 590 nm pour les dimères.

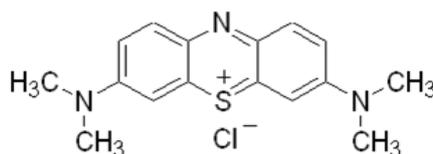


Figure 2.1: Structure du bleu de méthylène

Le BM est largement connu comme colorant [2]. Il trouve une multitude d'applications, et ce dans des domaines très variés. Il peut être utilisé comme indicateur rédox (forme oxydée : bleue ; forme réduite : incolore), comme colorant histologique où il teint le collagène des tissus. En médecine, il sert comme marqueur afin de tester la perméabilité d'une structure ou préciser le trajet d'une fistule. Il est, par ailleurs, utilisé pour ses propriétés anti-septiques et anti-microbiennes en pharmacologie et en microbiologie. Il sert également pour traiter la méthémoglobinémie (capacité réduite du sang à transporter l'oxygène) grâce à sa propriété d'agent réducteur. Enfin, plus récemment, il est utilisé en thérapie photo-dynamique destinée par exemple à soigner certains types de cancers [3].

De par leur structure chimique, les phénothiazines sont des molécules photosensibles. Un agent photo-sensibilisateur absorbe l'énergie directement depuis une source lumineuse. Il peut ensuite la transférer à une molécule d'oxygène pour former une forme activée d'oxygène, appelée oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Cette forme moléculaire de l'oxygène est extrêmement électrophile, et peut oxyder directement des doubles liaisons, riches en électrons, présentes dans les biomolécules. C'est la clé de voûte des traitements de thérapie photo-dynamique [4]. De plus, un agent photo-sensibilisateur peut être également impliqué

dans des réactions de transfert d'électrons initiant ainsi des espèces radicalaires. Ces dernières peuvent induire des dommages sur des biomolécules [5]. La partie 2.2 reviendra plus en détails sur les mécanismes mis en jeu.

1.1.2 L'inactivation virale par le bleu de méthylène

Ce procédé est particulièrement efficace contre les virus enveloppés. En effet, l'enveloppe lipidique des virus possède une haute affinité pour le BM qui est, dès lors, localement concentré et rend ces virus très sensibles à l'inactivation. En effet, le BM est une phénothiazine qui présente une affinité pour les acides nucléiques. Le BM se fixe sur la base azotée guanine (paire guanine-cytosine) en s'intercalant dans la double-hélice de l'ADN. La réplication et la transcription de l'ADN et/ou de l'ARN viral sont ainsi inhibées.

Il est particulièrement efficace contre les virus comme le HIV et les virus des hépatites B et C (HBV, HCV). Néanmoins, certains virus non-enveloppés montrent également une bonne sensibilité, principalement le parvovirus B19 qui peut provoquer des complications graves chez la femme enceinte et le nouveau-né. Des essais employant la technique de PCR (« *polymerase chain reaction* ») montrent l'élimination directe de HIV, HBV, HCV et du parvovirus B19 d'unités infectées, après traitement au BM/UV-VIS. Il semblerait également que le BM activé par la lumière prévienne la transmission de la maladie de Chagas provoquée par le Trypanosome *Cruzi* [6].

1.1.3 La mise en œuvre de ce traitement au sein de l'EFS Nord-de-France

Le traitement du plasma par le BM/UV-VIS est un traitement standardisé. Développé par la société MacoPharma, le système Theraflex à usage unique est actuellement employé par l'EFS Nord-de-France (figure 2.2) Il comprend un filtre sur lequel est déleucocyté le plasma et à la sortie duquel il se charge de BM au contact d'une pastille de BM. Sa concentration moyenne finale est de 1 μM (0,84 - 1,13 μM). La poche de plasma est ensuite illuminée pendant 20 min à 20°C à une longueur d'onde de 560 nm (énergie totale émise : 180 J/cm²). Le plasma ainsi inactivé passe à nouveau sur un filtre visant à retenir le bleu de méthylène résiduel et ses résidus photochimiques (Azurs A, B et C). La poche de plasma obtenue est ensuite surgelée à -30°C en moins d'une heure, et peut être conservée pendant 365 jours à cette température. Au-delà de cette période, les poches non-utilisées sont détruites.

Le volume final des plasmas viro-inactivés par cette méthode est compris entre 200 et 300 mL.

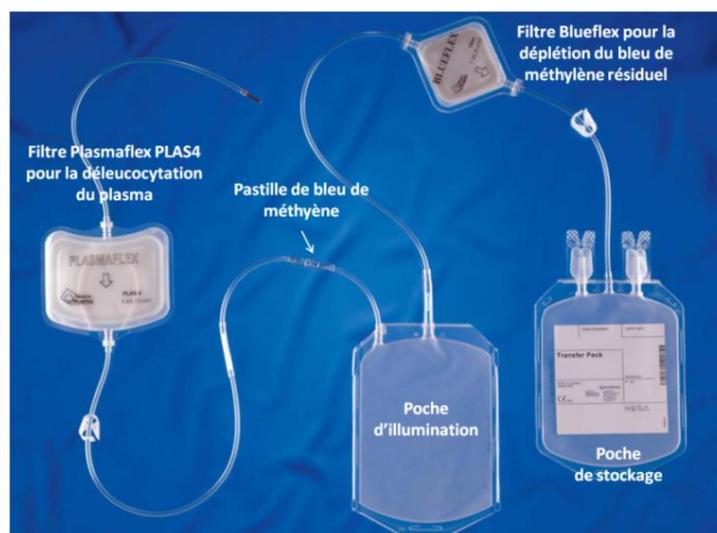


Figure 2.2 : Schéma du dispositif utilisé pour le procédé de viro-inactivation photochimique au bleu de méthylène

1.2 La protéomique et la quantification différentielle

1.2.1 La notion de « shotgun proteomics »

La protéomique vise à analyser en une seule expérience un protéome complet d'une cellule type, d'un tissu ou encore d'un fluide biologique comme le plasma. Ces études identifient et quantifient les protéines de ces différents protéomes. Elles peuvent également s'avérer cruciales d'un point de vue biologique et biomédical, notamment dans la découverte de biomarqueurs. Actuellement, cela est le plus souvent accompli par une approche appelée « shotgun » (ou criblage) [7]. Il existe plusieurs mises en application de ce type d'approche, la figure 2.3 en donne un exemple. Néanmoins, toutes utilisent une digestion en solution des échantillons étudiés avec des protéases spécifiques (typiquement la trypsine) [8] ; les peptides résultants sont ensuite analysés par MS/MS avec une étape préalable de séparation, le plus souvent par chromatographie liquide. Enfin, les données MS/MS sont ensuite collectées et attribuées aux séquences peptidiques par une succession d'outils bio-informatiques pour identifier les protéines contenues initialement dans l'échantillon [9, 10].

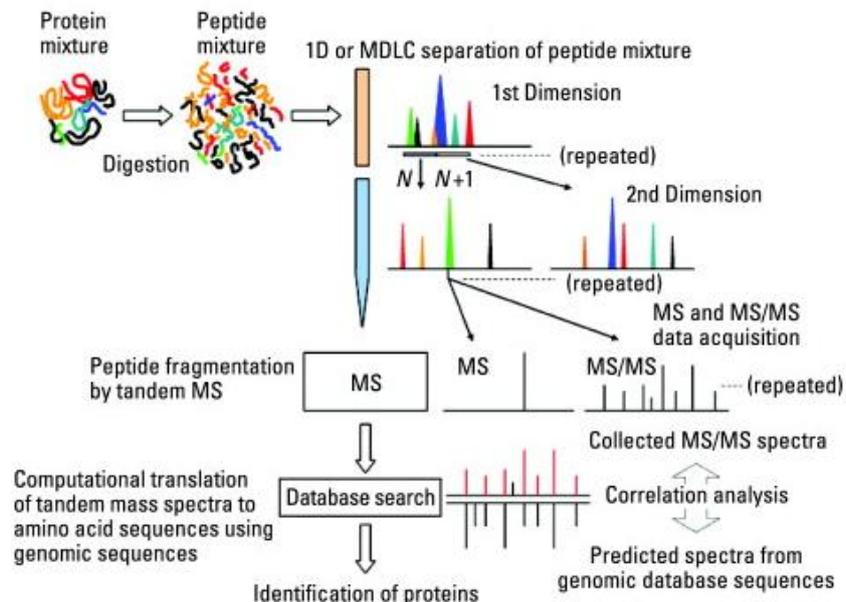


Figure 2.3 : Principe du Shotgun (d'après [11])

L'approche « shotgun » repose sur l'hypothèse que chaque protéine présente dans un échantillon génère de façon reproductible un nombre réduit de peptides, dont les extrémités sont conformes avec les spécificités de protéases utilisées. Par exemple, la trypsine coupe au niveau des C-terminaux des résidus Arg et Lys ; selon l'occurrence de ces deux acides aminés, une moyenne de 10 peptides est attendue pour une séquence d'une centaine de résidus. La validation de cette hypothèse est indispensable pour plusieurs raisons. Premièrement, le nombre de peptides présents dans un digest protéique détermine le nombre de cycles MS/MS minimal pour analyser complètement un échantillon. Puisque la durée de cycle (ou « duty cycle ») MS-MS/MS est intrinsèque à l'instrument (inférieure à 1 Hz pour les appareils modernes), le nombre de peptides à analyser détermine en partie la durée minimale de l'expérience. Notre ApexQe possède un duty cycle de 0,5 Hz, soit une durée de cycle de 2 s. Toutefois, pour l'analyse protéomique, un compromis entre l'accumulation d'ions et la durée de cycle doit être fait. Ainsi, la durée d'un cycle est d'environ 3 s pour la MS et la MS/MS, soit une durée d'environ 6 s pour un cycle complet. Deuxièmement, la complexité de l'échantillon dicte la gamme dynamique pratique de l'analyse protéomique à effectuer. La gamme dynamique nominale d'un spectromètre de masse (3-4 ordres de magnitudes pour les plus performants) peut être en pratique significativement diminuée par le mode d'acquisition « DDA » (*Dependant Data Acquisition*), qui repose sur une sélection automatique des précurseurs avec des signaux MS intenses. Ce mode n'est toutefois pas adapté à des échantillons de complexité importante, comme le plasma. Ainsi, le mode IDA (*Independant Data Acquisition*) est utilisé pour pallier cet inconvénient. En effet, en IDA, les précurseurs

sont sélectionnés « à la volée », évitant ainsi de fragmenter uniquement les ions de hautes intensités. Pour nos analyses FT-ICR MS, le mode « AutoExclusion » a été utilisé ; il s'agit d'une variante de l'IDA. L'ion le plus intense est fragmenté une fois, puis sera exclu de la fragmentation pendant un délai de 10 minutes, période au cours de laquelle d'autres ions pourront être fragmentés. C'est pourquoi avant d'effectuer des analyses sur des échantillons, une étape de déplétion des protéines les plus abondantes précède la digestion en solution. Troisièmement, les interrogations des banques de données sont le plus souvent limitées à une seule enzyme dans les paramètres de recherches afin d'optimiser le temps d'interrogation. Des clivages non-spécifiques entraînent de fait une mauvaise attribution voire la non-identification de protéines.

1.2.2 La quantification relative appliquée au plasma

1.2.2.1 Approche électrophorétique

La coloration des gels d'électrophorèse, notamment celle par fluorescence, offre des possibilités de détection linéaire sur quelques ordres de grandeurs [12]. Toutefois, il demeure difficile d'effectuer une analyse différentielle à partir de gels 2D. En effet, cette technique pose des problèmes de reproductibilité (polymérisation, migration). Il est, cependant, possible de contourner ce type de problème en ayant recours à la technique 2D-DIGE. Cette dernière repose sur le marquage respectif des échantillons à comparer par des cyanines (Cy2, Cy3, Cy5) aux propriétés fluorescentes différentes. Une fois les échantillons protéiques marqués, ils sont séparés sur le même gel suivant les conditions d'électrophorèse 2D conventionnelles. Après migration, les gels sont scannés et les images acquises aux différentes longueurs d'onde superposées puis comparées quantitativement à l'aide de logiciels adaptés (SameSpot ; DeCyder, MELANIE, Delta2D, Dymension etc) [13]. L'étude comparative aboutit à la mise en évidence de protéines qui diffèrent ou qui sont identiques dans les deux échantillons. Il existe deux approches de marquage utilisant des cyanines distinctes dont le choix est dicté principalement par la quantité d'échantillon disponible : (i) le marquage minimal [14], basé sur la chimie des esters de N-hydroxysuccinimide (NHS), ce mode de marquage de faible stœchiométrie cible l'amine en epsilon de la chaîne latérale de la lysine par l'intermédiaire d'une liaison amide, et (ii) le marquage par saturation [15] basé sur la chimie des dérivés de maléimides qui cible exclusivement toutes les cystéines présentes dans l'échantillon, via une liaison thioéther sur les groupements thiols des cystéines.

1.2.2.2 Approche en solution

Il est également possible d'introduire des isotopes stables pour marquer indépendamment des sources de protéines à comparer. Ces éléments ainsi marqués ont les mêmes propriétés physicochimiques, mais ne peuvent être uniquement distingués par analyse MS sur la base de la différence de masse induite par les isotopes stables. Plusieurs démarches existent. On présente ici les trois plus fréquentes.

La technique Isotopic Coded-Affinity Tags (ICAT) [16] consiste à marquer les groupements thiols des cystéines par des réactifs marqués (figure 2.4). Brièvement, les réactifs employés sont des petites molécules composées de trois éléments : un groupement iodoacétamide pour former une liaison covalente avec le groupement sulfhydryle des résidus cystéines réduits, un « linker » comportant les isotopes stables et un marqueur biotine pour isoler les fragments peptidiques par LC d'affinité (colonne d'avidine). Historiquement, le marquage était effectué sur le linker à 8 atomes soit de deutérium (« lourd »), soit d'hydrogène (« léger »). Une génération plus récente de réactifs utilise un linker comportant le couple $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ qui co-élue mieux en LC. De plus, il contient un site clivable en milieu acide qui permet d'éliminer le marquage biotine avant l'analyse MS.

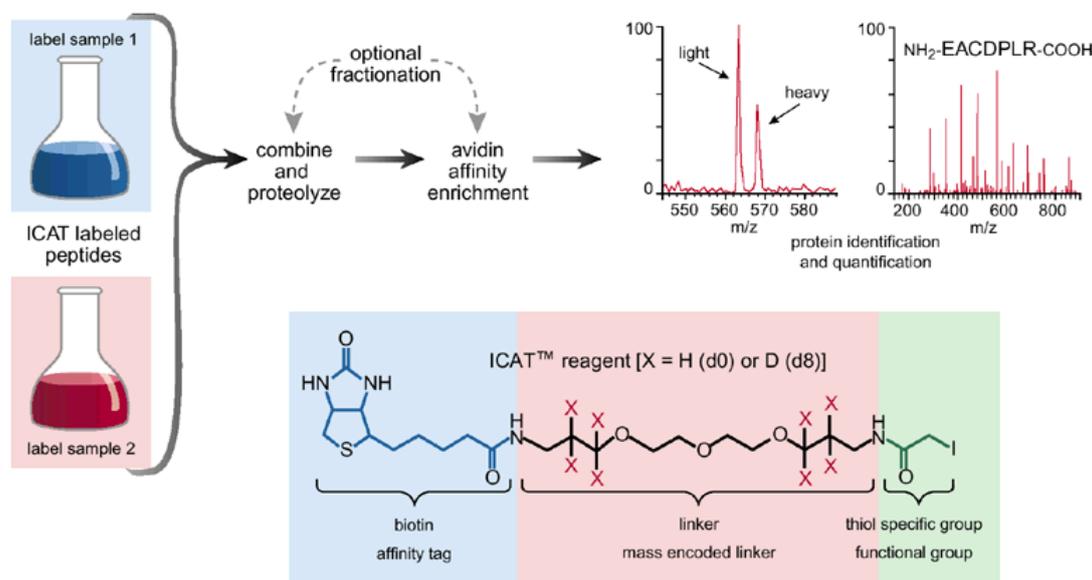


Figure 2.4 : La technique iCAT (www.imsb.ethz.ch)

Plus récemment, des variantes de l'ICAT ont été développées. La technique iTRAQ (*Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*) [17, 18] est la plus connue. Elle repose sur le marquage avec les amines primaires de l'extrémité amino-terminale ou de la chaîne latérale des résidus lysines. Les réactifs iTRAQ sont constitués de trois éléments : un

groupement « reporter » qui diffère entre quatre formes du réactif utilisé par sa masse ($m = 114, 115, 116, 117$), un groupement « balance » ($m = 28, 29, 30, 31$) qui sert de contre-poids afin que les peptides marqués par les réactifs iTRAQ soient isobares, et un groupement fonctionnel réactif (NHS ester) qui forme une liaison covalente entre le peptide et le réactif. Lors de l'analyse MS, les peptides marqués sont détectés avec la masse intrinsèque de 145 Da provenant du réactif iTRAQ. Ce n'est qu'en MS/MS que l'on apprécie la contribution de chacun des quatre peptides à partir des « reporters ».

La méthode ICPL (*Isotope-Coded Protein Label*) [19, 20] est une alternative à l'iTRAQ ; elle utilise le marquage de protéines intactes au niveau de leur groupement amine libre par un agent marqué par des isotopes stables ($^{16}\text{C}_4, ^{13}\text{C}_6, ^1\text{H}_4, ^2\text{D}_4$). La quantification s'effectue sur la mesure des intensités relatives des courants ioniques extraits (XIC) des précurseurs.

1.2.3 La quantification différentielle et ses limitations

Les méthodes précédemment décrites nécessitent une détection MS/MS pour la quantification. Cependant, la détection n'est pas toujours représentative du mélange peptidique injecté, surtout dans le cas de mélanges peptidiques complexes. Une étape de sélection des peptides pour la fragmentation, un par un, tandis qu'ils sont élués sur une colonne de chromatographie liquide (LC), permet à un maximum de peptides d'être sélectionnés pour être fragmentés. Selon la vitesse d'acquisition du spectromètre de masse utilisé, il est possible d'effectuer entre une et cinq fragmentations par seconde. Selon la nature du protéome, un digest peut contenir plusieurs centaines de milliers de peptides. C'est pourquoi la notion de capacité de détection est essentielle, ainsi que l'association d'une étape de LC en amont lors de l'analyse d'un mélange complexe, comme un digest de plasma. De plus, cette capacité de détection peut être renforcée en pratiquant un fractionnement de l'échantillon (précipitation, purification, déplétion). En revanche, la détection MS/MS se traduit souvent par une sous-représentation, lors de l'analyse, d'un mélange peptidique complexe [21]. Ce constat a permis de montrer que 80 à 98% de protéines de fortes abondances pouvaient être détectées par ce mode d'acquisition après un triplicat d'analyses 2D LC-LC-MS/MS ; tandis que seulement 10 à 25% de protéines de plus faibles abondances pouvaient l'être. Malheureusement, c'est souvent cette catégorie de protéines qui est étudiée. Il est également possible de souligner que la fréquence de sélection MS/MS peut être utilisée comme mesure quantitative pour une abondance peptidique relative. Cette approche pose

ainsi les bases d'une quantification sans marquage, dite « label-free », qui s'appuie donc sur le recensement (ou comptage) de spectres pour une protéine donnée (« *spectral counting* », figure 2.5) [21-25].

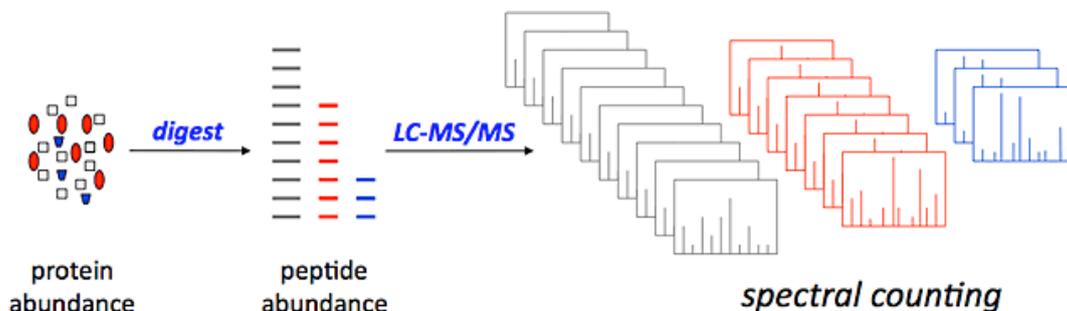


Figure 2.5 : Principe de comptage de spectres pour la quantification label-free

1.2.4 La quantification différentielle et la détection MS

Les approches de quantification qui reposent sur la détection MS (par opposition à la détection MS/MS) ne sont pas soumises à cette sélection de peptides, puisque la résolution de l'analyse MS est en réalité élevée. Des centaines de masses différentes peuvent être détectées au cours d'un seul scan MS. Ce nombre peut être considérablement augmenté si l'on envisage une analyse LC-MS. A partir de là, des approches de quantification LC-MS qui permettent d'établir l'abondance relative de peptides sont possibles, en comparant l'intensité de pics à partir de plusieurs analyses incluant une détection en MS continue [26].

Une étude a été menée pour comparer les résultats obtenus à partir de la méthode de comptage de spectres et celle qui s'appuie sur l'intensité des pics MS pour la quantification protéique [23]. Elle a démontré que la mesure des intensités de pics MS permet une estimation plus précise des ratios protéiques.

La partie 3 de ce chapitre reviendra plus en détails sur le principe et le déroulement d'une étude de quantification « label-free » à partir du traitement des données LC-MS.

2 Etude des traitements sur standards protéiques

Afin de cerner les modifications potentiellement induites par le traitement photochimique au BM, des protéines modèles ont été étudiées. Dans le but d'accroître progressivement la complexité de l'échantillon, l'analyse débutera à partir d'un peptide, la substance P, puis sur deux protéines, l' α -lactalbumine et l'albumine sérique bovine. Avant d'étudier ces modifications, il est indispensable de réaliser en premier lieu les analyses des

peptides et des protéines modèles avant leur traitement au BM/UV-VIS. Les conditions d'exposition au BM/UV-VIS sont rigoureusement celles utilisées dans le cadre d'inactivation des unités de plasma frais. L'exposition des standards protéiques est réalisée au sein même de l'unité de production de l'EFS Nord-de-France. Enfin, les analyses ont été conjointement effectuées sur les spectromètres de masse MALDI-TOF/TOF (4800, Applied Biosystems) et/ou nanoESI-FTICR (ApexQe 9.4T, BrukerDaltonics), ce dernier étant couplé à une chaîne de nano-chromatographie liquide (Dionex).

2.1 Standards protéiques

Les solutions standards ont été préparées à 1 mg/mL dans du sérum physiologique pH 7 (NaCl 0,9%) pour reproduire les effets de matrice induits par le plasma. Par ailleurs, avant les analyses MS et MS/MS, les échantillons sont dessalés sur un dispositif de type ZipTip® (Millipore) afin d'optimiser l'ionisation de l'échantillon pour l'analyse en spectrométrie de masse.

2.1.1 La substance P

La substance P est un peptide de 11 acides aminés appartenant à la famille des tachykinines caractérisée par leur site actif situé en C-terminal. La substance P a été découverte et décrite dans les années 1970 par Leeman et Chang [27, 28]. Elle est considérée comme le principal neurotransmetteur de la douleur. La substance P a été choisie comme modèle peptidique car elle contient les principaux acides d'intérêt à savoir l'arginine et la lysine pour leur fonction amine et la méthionine reconnue comme site d'oxydation (figure 2.6).

RPKPQQFFGLM

Figure 2.6 : Séquence peptidique de la substance P

Le spectre de masse MALDI-TOF/TOF de la substance P montre deux pics majoritaires aux rapports m/z 1347,74 et 1363,74 correspondant respectivement aux formes native et oxydée du peptide (figure 2.7). La fragmentation de l'ion moléculaire $[MH]^+$ a été réalisée en utilisant l'air dans la cellule de collision. De plus, le spectre de fragmentation de la substance P oxydée précise la localisation de l'oxydation sur la méthionine. Le pic observé à m/z 1299,77 correspond à l'ion $[MH-SO]^+$, caractéristique de l'oxydation de ce résidu (Annexe 2.1).

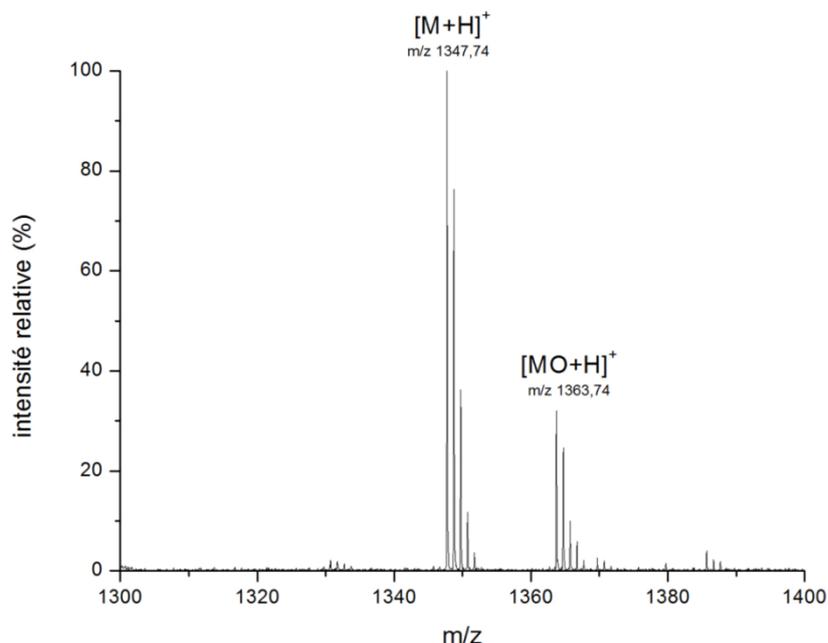


Figure 2.7 : Spectre de la substance P, avant traitement

2.1.2 L' α -lactalbumine

L' α -lactalbumine (α LA, P00711) est une petite glycoprotéine globulaire synthétisée au niveau de la glande mammaire. L' α LA bovine est constituée de 142 acides aminés (14 kDa) dont les dix-neufs premiers correspondent au peptide signal [30, 31] (figure 2.8). L' α LA est impliquée dans la synthèse de la lactose synthase, enzyme qui catalyse l'étape finale de la synthèse du lactose au niveau de la glande mammaire. Elle possède un site spécifique à la fixation du calcium (II), entre les acides aminés 79 et 88, lui assurant une grande stabilité de structure. Ainsi, dans la suite de notre étude, la protéine ne sera considérée qu'à partir de l'acide aminé 20. Enfin, l' α LA possède 8 cystéines entraînant la formation de quatre ponts disulfures entre les cystéines 25-139, 80-96, 92-110 et 37-130. Cette protéine a été choisie comme modèle car elle peut être obtenue commercialement pure.

*MMSFVSLLV*¹⁰ *GILFHATQ*AEE²⁰ QLTKEVFRE³⁰ LKDLKGYGGV⁴⁰ SLPEWVCTTF⁵⁰
 HTSGYDTQAI⁶⁰ VQNNDSTEYG⁷⁰ LQINNKIWC⁸⁰ KDDQNPSSN⁹⁰ ICNISCDKFL¹⁰⁰
 DDDLTDIMC¹¹⁰ VKKILDKVGI¹²⁰ NYWLAHKALC¹³⁰ SEKLDQWLCE¹⁴⁰ KL

Figure 2.8 : Séquence de 142 acides aminés de l' α -lactalbumine. Les acides aminés en italique correspondent au propeptide.

L'analyse en protéine entière de l' α LA a été réalisée par MALDI-TOF/TOF en utilisant le mode linéaire positif. Toutefois, l'analyse en mode linéaire est une technique peu résolutive et peu précise. Ainsi, le signal d'une protéine se présente sous la forme d'un massif isotopique avec une faible résolution (figure 2.9). La détermination de la masse moléculaire

est alors approximative. Aussi, il est évident que l'identification de modifications induites n'est pas adaptée par cette méthode.

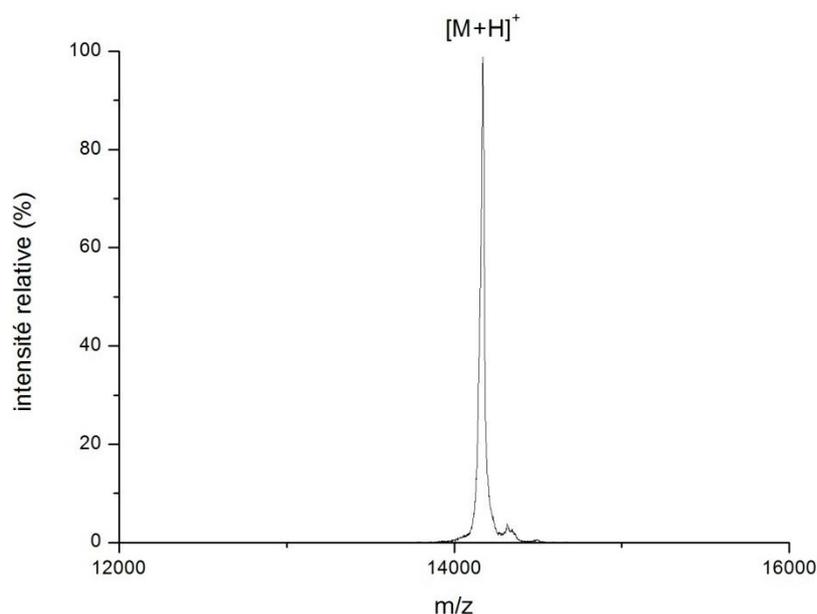


Figure 2.9 : Spectre MS de l' α -lactalbumine intacte

C'est pourquoi l'approche par PMF est préférée. Après avoir été dénaturée en présence de TFE, la protéine est réduite par du DTT entraînant la rupture des ponts disulfures, puis alkylée par de l'iodoacétamide pour empêcher leur re-formation. Elle est enfin digérée par la trypsine, enzyme qui clive spécifiquement du côté C-terminal des résidus Lys et Arg. Il est intéressant de préciser que les recouvrements de séquence pour cette protéine ne peuvent dépasser 65%. En effet, le peptide 36-77 de m/z 4654,14 (ou 4711,17 sous sa forme carbamidométhylée) n'apparaît pas sur le spectre de masse, sa masse élevée ne favorisant pas son ionisation. Le digest de α LA est analysé par MALDI-TOF/TOF MS, dont le spectre MS est présenté dans la figure 2.10. Malgré les modifications suggérées par l'interrogation de banques de données, aucune d'entre elles n'a pu être confirmée, car les ions de ces peptides n'étaient pas suffisamment intenses pour être fragmentés correctement.

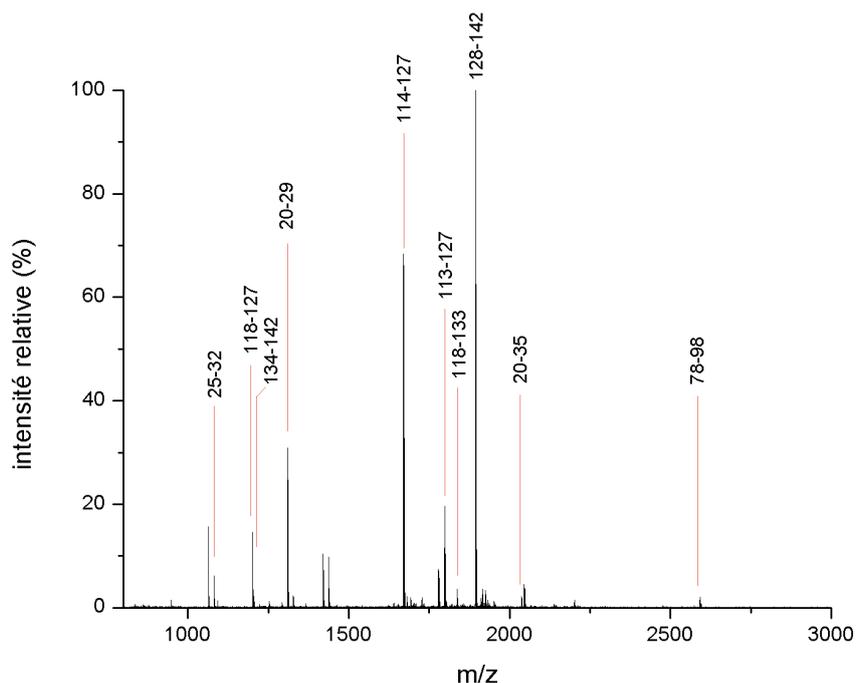


Figure 2.10 : PMF de l'a-lactalbumine avant traitement (recouvrement de séquence de 53 %).

2.1.3 L'albumine sérique bovine

L'albumine sérique bovine (BSA, P02769) est la protéine principale du plasma composée de 607 acides aminés (figure 2.11), synthétisée dans le foie. Sa fonction principale est de réguler la pression osmotique colloïdale du sang. Une de ses fonctions est d'assurer le transport des composés essentiels dans le plasma. En effet, la BSA possède une grande affinité pour l'eau, les ions (Ca^{2+} , Na^+ , K^+), les acides gras, les hormones ou encore la bilirubine. Elle est également le transporteur principal du zinc, en fixant plus de 80% du zinc plasmatique. Par ailleurs, la BSA possède 17 ponts disulfures et plusieurs sites de phosphorylation. Cette protéine a été choisie pour sa masse plus élevée (66 kDa) que l' α LA pour complexifier la composition du digest à analyser et valider les conclusions obtenues à partir des deux autres standards.

*MKWVTFISLL*¹⁰ *LLFSSAYSRG*²⁰ *VFRRDTHKSE*³⁰ *IAHRFKDLGE*⁴⁰ *EHFKGLVLIA*⁵⁰
*FSQYLQQCPF*⁶⁰ *DEHVKLVNEL*⁷⁰ *TEFAKTCVAD*⁸⁰ *ESHAGCEKSL*⁹⁰ *HTLFGDELCK*¹⁰⁰
*VASLRETYGD*¹¹⁰ *MADCCEKQEP*¹²⁰ *ERNECFLSHK*¹³⁰ *DDSPDLPKLK*¹⁴⁰ *PDPNTLCDEF*¹⁵⁰
*KADEKKFWGK*¹⁶⁰ *YLYEIARRHP*¹⁷⁰ *YFYAPELLYY*¹⁸⁰ *ANKYNGVFQE*¹⁹⁰ *CCQAEDKGAC*²⁰⁰
*LLPKIETMRE*²¹⁰ *KVLASSARQR*²²⁰ *LRCASIQKFG*²³⁰ *ERALKAWSVA*²⁴⁰ *RLSQKFPKAE*²⁵⁰
*FVEVTKLVTD*²⁶⁰ *LTKVHKECCH*²⁷⁰ *GDLLECADDR*²⁸⁰ *ADLAKYICDN*²⁹⁰ *QDTISSKLKE*³⁰⁰
*CCDKPLLEKS*³¹⁰ *HCIAEVEKDA*³²⁰ *IPENLPPLTA*³³⁰ *DFAEDKDVCK*³⁴⁰ *NYQEAKDAFL*³⁵⁰
*GSFLYEYSRR*³⁶⁰ *HPEYAVSVLL*³⁷⁰ *RLAKEYEATL*³⁸⁰ *EECCAADDPH*³⁹⁰ *ACYSTVFDKL*⁴⁰⁰
*KHLVDEPQNL*⁴¹⁰ *IKQNCDQFEK*⁴²⁰ *LGEYGFQNAL*⁴³⁰ *IVRYTRKVPQ*⁴⁴⁰ *VSTPTLVEVS*⁴⁵⁰
*RSLGKVGTRC*⁴⁶⁰ *CTKPESERMP*⁴⁷⁰ *CTEDYLSLIL*⁴⁸⁰ *NRLCVLHEKT*⁴⁹⁰ *PVSEKVTKCC*⁵⁰⁰
*TESLVNRRPC*⁵¹⁰ *FSALTPDETY*⁵²⁰ *VPKAFDEKLF*⁵³⁰ *TFHADICTLP*⁵⁴⁰ *DTEKQIKKQT*⁵⁵⁰
*ALVELLKHKP*⁵⁶⁰ *KATEEQLKTV*⁵⁷⁰ *MENFVAFVDK*⁵⁸⁰ *CCAADDKEAC*⁵⁹⁰ *FAVEGPKLVV*⁶⁰⁰
 STQTALA

Figure 2.11 : Séquence de la BSA. Les acides aminés en italique correspondent au peptide signal.

Dans le cadre de notre étude, et étant donnée la taille de la BSA, il n'est pas intéressant d'effectuer une mesure de masse à partir de la protéine intacte. De ce fait, après digestion trypsique et analyse MALDI-TOF/TOF, la PMF de la BSA, présentée dans la figure 2.12, permet d'obtenir un recouvrement de séquence de 82% (séquence excluant le peptide signal 1-25). L'interrogation des banques de données suggère la présence de peptides portant une oxydation. Toutefois, la faible intensité des ions correspondants ne permet pas de les fragmenter. Ainsi, à ce niveau, leur caractérisation n'est pas possible.

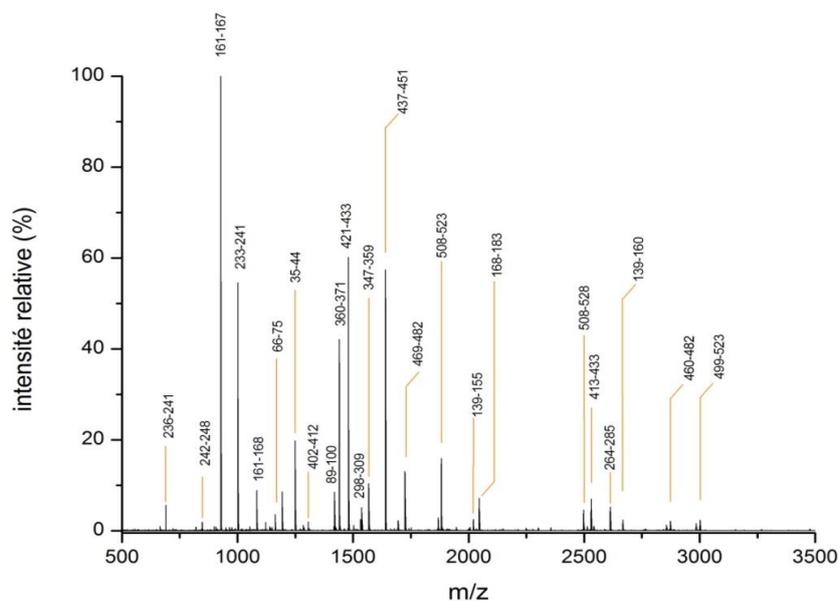


Figure 2.12 : PMF de la BSA, avant traitement (recouvrement de séquence de 82%)

Pour tenter de les identifier, cette analyse a également été complétée par une seconde analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FTICR, plus sensible. Le taux de recouvrement est, à présent, de 86%. Plusieurs types d'oxydations sont observés. Tout d'abord, le peptide MPCTEDYLSLILNR (469-482) porte une oxydation. Cette modification correspond à l'addition d'un atome d'oxygène. Le spectre de fragmentation de l'ion m/z 580,9494 (état de charge $z = 3$) permet de la mettre en évidence, en observant un décalage de masse sur les ions b_6^+ à b_{10}^+ par rapport à la fragmentation théorique de cet ion portant seulement une carbamidométhylation. Les deux sites possibles potentiels (proline et méthionine) sont côte-à-côte et en début de séquence (figure 2.13). Toutefois, les ions permettant de situer cette modification ne sont pas détectés. L'indétermination ne peut donc être levée.

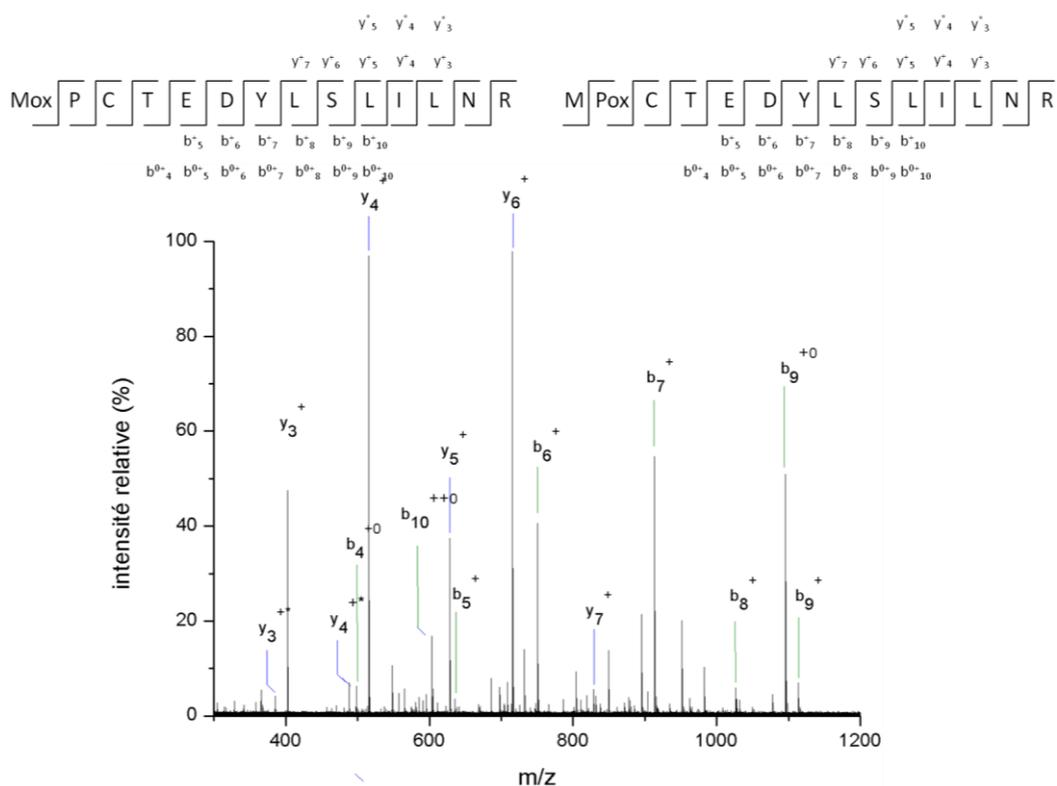


Figure 2.13 : Spectre de fragmentation du peptide 469-482 de la BSA après traitement, portant une oxydation. Cependant, il n'est pas possible de la localiser précisément : elle est peut être portée soit par le résidu M1, soit par le résidu P2.

Par ailleurs, le peptide GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVNELTEFAK (45-75) possède deux oxydations. Le spectre de fragmentation de l'ion de m/z 908,24 (état de charge $z = 3$) est représenté dans la figure 2.14. A partir des ions fragments détectés, il est possible de localiser ces oxydations. Elles sont ainsi portées par la proline P15 et par l'histidine H19. Ces modifications résultent de l'oxydation respective de la proline en acide pyro-glutamique (résidu E) et de l'histidine en asparagine (résidu N).

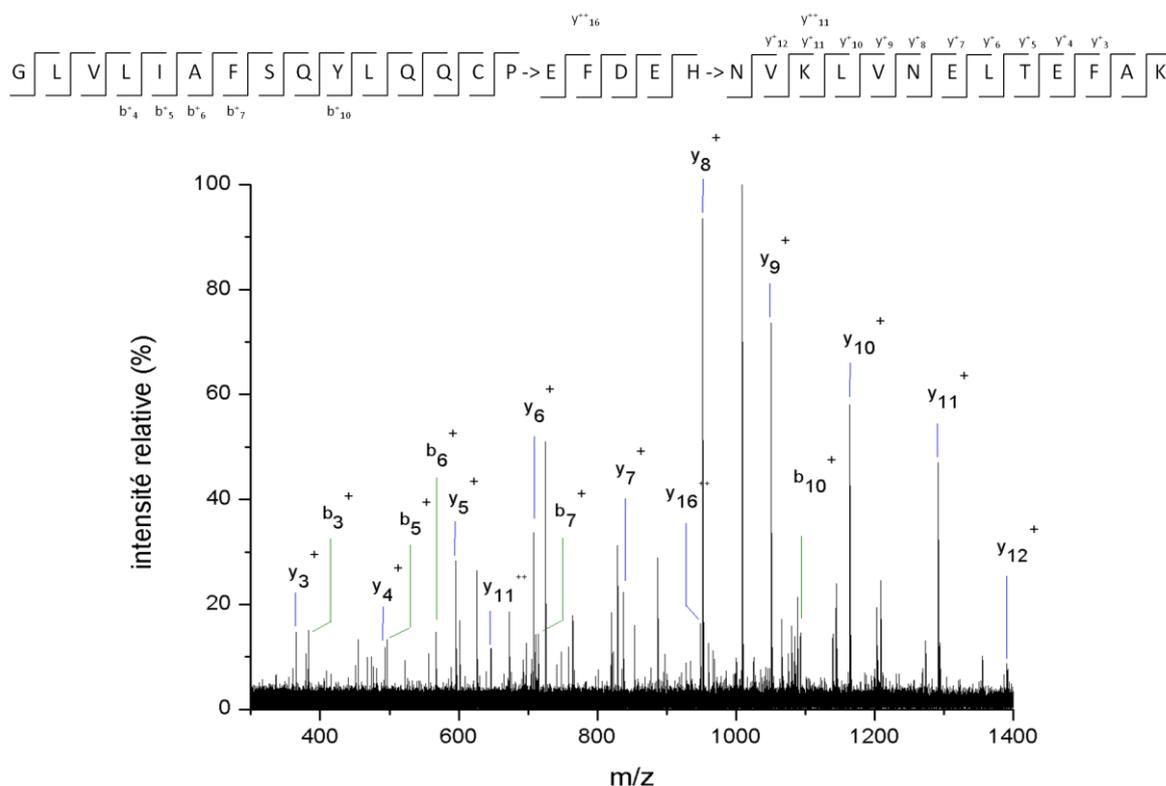


Figure 2.14 : Spectre de fragmentation du peptide 45-75 de la BSA après traitement. Les deux oxydations sont portées par les résidus P15 et H19. Elles correspondent respectivement à l'oxydation de la proline en acide pyro-glutamique (résidu E) et de l'histidine en asparagine (résidu N).

2.2 Photochimie et photophysique du bleu de méthylène

Un agent photo-sensibilisateur absorbe l'énergie directement depuis une source lumineuse, l'amenant ainsi à un état excité. Il peut ensuite la transférer à une molécule d'oxygène pour former une forme activée d'oxygène, appelée oxygène singulet (1O_2). La molécule excitée de BM est relativement stable et peut être l'objet d'un réarrangement électronique, grâce à ses systèmes conjugués ($\pi-\pi$) (Figure 2.15). Cette forme réarrangée est reconnue comme un état triplet excité qui facilite l'action photo-dynamique du BM. L'état triplet excité, dont la durée de vie est longue, permet à la molécule de BM de surmonter l'énergie d'excitation d'autres molécules. L'interaction directe avec des molécules adjacentes conduit à un transfert d'électrons ou l'abstraction d'un hydrogène allylique de molécules insaturées et/ou à la formation d'espèces radicalaires. Ce processus est appelé la photosensibilisation de type I. Ainsi avec les molécules associées à des membranes, on aboutit à la formation d'hydroperoxydes lipidiques qui endommagent ces membranes. De plus, en milieu aqueux, la réaction de Type I peut induire des radicaux OH^\bullet en solution, qui peuvent ensuite réagir avec des biomolécules ou générer des peroxydes d'hydrogène *in-situ*. Cela renforce son activité cytotoxique. Il s'agit là de l'origine des traitements UV qui utilisent des

molécules photosensibles. L'inactivation des pathogènes par le BM/UV-VIS repose sur ce même principe, comme l'amotosalen et la riboflavine pour l'inactivation des plaquettes.

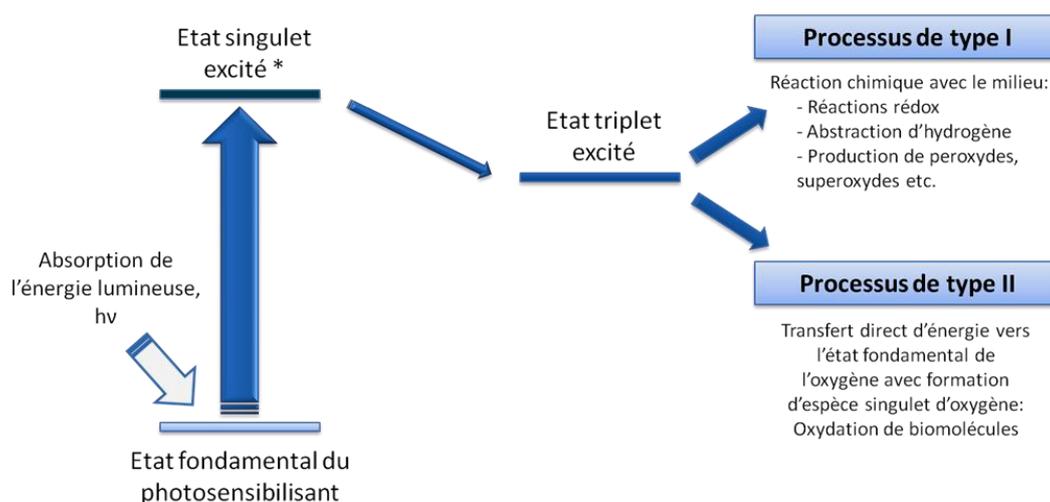


Figure 2.15 : Mécanisme d'action d'un photosensibilisateur [32]

En revanche, si l'état triplet excité interagit directement avec l'oxygène, l'énergie d'excitation transférée provoque la formation d'oxygènes singlets $^1\text{O}_2$, espèces très réactives. Cet état métastable de l'oxygène est extrêmement toxique, de par son action oxydante. Cette voie de photosensibilisation est appelée photosensibilisation de type II. Elle est reconnue comme étant la voie principale des dommages causés par photo-oxydation.

2.3 L'oxydation des protéines

L'impact de l'oxygène singulet sur les protéines est un domaine qui a généré un très grand nombre d'études ces dernières années dans la mesure où de telles espèces sont impliquées dans de nombreuses pathologies. En effet, dans des conditions physiologiques normales, les espèces réactives de l'oxygène sont produites en permanence au sein d'une cellule comme médiateurs tissulaires ou comme résidus des réactions immunitaires ou encore comme régulateurs de fonctions cellulaires telle l'apoptose (mort programmée des cellules). L'abondance de ces espèces est régulée par l'organisme. Toutefois, en cas de dysfonctionnement des mécanismes de défense ou de surproduction de radicaux, l'accumulation de ces radicaux entraîne ainsi un état cellulaire de stress oxydant. La production d'espèces réactives peut être à l'origine des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer et de Parkinson [33, 34] ou encore le diabète [35].

Des études ont déterminé les constantes de réactions de $^1\text{O}_2$ pour une large gamme de cibles biologiques, comme l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides [36]. Les protéines y

Chapitre 2

apparaissent comme étant la cible principale de $^1\text{O}_2$ en raison (i) de leur abondance dans la plupart des systèmes biologiques (jusqu'à 70% [36, 37]), et (ii) des constantes de réactions élevées de $^1\text{O}_2$ avec les chaînes latérales des protéines [36]. Les acides aminés plus spécifiquement concernés par ces réactions sont les résidus Histidine (His, H), Tyrosine (Tyr, Y), Méthionine (Met, M), Cystéine (Cys, C) et Tryptophane (Trp, W). En effet, ils possèdent les constantes de réaction les plus grandes dans des conditions de pH physiologiques. Dans une moindre mesure, on peut aussi citer la Phénylalanine (Phe, F), l'Arginine (Arg, R), la Lysine (Lys, K) et la Proline (Pro, P) [38]. Les dommages causés aux protéines ont été décrits et expliqués dans la littérature [2, 39, 40] : on observe généralement (i) des oxydations de la chaîne peptidique, (ii) des oxydations des chaînes latérales, (iii) des clivages de liaisons peptidiques, et (iv) la génération de dérivés carbonyles.

Les réactions d'oxydations envisagées sont regroupées dans le tableau 2.1. Elles ont été répertoriées à partir du site web www.unimod.org [41] qui est une banque de données détaillant toutes les modifications pouvant exister sur des acides aminés.

Tableau 2.1 : Liste des modifications provoquées par des réactions d'oxydations sur les protéines (Unimod)

Modification	Description	Δm (monoisotopique)
Amino (Tyr)	Oxydation de Tyrosine en 2-aminotyrosine	15,0108
Arg > GluSA	Oxydation d'Arginine en semi-aldéhyde glutamique	-43,0534
Cys > Oxalanine	Oxydation de Cystéine en oxoalanine	-17,9928
His > Asn	Oxydation d'Histidine en Asparagine	-23,0159
His > Asp	Oxydation d'Histidine en acide aspartique	-22,0319
Lys > Allysine	Oxydation de Lysine en semi-aldéhyde aminoadipique	-1,0316
Lys > Aminoadipic acid	Oxydation de Lysine en acide α -aminoadipique	14,9632
Pro > Pyrrolidone	Oxydation de Proline en pyrrolidone	-27,9949
Pro > Pyrrolidinone	Oxydation de Proline en pyrrolidinone	-30,0105
Pro > PyroGlu	Oxydation de Proline en acide pyroglutamique	13,9792
Trp > Hydroxykynurénine	Oxydation de Tryptophane en hydroxykynurénine	19,9898
Trp > Kynurénine	Oxydation de Tryptophane en kynurénine	3,9949
Trp > Oxolactone	Oxydation de Tryptophane en oxolactone	13,9792
Trioxydation	Oxydation de Cystéine en acide cystéique	47,9847
Oxydation/hydroxylation	Addition d'oxygène - hydroxylation (Lys, Arg, Cys, Me, Tyr, His, Pro, Trp, Phe, Asp, Asn)	15,9949
Dioxydation/dihydroxylation	Addition de deux oxygènes -dihydroxylation (Lys, Arg, Cys, Me, Tyr, His, Pro, Trp, Phe, Asp, Asn)	31,9898
Déamidation (Arg, Asn, Gln)		0,9840
Carbamylation (Lys, Arg, Cys, Met)	Réaction isocyanate avec les acides aminés	43,0058
Quinone (Tyr)		29,9741

2.4 Effet du traitement au bleu de méthylène sur les modèles

2.4.1 Substance P

Le spectre de la substance P traitée au BM/UV-vis ne révèle plus qu'un seul pic majoritaire correspondant à la forme oxydée de ce peptide, comme le montre la figure 2.16. En effet, le spectre témoin faisait état de la coexistence de la forme native et non oxydée de la substance P. La fragmentation du pic à m/z 1363,74 présente un pic majoritaire à m/z 1299,77 représentant une différence de masse de 63,99 Da, caractéristique de l'oxydation des méthionines (Annexe 2.1). En effet, cela correspond à la scission de la chaîne latérale de la méthionine entraînant la formation d'une molécule de SOHCH_3 . De plus, tous les ions b qui sont observés sur le spectre de fragmentation apparaissent sans modification. Ainsi, on conclut que l'oxydation intervient sur le résidu méthionine.

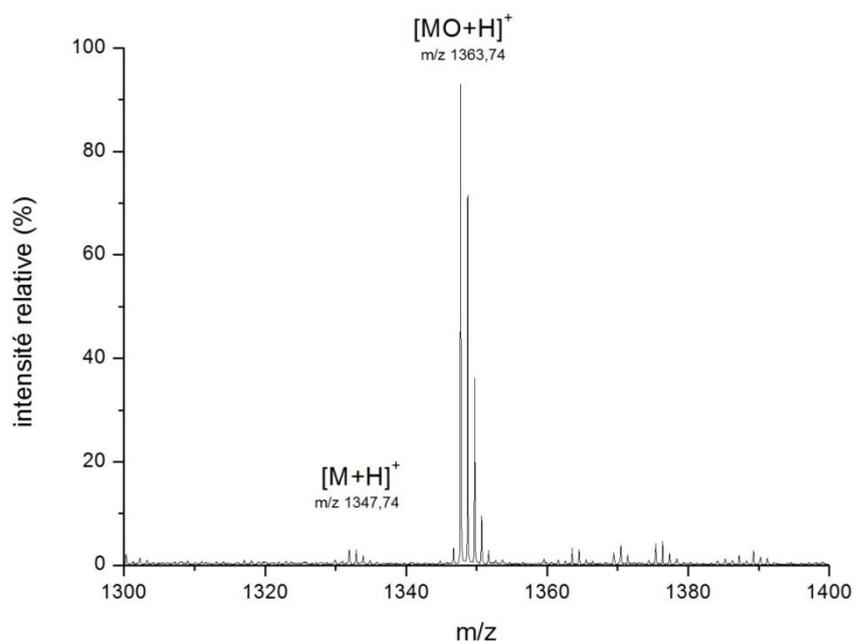


Figure 2.16 : Spectre MS de la substance P, après traitement au BM/UV-VIS. Seule la forme oxydée existe.

2.4.2 L' α -lactalbumine

L'analyse par spectrométrie MALDI-TOF en protéine entière de l' α LA n'est pas une approche pertinente pour l'étude des modifications de type oxydation car elles induisent de petites différences de masse. La largeur du signal ne permet pas d'apprécier ces changements de masse. Là encore, la PMF de la l' α LA après traitement a été obtenue à partir d'une analyse MALDI-TOF/TOF MS. Cela nous a permis de mettre en avant deux peptides oxydés, malgré une faible intensité du signal MS. La fragmentation de ces deux peptides a permis de localiser

ces deux modifications. Dans les deux cas, le résidu W est impliqué dans l'oxydation. Ainsi le résidu W9 du peptide 128-142 est porteur d'une simple oxydation, tandis que le résidu W10 du peptide 114-127 est porteur d'une double oxydation. A titre d'exemple, la fragmentation du peptide 114-127 est représentée dans la figure 2.17. L'annexe 2.2 illustre la fragmentation du peptide oxydé 128-142.

Afin de valider ces observations une analyse nanoLC-nanoESI-hQh-FT-ICR MS/MS est réalisée sur le même échantillon.

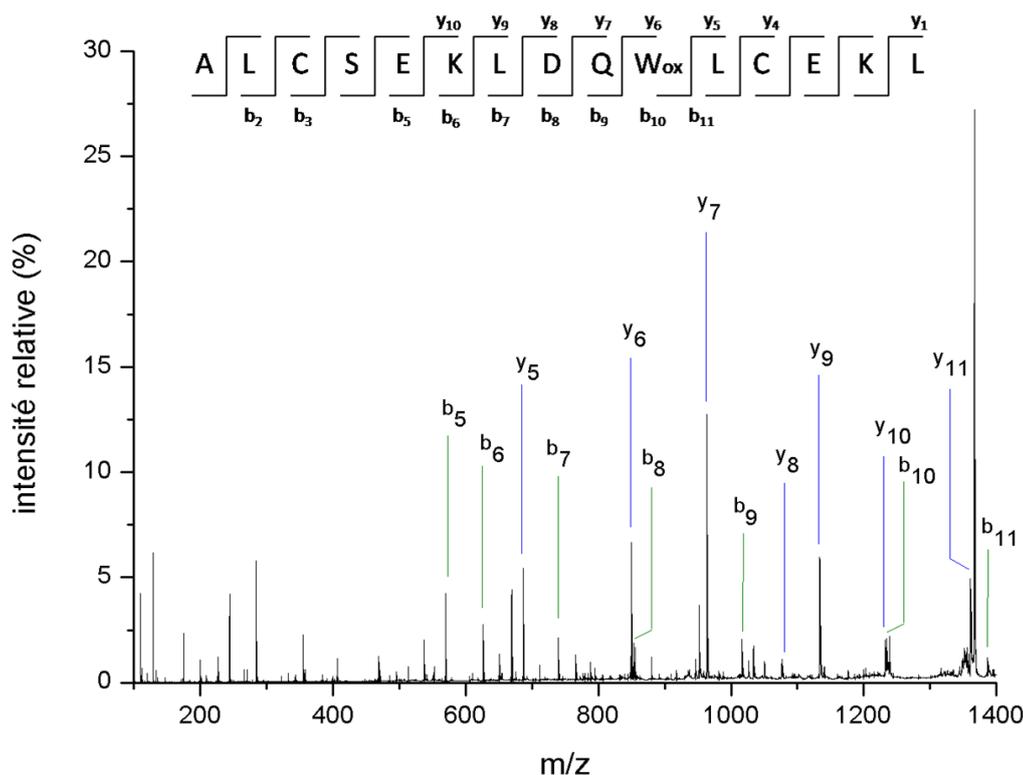


Figure 2.17 : Spectre MS/MS du peptide 114-127 de l' α -lactalbumine, portant une double oxydation sur le résidu W10

2.4.3 L'albumine sérique bovine

Dans les années 1990, Finch et al. a identifié des résidus modifiés dans de l'albumine sérique humaine (HSA) après l'avoir exposée à du peroxyde d'hydrogène [42]. Dans cette étude, cinq sites d'oxydations ont été mis en avant : une cystéine et quatre méthionines. Plus récemment, en 2009, Guedes met en avant plusieurs résidus oxydés après avoir exposé de la BSA à des conditions oxydantes[43]. Les acides aminés impliqués étaient majoritairement des lysines, cystéines, arginines, prolines, histidines et tyrosines.

Ici, l'effet du bleu de méthylène ne semble pas induire autant de modifications. En effet, l'analyse nanoLC-nanoESI-hQh-FT-ICR MS du digest de BSA après exposition ne fait apparaître que six peptides oxydés, en plus de ceux déjà observés avant le traitement au bleu

de méthylène. Dans chaque cas, il s'agit d'une addition d'un ou deux oxygènes. Les mono-oxydations concernent les peptides 421-426 sur la phénylalanine F6 (figure 2.18), 101-117 sur la méthionine M11 et 562-580 sur la méthionine M10.

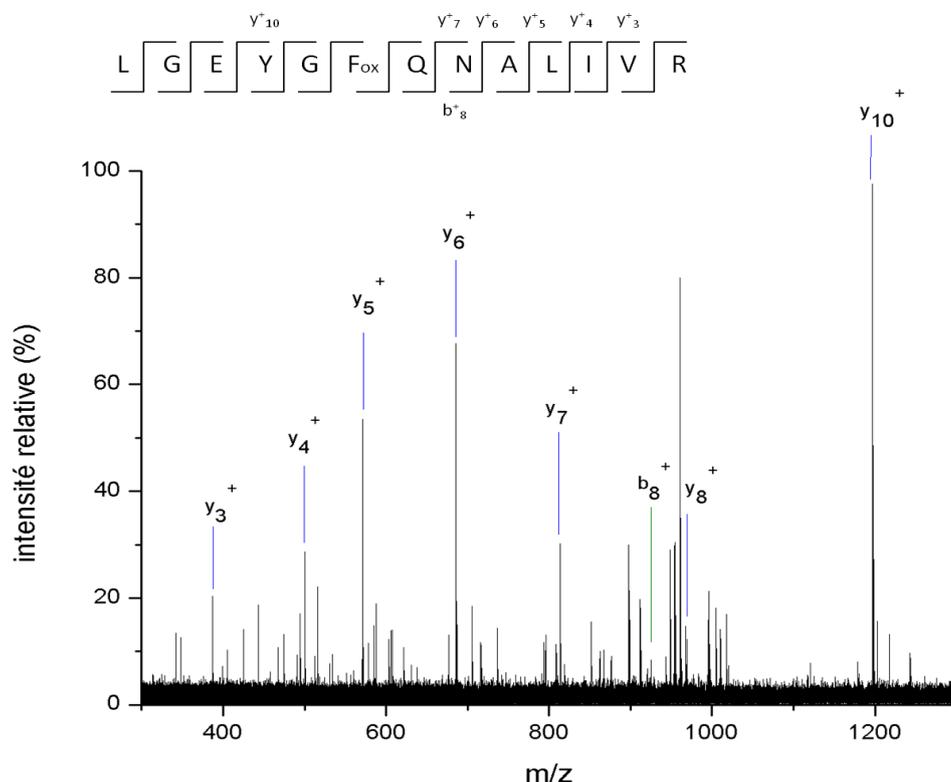


Figure 2.18 : Spectre de fragmentation du peptide 421-426 de la BSA, présentant une oxydation sur le résidu F6

Enfin, le peptide 35-44 est doublement oxydé ; les résidus concernés sont la phénylalanine F9 et la lysine K10 (Annexe 2.3). Le peptide 233-241 est également dioxydé sur le tryptophane W5 (annexe 2.4).

En conclusion

Dans cette section, nous avons mis en place une démarche nous permettant de mettre en avant l'impact du BM associé aux UV sur trois standards protéiques. Basées sur les spectrométries MALDI-TOF et nanoLC-nanoESI-hQh-FT-ICR, les analyses ont révélé des différences dans les échantillons avant et après traitement au BM/UV-vis. Des modifications apparaissent ; il s'agit dans tous les cas d'oxydations, portées par les résidus M, F, W et K. Ces oxydations reflètent le mécanisme d'excitation du BM sous UV, qui génère des espèces singulets *in-situ*.

3 Approche « label-free »

3.1 La LC-comparative : son principe

Contrairement à l'électrophorèse 2D où les échantillons sont séparés à l'échelle de la protéine, l'analyse LC-MS permet l'analyse à l'échelle du peptide [44, 45]. L'analyse protéomique a longtemps été cantonnée à la détection simple qualitative des différences dans la composition en protéines entre échantillons. Aujourd'hui, la précision des instruments modernes donne accès à la quantification de différences [23, 46-50]. C'est pourquoi la LC-MS a su s'imposer comme un outil puissant non seulement pour des identifications complètes mais également pour la quantification de matrices protéiques complexes. L'approche par LC-MS comparative repose sur le constat que l'intensité (ou le volume) d'un pic est proportionnel à la concentration d'un des peptides présents dans l'échantillon [47, 48, 51]. Ainsi, déterminer l'intensité (ou le volume) d'un pic LC-MS et le comparer ensuite avec plusieurs analyses LC-MS d'échantillons issus de différentes conditions expérimentales permet de fournir une vue globale et représentative de plusieurs centaines de concentrations peptidiques. L'avantage majeur de cette approche est qu'il minimise la manipulation de l'échantillon, le préservant de modifications artefactuelles potentielles. De plus, la comparaison permet exclusivement un traitement objectif des données, car elle repose sur un traitement purement statistique des données LC-MS.

La LC-MS comparative est une démarche de quantification relativement récente. Toutefois, elle requière des contraintes expérimentales en termes d'instrumentation et de logiciels de traitement de données [52, 53]. Une quantification détaillée et précise d'un maximum des données MS nécessite des spectromètres de masse à haute résolution ainsi que des analyses nanoLC hautement reproductibles. Les décalages expérimentaux en m/z ou en temps de rétention complexifient grandement la comparaison directe des données LC-MS. L'annexe 2.5 regroupe les différents logiciels permettant d'aligner les analyses LC-MS.

Par conséquent, l'utilisation de logiciels spécifiques est nécessaire pour le traitement des données brutes où plusieurs étapes sont indispensables (détails dans partie 3.1.2) comme la détection et l'intégration des signaux MS, l'alignement de profils d'élution, la normalisation et l'étude statistique des données. Les noms donnés à ces différentes étapes peuvent varier selon les logiciels [26]. Il est important de noter que la justesse de l'alignement est un paramètre clé dans l'approche de LC-MS comparative, et doit être prise en compte dans le choix du logiciel.

3.2 Différentes étapes pour la LC-MS comparative

Le logiciel utilisé pour cette étude est ProgenesisLC-MS, proposé par la société LinearNon Dynamics. Il utilise à la fois l'analyse statistique uni- et multi-variée comme outil afin de mettre en avant les différences qui existent entre deux échantillons. Dans la pratique, il s'appuie sur l'analyse de variance (ANOVA) et l'analyse en composantes principales (*Principal Component Analysis*, PCA) afin de mettre en avant les peptides/spots significativement différents d'un échantillon à l'autre. Il inclue également la recherche de faux-positifs (*False Discovery Rate*, FDR).

Les analyses réalisées pour cette étude ont été effectuées par nanoLC nanoESI-FT-ICR MS/MS. Le format des fichiers générés par Bruker (.baf) n'étant pas supporté par ProgenesisLC-MS, une étape préliminaire de conversion est indispensable pour transformer .baf en .mzXML. La conversion s'effectue par l'intermédiaire d'une application, appelée CompassXport, développée par BrukerDaltonics. De fait, les analyses LC-MS, notamment à haute résolution, génèrent des volumes de données toujours plus importants. Typiquement, une analyse d'un digest de plasma par nanoLC nanoESI-FT-ICR MS/MS contient environ 5,5 GB de données. Pour réduire les volumes de stockage, plusieurs formats ouverts ont été développés, et ainsi faciliter la manipulation et l'échange de données MS. Développé par Pedrioli., le format .mzXML repose sur le langage XML (eXtensible Markup Language). Bien que largement adopté par la communauté de protéomique (et plus largement de spectrométrie de masse), le format .mzXML n'est pas encore considéré comme format standard de données. Il faut, par ailleurs, souligner que la conversion s'effectue sur les données MS et MS/MS brutes dites « centroïdes ».

Après cette étape de conversion de données au format .mzXML, une série d'autres étapes sont nécessaires pour procéder à la comparaison des données :

- Le « *peak modeling* » permet de générer une représentation graphique utilisant les rapports m/z et les temps de rétention comme axes (figure 2.19). Cette étape correspond ainsi à la détection de pics MS. Plusieurs algorithmes pour la détection ont été décrits [52]. La meilleure détection est celle qui prend en compte à la fois les temps de rétention et les rapports m/z [54]. Cette première étape de traitement des données permet une nouvelle réduction du volume des données.

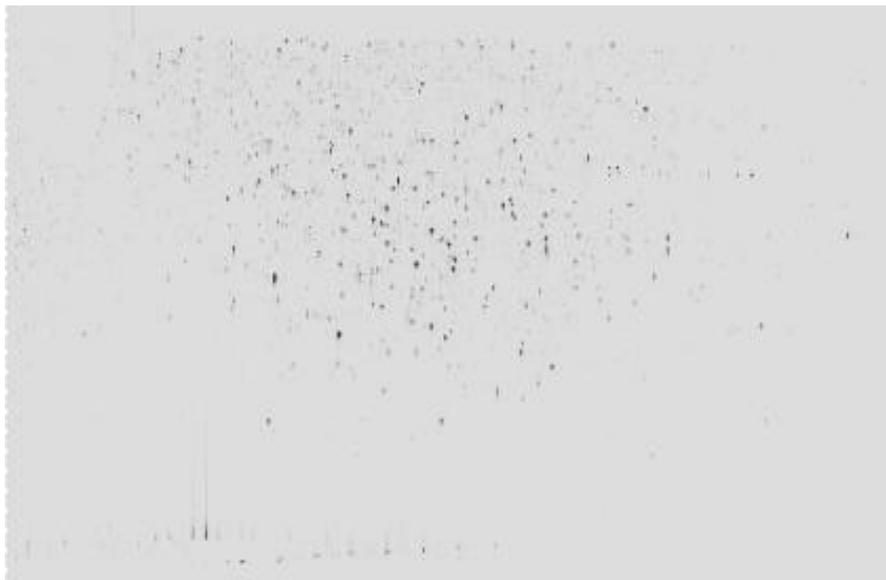


Figure 2.19 : Représentation graphique du LC-MS issue de l'analyse d'un échantillon de plasma (fraction majoritaire), après l'étape de "peak modeling". Ici, l'axe des ordonnées correspond aux temps de rétention et l'axe des abscisses aux rapports m/z.

- L'alignement des données consiste à trouver, pour chaque pic détecté de chaque analyse LC-MS, le pic correspondant dans toutes les autres analyses. En pratique, cette étape génère des vecteurs pour aligner les temps de rétention, considérant les données MS invariables. Cela permet de compenser la variation entre chaque analyse induite par l'étape de séparation par chromatographie liquide. Là encore, différents algorithmes ont été développés dans le but de simplifier cette étape pour les utilisateurs [55-60]. Tous tirent leur efficacité en grande partie grâce aux analyses MS à haute résolution et temps de rétention stables, notamment lorsque les analyses concernent des mélanges peptidiques très complexes [61]. La figure 2.20 donne l'exemple d'un alignement de données LC-MS, à partir d'une analyse désignée comme référence.

- Le « *peak picking* » définit, à partir de l'étape précédente, chaque ion existant (position, abondance) en lui attribuant un numéro. Cette étape génère ainsi une cartographie des données de chaque analyse LC-MS, où tous les ions présents dans les échantillons sont représentés en une, deux (aire) ou trois dimensions (volume).

- Le traitement statistique à proprement parler (ANOVA, APC, analyse de puissance, FDR) pour cibler les ions avec un comportement significativement différent et que l'on souhaite identifier. Un des avantages de cette démarche de quantification est qu'elle permet la comparaison simultanée d'un grand nombre d'échantillons sur la base de leur analyse LC-MS. En effet, cela est rendu possible grâce aux analyses statistiques multi-variées [62-64]. A ce

niveau, il est également possible de connaître le nombre optimal de réplicats d'analyses par échantillon pour augmenter la confiance dans les différences observées.



Figure 2.20 : Etape d'alignement des analyses LC-MS (ProgenesisLC-MS). En rose, le run LC-MS de référence ; en vert, le run LC-MS qui doit être aligné. Dans la figure (b), les points bleus correspondent aux vecteurs générés pour l'alignement des deux runs LC-MS.

- L'identification des protéines ayant un comportement significativement différent. Elle s'effectue à partir de l'export de données MS/MS correspondantes des ions sélectionnés au format .mgf. Elle se déroule selon les conditions d'interrogation de banques de données classiques. Les résultats sont présentés par protéine identifiée qui, après import au format .xml des résultats MASCOT, regroupent les données quantitatives de LC-MS et qualitatives LC-MS/MS. Elle met ainsi en avant les éléments qui expliquent l'origine des différences observées entre les échantillons.

3.3 Eléments statistiques

Afin de mieux comprendre les statistiques qu'utilisent ce logiciel pour créer des listes d'inclusion pertinentes, les principes des éléments statistiques sur lesquelles se basent ProgenesisLC-MS sont présentés d'un point de vue pratique. Cela a pour but de comprendre

le choix des valeurs des paramètres statistiques (p-value, q-value, puissance) pour établir ces listes d'inclusion.

3.3.1 Test statistique

De façon générale, les tests statistiques ont une importance considérable parce qu'ils permettent de prendre des décisions non-subjectives basées sur des inégalités numériques. Il est important de souligner que tout test implique un certain risque, mais ce risque est choisi et assumé avant l'application du test.

Deux définitions sont importantes. On appelle hypothèse nulle H_0 , l'hypothèse testée ; il s'agit de l'hypothèse que le test est susceptible de rejeter. Par ailleurs, on appelle le α , le seuil de risque (ou seuil de signification du test). α est encore appelé risque de première espèce. Il représente la probabilité P de refuser H_0 alors que cette hypothèse est exacte. Ici, le choix d'un risque α bilatéral et symétrique définit sur la courbe Gausse (loi normale) deux points $t_1 = \alpha/2$ et $t_2 = 1 - \alpha/2$ tels que : (figure 2.21)

$$P(t_1 < z < t_2) = 1 - \alpha$$

Si la valeur de z tombe dans l'intervalle (t_1, t_2) , alors H_0 est acceptée. A l'inverse, si z est en dehors de cet intervalle, alors H_0 est rejetée au seuil de signification α . Ce risque est fixé à l'avance ; les valeurs habituelles sont 5% ou 1%. La notion de risque de première espèce est illustrée par la figure 2.21

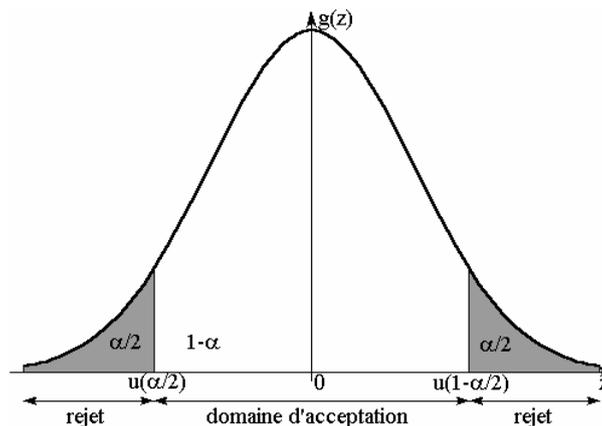


Figure 2.21 : Risque de première espèce (test bilatéral)

Dans la pratique, un test statistique se déroule selon plusieurs étapes :

- (i) le choix d'une hypothèse nulle et l'énonciation de l'hypothèse alternative H_1 ,
- (ii) le choix du seuil de risque α ,
- (iii) le calcul d'une variable de décision (fonction des données et de la nature du test),

- (iv) la détermination de la loi statistique suivie par la variable de décision (par exemple : binomiale, normale, Poisson, Student, Fisher-Snedecor ou encore χ^2). Pour les données expérimentales mesurées, on se placera dans le cadre d'une répartition de mesures selon une loi normale.
- (v) la détermination du domaine d'acceptation ; ce dernier est défini par les fractiles de la loi statistique et dépend de la valeur α choisie.
- (vi) la détermination de la variable de décision par rapport au domaine d'acceptation
- (vii) la conclusion sur l'acceptation ou le rejet de H_0 .

3.3.2 Notion de la puissance d'un test

Il est également possible de définir un deuxième niveau de risque : le risque de deuxième espèce, β . Il correspond à la probabilité de ne pas rejeter H_0 alors que H_1 est vraie.

$$P(\text{ne pas rejeter } H_0 \text{ quand } H_1 \text{ est vraie}) = \beta$$

Il est, toutefois, plus courant de raisonner en termes de $(1 - \beta)$. La quantité $(1 - \beta)$ définit alors la puissance du test. Elle représente la probabilité pour que la valeur statistique de test soit dans la région critique quand H_1 est vraie.

$$\text{Puissance} = 1 - \beta = P(\text{rejeter } H_0 \text{ quand } H_1 \text{ est vraie})$$

Si le test rejette H_0 , cela suggère également qu'il valide H_1 . Ainsi, avec un test puissant qui rejette H_0 , on peut accepter H_1 avec une faible probabilité d'avoir tort (erreur de type II).

Le logiciel ProgenesisLC-MS utilise la puissance (power) pour déterminer le nombre de réplicats nécessaires pour avoir un maximum de données avec un seuil de puissance $> 0,8$, et ainsi augmenter la confiance dans les résultats obtenus.

3.3.3 Analyse de variance (ANOVA)

D'un point de vue purement statistique, l'ANOVA est utilisée comme un test d'égalité de moyennes. Le problème de l'égalité des moyennes revient alors à montrer si elles peuvent être différenciées ou non en fonction d'un certain facteur appelé facteur différenciant. Pour mettre en place une ANOVA, il est nécessaire de partager l'échantillon en « groupes » suivant le facteur discriminant que l'on veut prendre en compte. Ce partage est naturel puisqu'on s'intéresse à des séries de mesures d'une même grandeur (ici, analyse LC-MS). La variabilité

existe toujours d'un groupe à l'autre, mais celle-ci peut être due au hasard. Il peut s'agir d'une grandeur qualitative ou quantitative suivant laquelle on peut discerner les résultats d'une même étude (par exemple : date de fabrication, numéro de lot, labo, conditions expérimentales (température, pression etc),...). C'est pourquoi le choix du facteur différenciant doit être pertinent. Dans notre étude ici, le facteur différenciant est le traitement d'inactivation appliqué à un échantillon de plasma.

L'ANOVA permet de montrer si la variabilité d'un groupe à l'autre peut s'expliquer uniquement par le hasard ou si le facteur différenciant intervient dans cette variabilité. Pour cela, on compare à l'aide d'un test de Fisher-Snédecour la variance à l'intérieur des groupes, appelée « variance intra-groupes », notée V_{intra} , à la variance entre les groupes, appelée « variance inter-groupes », notée V_{inter} . Si la variance inter-groupes n'est pas significativement différente de la variance intra-groupes, les différentes moyennes sont déclarées globalement égales : il n'y a donc pas de facteur différenciant.

En principe, $V_{inter} > V_{intra}$. Si ce n'est pas le cas, on peut conclure que les moyennes sont égales ou encore que le facteur différenciant est mal choisi puisqu'il a tendance à regrouper les moyennes. L'ANOVA repose sur deux hypothèses très restrictives : la normalité des données, et l'homogénéité des variances au sein des groupes doivent être préalablement vérifiées. Pour des mesures physiques, la condition de normalité est généralement supposée vérifiée. Dans la pratique, l'ANOVA va tester :

H_0 = hypothèse nulle : toutes les moyennes sont égales.

H_1 = hypothèse alternative : il existe au moins une moyenne différente des autres.

On applique alors un test de Fisher, à partir de $F_{obs} = \frac{V_{inter}}{V_{intra}}$ et $F \geq f(k-1, N-k, 1-\alpha)$, avec f le fractile de la loi de Fisher à $(k-1, N-k)$ le nombre de degrés de liberté considérant α le seuil de risque (0,05 dans notre cas). On rejette H_0 lorsque F_{obs} est supérieure au fractile d'ordre $1-\alpha$ (ou p-value) de la loi de Fisher correspondante. Il revient à l'analyste de définir préalablement le niveau de risque : si la p-value de l'ANOVA est inférieure à α , H_0 sera rejetée. En pratique, l'ANOVA est utilisée dans l'espoir de rejeter H_0 .

A partir de l'ANOVA effectuée par ProgenesisLC-MS, la première liste d'inclusion des peptides s'intéresse aux peptides présentant une p-value $< 0,05$.

3.3.4 Analyse en composante principale

L'analyse en composante principale (PCA) est une méthode de la famille de l'analyse des données, et plus généralement de la statistique multi-variée qui consiste à transformer des variables liées entre elles (dites corrélées) en nouvelles variables indépendantes les unes des autres. Ces nouvelles variables sont appelées « composantes principales » ou axes.

La PCA est donc une technique qui consiste à réduire la dimensionnalité d'un ensemble de données en trouvant un ensemble de variables plus petit que l'ensemble original, qui néanmoins contient la plupart de l'information de l'échantillon. Par information, on parle de la variation présente dans l'échantillon et donnée par la corrélation entre les variations originelles.

Il s'agit d'une approche à la fois géométrique (représentation des variables dans un nouvel espace géométrique) et statistique (recherche d'axes indépendants expliquant au mieux la variabilité des données). Lorsque l'on veut compresser un ensemble de N variables, les premiers axes de la PCA sont un meilleur choix du point de vue de la variance. En pratique, si deux échantillons sont significativement différents, ils apparaissent selon deux populations de données clairement distinctes sur une représentation géométrique.

Les champs d'application de la PCA sont multiples, et touchent de nombreux domaines, particulièrement la biologie jusqu'à très récemment, le traitement d'images.

3.3.5 Le FDR

Un seuil de p -value de 0,05 (erreur de type I) signifie que l'on accepte qu'il y ait 5% que le résultat soit un faux-positif. Par exemple, si l'ANOVA permet de mettre en avant 200 peptides avec un comportement significativement différent, cela signifie qu'il y a potentiellement 10 faux-positifs. Cela illustre un problème bien connu du test multiple.

Dans le cadre de l'ANOVA, on définit un « positif » comme étant un résultat significatif, c'est-à-dire que sa p -value est inférieure au seuil fixé (0,05 dans notre cas). De plus, un « faux positif » est un résultat considéré positif, alors qu'il n'existe pas de différence significative et devrait être considéré comme négatif.

Ainsi, afin d'être en mesure de juger de la pertinence de résultats issus de tests multiples, comme l'ANOVA, plusieurs approches ont été proposées pour le contrôle du risque multiple [65]. Les deux plus connues sont le FWER (Family Wise Error Rate) proposé par Bonferroni puis repris par Holm [66], et le FDR (False Discovery Rate) proposé par Benjamini [67]. Le tableau 2.2 récapitule les scénarii possibles dans le cas de tests multiples.

Tableau 2.2 : Synthèse de scénarii possibles dans la précision de décision

Réalité / Décision	Acceptation	Rejet	Total
H ₀ est vraie	U	V	m ₀
H ₁ est vraie	T	S	m ₁
Total	W	R	m

où les majuscules sont des variables observables, m le nombre de total de peptides sélectionnés à partir de leur p -value, m_0 et m_1 sont associées à H_0 et H_1 .

La FWER représente la probabilité de rejeter au moins une fois H_0 à tort :

$$\text{FWER} = P(V > 0)$$

Toutefois, cette correction a l'inconvénient d'être trop sévère pour une multiplicité de tests, et conduit à réduire le nombre de positifs au cours du test. Le FDR a permis de remédier à ce problème. Il correspond à la proportion attendue de règles sélectionnées à tort parmi les règles sélectionnées. Il se définit par $\text{FDR} = E(Q)$, avec $Q = V/R$ si $R > 0$, sinon 0 ; soit

$$\text{FDR} = E\left(\frac{V}{R} \mid R > 0\right) P(R > 0)$$

Cette nouvelle quantité présente l'avantage d'être moins stringente sur le résultat de m tests, malgré l'acceptation de quelques sélections à tort mais dont on contrôle la proportion. Ce dernier aspect augmente pour chaque test la probabilité que la décision prise soit pertinente (c'est-à-dire la puissance du test).

En pratique, le FDR réajuste les p -values puis les compare à nouveau à un seuil de rejet α . Ces valeurs réajustées prennent alors le nom de q -values. Dans ProgenesisLC-MS, ce calcul apparaît après la PCA, et est accompagné de la puissance. Une nouvelle liste d'inclusion est alors créée ; celle-ci fixe le seuil de puissance $> 0,8$.

3.4 Résultats

Les échantillons de plasma ont été fournis par l'EFS Nord-de-France, et sont issus du même donneur, dont une partie a subi le traitement d'inactivation viral au BM/UV-VIS. La quantification s'est effectuée en deux temps. En effet, les échantillons de plasmas (non-traité et traité) ont été préalablement déplétés sur une colonne d'immunochromatographie (Mars Hu-6, Agilent Technologies) scindant l'échantillon en deux fractions : une fraction contenant

Chapitre 2

les protéines les plus abondantes et une fraction contenant les autres protéines plasmatiques. Ces deux fractions ont ensuite été digérées en solution puis dessalées avant analyse. Ces dernières ont été analysées par nanoLC-nanoESI-hQh-FT-ICR MS, selon un gradient de trois heures, sur une colonne C18 (100 Å, Dionex LC-Packings). Six réplicats ont été réalisés par type d'échantillon.

On cherche à mettre en avant l'impact du traitement au BM/UV-VIS sur les protéines plasmatiques. Pour valider cette hypothèse, les données sont réparties en deux groupes distincts : les données issues des échantillons non-traités et les données issues des échantillons traités au BM/UV-VIS. Enfin, les deux quantifications utiliseront les mêmes critères de sélection pour générer les listes d'inclusion : ainsi, on inclura les ions avec des p-values $< 0,05$ et des puissances $> 0,8$.

L'avant dernière étape consiste à éditer un fichier .mgf qui contient les ions détectés puis de le soumettre à une interrogation de banques de données. L'identification est réalisée par l'intermédiaire de notre serveur Mascot et sur la banque de données SwissProt en incluant les oxydations (FKP, HW, M) comme modifications variables, mais également les modifications envisagées dans le tableau 2.1.

3.4.1 Protéines majoritaires

La fraction majoritaire concerne en réalité l'albumine, la sérotransferrine, l' α -1-antitrypsine, l'haptoglobine, les IgG et les IgA. A partir des données en .mzXML, 30789 ions ont été détectés. L'ANOVA réalisée sur ces ions a permis de mettre en avant 10480 ions présentant une p-value $< 0,05$ (dont 2997 ions avec une puissance $> 0,8$).

La PCA réalisée sur ces données a permis de mettre en évidence l'existence claire de deux populations. La figure 2.22 montre que cette répartition suit la partition de données en deux groupes, validant ainsi l'hypothèse de l'impact du traitement au BM/UV-VIS sur les protéines plasmatiques. Sur cette figure, tous les ions sélectionnés sont présentés à partir de leur p-value. Les ions avec une puissance $> 0,8$ apparaissent en rouge, et figurent à l'extrémité de chaque population, soulignant ainsi leur caractère significativement différent.

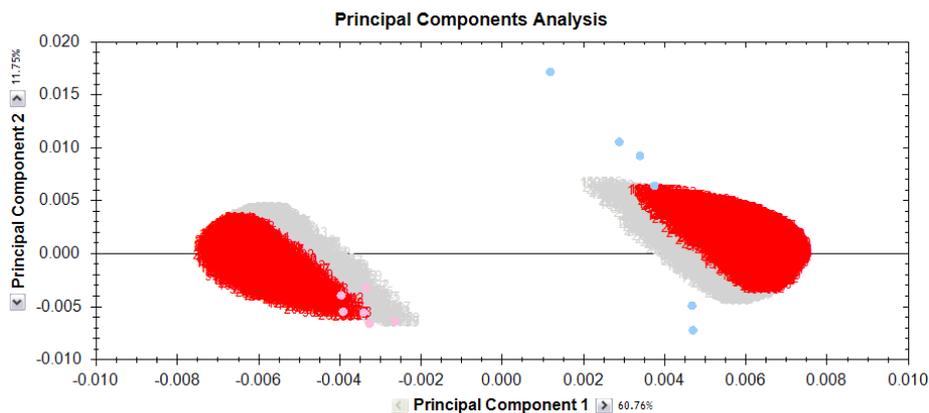


Figure 2.22 : Résultat de la PCA réalisée sur les données issues des protéines majoritaires, avant (rose) et après (bleu) traitement au BM/UV-VIS

L’interrogation des banques de données a permis d’identifier 20 protéines, modifiées ou non. On remarque à ce niveau, qu’un grand nombre d’ions détectés n’ont pu être identifiés car ils ne possédaient pas de spectres MS/MS. Le nombre de protéines identifiées est plus grand que celui attendu dans la mesure où les protéines, comme l’albumine, sont des protéines de transport, et sont associées à d’autres protéines. On constate également que les IgG et les IgA se retrouvent sous leurs formes lourdes et légères, caractéristiques de la structure des anticorps. Une seule modification a pu être mise en avant, avec une nette expression d’un peptide oxydé dans l’échantillon ayant été traité au BM/UV-VIS. Il s’agit du peptide EPGVYTLPPSRDELTK doublement oxydé, appartenant à la chaîne lourde de l’IgG, comme le montre la figure 2.23. Son spectre MS/MS permettant de localiser cette oxydation sur les résidus P9 et K16 est présenté dans l’annexe 2.6.

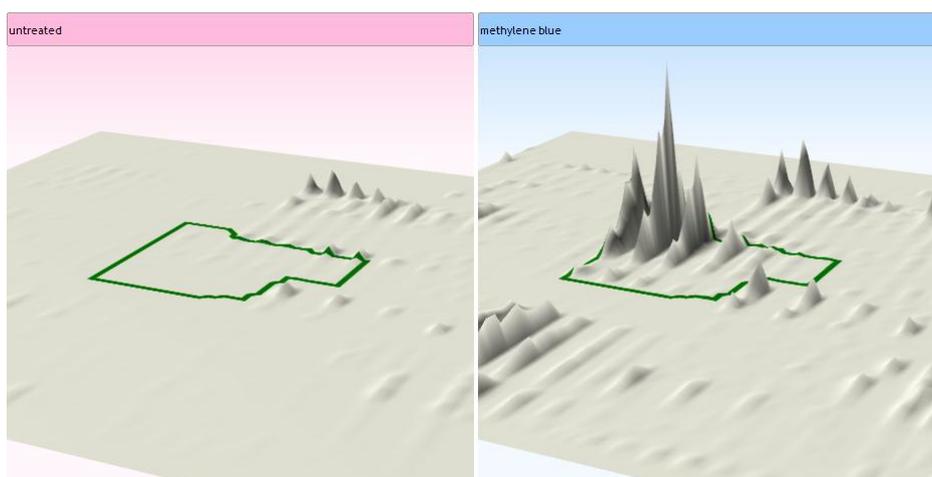
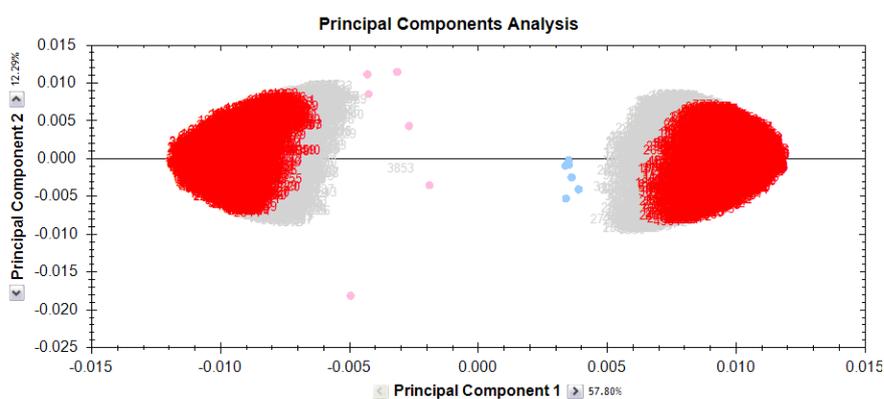


Figure 2.23 : Quantification du peptide EPGVYTLPPSRDELTK oxydé de l’immunoglobuline G, avant (rose) et après (bleu) traitement au BM/UV-VIS.

3.4.2 Protéines minoritaires

A partir des données en .mzXML, 32544 ions ont été détectés. L'ANOVA réalisée sur ces ions a permis de mettre en avant 110059 ions présentant une p -value $< 0,05$, dont 5841 ions avec une puissance $> 0,8$.

La PCA confirme l'observation faite précédemment sur les protéines majoritaires, comme le montre la figure 2.24. Deux populations de données distinctes apparaissent, et respectent la répartition des données sur le critère « avant » et « après » traitement, reconnaissant ainsi le traitement au BM/UV-VIS comme facteur discriminant. On constate de nouveau que les ions sélectionnés possédant une puissance $> 0,8$ apparaissent en rouge et à l'extrémité de chaque population.



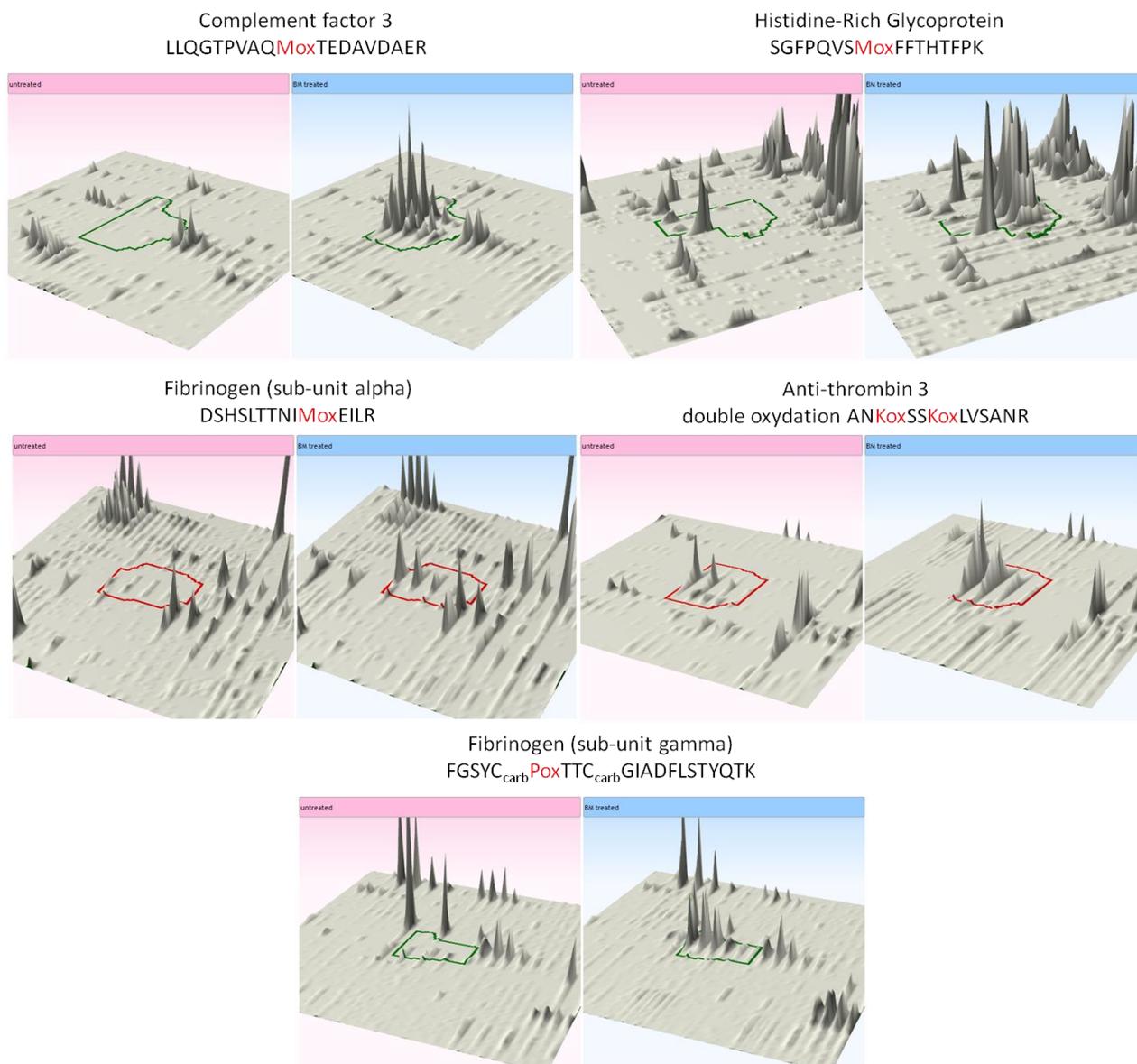


Figure 2.25 : Bilan de la quantification des peptides oxydés (protéines minoritaires)

Une déamidation a pu également être identifiée sur un peptide appartenant à la chaîne alpha du fibrinogène. Elle est présente majoritairement dans l'échantillon ayant subi le traitement au BM/UV-VIS (Figure 2.26). La figure 2.27 présente la fragmentation de ce peptide afin d'attester de la présence de cette modification. Il est intéressant de souligner que les déamidations sont des modifications caractéristiques du vieillissement et de la dégradation des protéines [68].

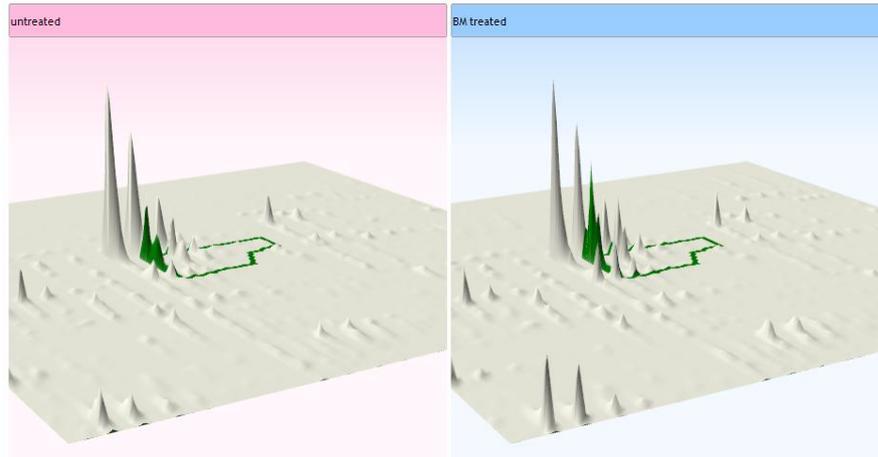


Figure 2.26 : Déamidation sur la chaîne alpha du fibrinogène dont l'expression est amplifiée après le traitement au BM/UV-VIS.

A partir de ces observations, il est désormais possible de commencer à faire le lien entre les modifications observées au cours de cette étude et les observations décrites dans la littérature sur le traitement au BM/UV-VIS. En effet, on a pu constater que le fibrinogène ainsi que l'ANTIIII étaient sensibles à l'action du BM/UV-VIS, à travers l'observation d'oxydations et de déamidations. Or ces deux protéines sont impliquées dans la cascade de coagulation. Par ailleurs, il a été montré (cf Chapitre 1) que le traitement conduisait à une perte d'activité du fibrinogène, et plus généralement à des temps de coagulation plus longs.

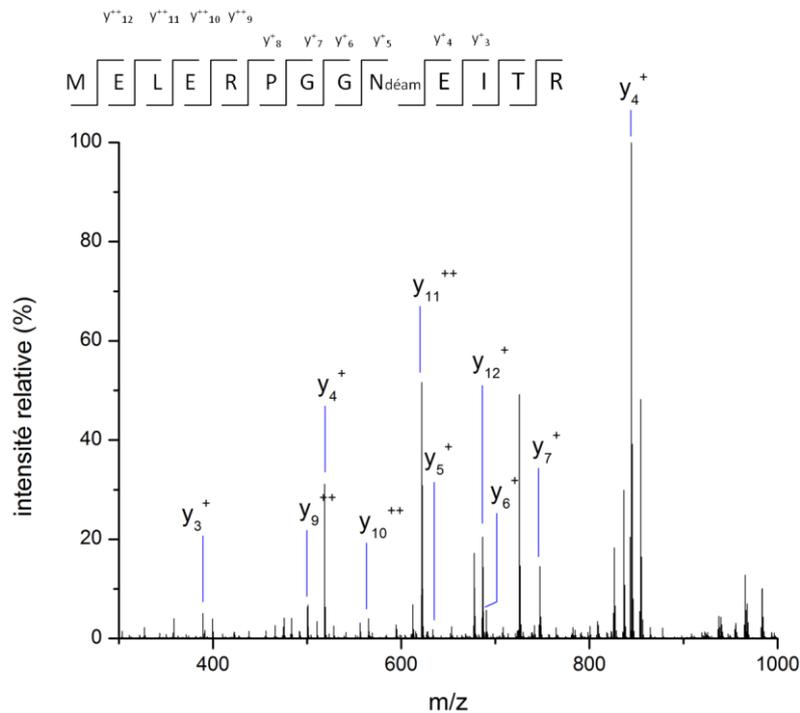


Figure 2.27 : Spectre de MS/MS correspondant au peptide MELERPGNEITR déamidé de la chaîne alpha du fibrinogène, après traitement.

4 Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons, dans un premier temps, cherché à identifier les modifications susceptibles d'être induites par le traitement au BM/UV-VIS. Ce travail s'appuie sur des analyses MALDI-TOF/TOF et nanoLC-nanoESI-hQh-FT-ICR MS. A partir de standards protéiques traités dans les mêmes conditions d'exposition que les poches de plasma lors de l'inactivation virale, nous avons pu mettre en avant différents types d'oxydations. Ces modifications induites ont été localisées sur des résidus tryptophane, méthionine, proline, lysine ou encore phénylalanine.

Dans un second temps, nous avons mis en place une approche innovante de quantification « label free » effectuée à partir d'analyses nanoLC-nanoESI-hQh-FT-ICR MS. Elle repose sur la LC-MS comparative et un traitement statistique des données brutes. Nous avons, ainsi, pu nous rendre compte de l'importance de la reproductibilité des analyses LC-MS. En effet, cette technique de quantification nécessite des chaînes chromatographiques stables et des spectromètres de haute résolution. Les logiciels comme ProgenesisLC-MS demandent une bonne compréhension pratique de la statistique afin de sélectionner les ions de façon pertinente. Approche objective, elle nécessite également peu de préparation d'échantillon ce qui est important dans l'étude de modifications.

A partir d'un traitement objectif de données LC-MS brutes, nous avons pu démontrer que le traitement photochimique au BM avait un réel impact sur les protéines plasmatiques. Des oxydations ont été trouvées dans les échantillons issus de plasma traité, et étaient en accord avec celles décrites dans la première partie de cette étude. Deux cas de figures ont pu être soulignés : (i) l'apparition d'oxydations sur des peptides dans l'échantillon après traitement, et (ii) des niveaux d'oxydations supérieurs après traitement. De plus, il a été possible de mettre en avant des déamidations intervenant sur des résidus Asp ; ces modifications sont en général liées à la dégradation plasmatique.

Bibliographie

1. Junqueira HC, Severino D, Dias LG, Gugliotti MS, Baptista MS: Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2002; **4**:2320-8.
2. Tuite EM, Kelly JM: New trends in photobiology: Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1993; **21**:103-24.
3. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, et al.: Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2005; **2**:175-91.
4. Ochsner M: Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1997; **39**:1-18.
5. Baptista MS, Indig GL: Effect of BSA Binding on Photophysical and Photochemical Properties of Triarylmethane Dyes. *The Journal of Physical Chemistry B* 1998; **102**:4678-88.
6. Gironés N, Bueno JL, Carrión J, Fresno M, Castro E: The efficacy of photochemical treatment with methylene blue and light for the reduction of *Trypanosoma cruzi* in infected plasma. *Vox Sanguinis* 2006; **91**:285-91.
7. Washburn MP, Wolters D, Yates JR: Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology* 2001; **19**:242-7.
8. Aebersold R, Mann M: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature (London, U K)* 2003; **422**:198-207.
9. Sadygov RG, Cociorva D, Yates JR, III: Large-scale database searching using tandem mass spectra: Looking up the answer in the back of the book. *Nature Methods* 2004; **1**:195-202.
10. Nesvizhskii AI, Aebersold R: Interpretation of Shotgun Proteomic Data. *Molecular & Cellular Proteomics* 2005; **4**:1419-40.
11. Motoyama A, Yates JR: Multidimensional LC Separations in Shotgun Proteomics. *Analytical Chemistry* 2008; **80**:7187-93.
12. Nishihara JC, Champion KM: Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain. *Electrophoresis* 2002; **23**:2203-15.
13. Kang Y, Techanukul T, Mantalaris A, Nagy JM: Comparison of Three Commercially Available DIGE Analysis Software Packages: Minimal User Intervention in Gel-Based Proteomics. *Journal of Proteome Research* 2009; **8**:1077-84.
14. Hrebicek T, Duerrschnid K, Auer N, Bayer K, Rizzi A: Effect of CyDye minimum labeling in differential gel electrophoresis on the reliability of protein identification. *Electrophoresis* 2007; **28**:1161-9.
15. Shaw J, Rowlinson R, Nickson J, et al.: Evaluation of saturation labeling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* 2003; **3**:1181-95.
16. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R: Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* 1999; **17**:994-9.
17. Zieske LR: A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot* 2006; **57**:1501-8.
18. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al.: Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. *Molecular & Cellular Proteomics* 2004; **3**:1154-69.
19. Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F: A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* 2005; **5**:4-15.

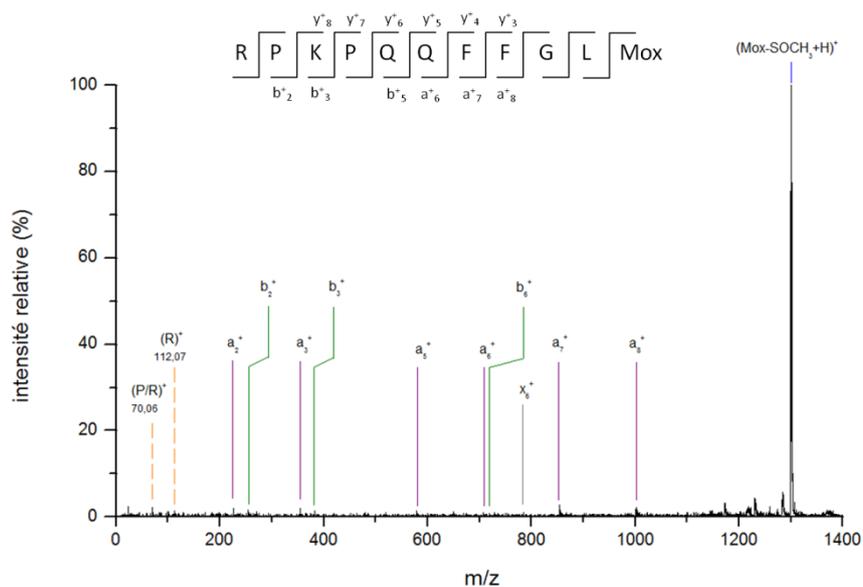
20. Lottspeich F, Kellermann J: ICPL Labeling Strategies for Proteome Research *Methods in Molecular Biology* 2011; **753**:55-64.
21. Liu H, Sadygov RG, Yates JR: A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics. *Analytical Chemistry* 2004; **76**:4193-201.
22. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, et al.: Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein. *Molecular & Cellular Proteomics* 2005; **4**:1265-72.
23. Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, et al.: Comparison of Label-free Methods for Quantifying Human Proteins by Shotgun Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 2005; **4**:1487-502.
24. Paoletti AC, Parmely TJ, Tomomori-Sato C, et al.: Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; **103**:18928-33.
25. Zybaylov B, Mosley AL, Sardi ME, Coleman MK, Florens L, Washburn MP: Statistical Analysis of Membrane Proteome Expression Changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Proteome Research* 2006; **5**:2339-47.
26. America AHP, Cordewener JHG: Comparative LC-MS: A landscape of peaks and valleys. *Proteomics* 2008; **8**:731-49.
27. Chang M, Leeman S, Niall H: Amino-acid Sequence of Substance P. *Nature New Biology* 1971; **232**:86-7.
28. Chang M, Leeman S: Isolation of a Sialogogic Peptide from Bovine Hypothalamic Tissue and Its Characterization as Substance P. *Journal of Biological Chemistry* 1970; **245**:4784-90.
29. Masahiro O, Yahiro U, Noriyuki T. Quality control material for plasma fibrinogen test produced from purified human fibrinogen. In: Hindawi Publishing Corporation; 2003.
30. Brew K, Castellino F, Vanaman T, Hill R: The Complete Amino Acid Sequence of Bovine α -Lactalbumin. *Journal of Biological Chemistry* 1970; **245**:4570-82.
31. Permyakov EA, Berliner LJ: [α]-Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters* 2000; **473**:269-74.
32. Wainwright M: Methylene blue derivatives: suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2000; **16**:381-94.
33. Butterfield DA, Lauderback CM: Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid [β]-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 2002; **32**:1050-60.
34. Ischiropoulos H, Beckman JS: Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association? *The Journal of Clinical Investigation* 2003; **111**:163-9.
35. Ceriello A, Motz E: Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**:816-23.
36. Wilkinson F, Helman WP, Ross AB: Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 1995; **24**:663-77.
37. Monroe B: *Singlet O₂* 1984; **Vol. I** 177-224.
38. Mirzaei H, Regnier F: Affinity Chromatographic Selection of Carbonylated Proteins Followed by Identification of Oxidation Sites Using Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 2005; **77**:2386-92.
39. Davies MJ: Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2004; **3**:17-25.

40. Davies MJ: Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; **305**:761-70.
41. Creasy DM, Cottrell JS: Unimod: Protein modifications for mass spectrometry. *Proteomics* 2004; **4**:1534-6.
42. Finch JW, Crouch RK, Knapp DR, Schey KL: Mass Spectrometric Identification of Modifications to Human Serum Albumin Treated with Hydrogen Peroxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993; **305**:595-9.
43. Guedes S, Vitorino R, Domingues R, Amado F, Domingues P: Oxidation of bovine serum albumin: identification of oxidation products and structural modifications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2009; **23**:2307-15.
44. Stasyk T, Huber LA: Zooming in: Fractionation strategies in proteomics. *Proteomics* 2004; **4**:3704-16.
45. Whiteaker JR, Zhang H, Eng JK, et al.: Head-to-Head Comparison of Serum Fractionation Techniques. *Journal of Proteome Research* 2006; **6**:828-36.
46. Cho H, Smalley DM, Theodorescu D, Ley K, Lee JK: Statistical identification of differentially labeled peptides from liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Proteomics* 2007; **7**:3681-92.
47. Silva JC, Denny R, Dorschel CA, et al.: Quantitative Proteomic Analysis by Accurate Mass Retention Time Pairs. *Analytical Chemistry* 2005; **77**:2187-200.
48. Roy SM, Anderle M, Lin H, Becker CH: Differential expression profiling of serum proteins and metabolites for biomarker discovery. *International Journal of Mass Spectrometry* 2004; **238**:163-71.
49. Higgs RE, Knierman MD, Gelfanova V, Butler JP, Hale JE: Comprehensive Label-Free Method for the Relative Quantification of Proteins from Biological Samples. *Journal of Proteome Research* 2005; **4**:1442-50.
50. Silva JC, Gorenstein MV, Li G-Z, Vissers JPC, Geromanos SJ: Absolute Quantification of Proteins by LCMSE. *Molecular & Cellular Proteomics* 2006; **5**:144-56.
51. Shen Y, Zhao R, Berger SJ, Anderson GA, Rodriguez N, Smith RD: High-Efficiency Nanoscale Liquid Chromatography Coupled On-Line with Mass Spectrometry Using Nano-electrospray Ionization for Proteomics. *Analytical Chemistry* 2002; **74**:4235-49.
52. Listgarten J, Emili A: Statistical and Computational Methods for Comparative Proteomic Profiling Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* 2005; **4**:419-34.
53. Zimmer JS, Monroe ME, Qian W, Smith RD: Advances in Proteomics Data Analysis and Display Using an Accurate Mass and Time Tag Approach. *Journal Name: Mass Spectrometry Reviews; Journal Volume: 25; Journal Issue: 3* 2006:Medium: X.
54. Du P, Sudha R, Prystowsky MB, Angeletti RH: Data reduction of isotope-resolved LC-MS spectra. *Bioinformatics* 2007; **23**:1394-400.
55. Fischer B, Grossmann J, Roth V, Gruissem W, Baginsky S, Buhmann JM: Semi-supervised LC/MS alignment for differential proteomics. *Bioinformatics* 2006; **22**:e132-e40.
56. Listgarten J, Neal RM, Roweis ST, Wong P, Emili A: Difference detection in LC-MS data for protein biomarker discovery. *Bioinformatics* 2007; **23**:e198-e204.
57. Hastings CA, Norton SM, Roy S: New algorithms for processing and peak detection in liquid chromatography/mass spectrometry data. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002; **16**:462-7.
58. Lange E, Gröpl C, Schulz-Trieglaff O, Leinenbach A, Huber C, Reinert K: A geometric approach for the alignment of liquid chromatography—mass spectrometry data. *Bioinformatics* 2007; **23**:i273-i81.
59. Prince JT, Marcotte EM: Chromatographic Alignment of ESI-LC-MS Proteomics Data Sets by Ordered Bijective Interpolated Warping. *Analytical Chemistry* 2006; **78**:6140-52.

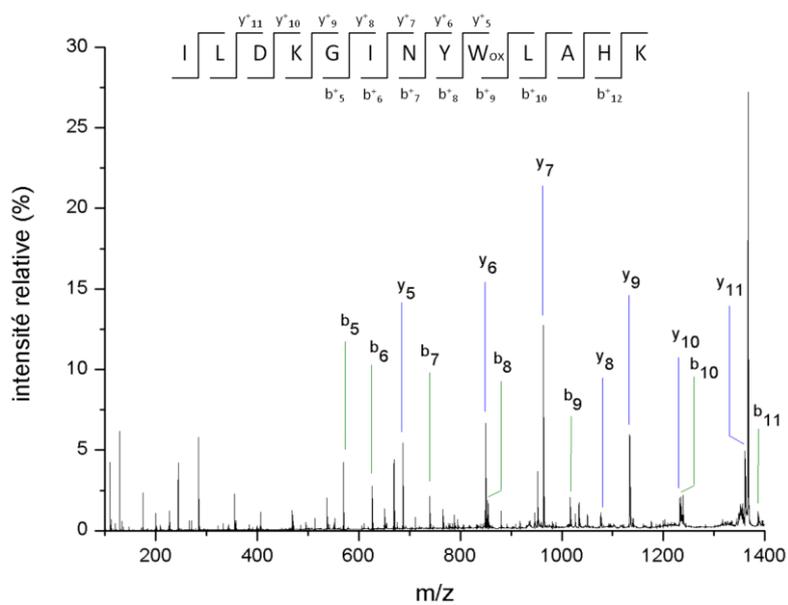
60. Wang P, Tang H, Fitzgibbon MP, et al.: A statistical method for chromatographic alignment of LC-MS data. *Biostatistics* 2007; **8**:357-67.
61. Zimmer JSD, Monroe ME, Qian W-J, Smith RD: Advances in proteomics data analysis and display using an accurate mass and time tag approach. *Mass Spectrometry Reviews* 2006; **25**:450-82.
62. America AHP, Cordewener JHG, van Geffen MHA, et al.: Alignment and statistical difference analysis of complex peptide data sets generated by multidimensional LC-MS. *Proteomics* 2006; **6**:641-53.
63. Weckwerth W, Wenzel K, Fiehn O: Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. *Proteomics* 2004; **4**:78-83.
64. Kemperman RFJ, Horvatovich PL, Hoekman B, Reijmers TH, Muskiet FAJ, Bischoff R: Comparative Urine Analysis by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry and Multivariate Statistics: Method Development, Evaluation, and Application to Proteinuria. *Journal of Proteome Research* 2006; **6**:194-206.
65. Olejnik S, Li J, Supattathum S, Huberty CJ: Multiple Testing and Statistical Power With Modified Bonferroni Procedures. *Journal of Educational and Behavioral Statistics* 1997; **22**:389-406.
66. Holm S: A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 1979; **6**:65-70.
67. Benjamini Y, Hochberg Y: Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 1995; **57**:289-300.
68. Goldberg AL: Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature (London, U K)* 2003; **426**:895-9.

Annexes

Annexe 2.1 : Spectre MS/MS de la substance P oxydée (MALDI-TOF/TOF).

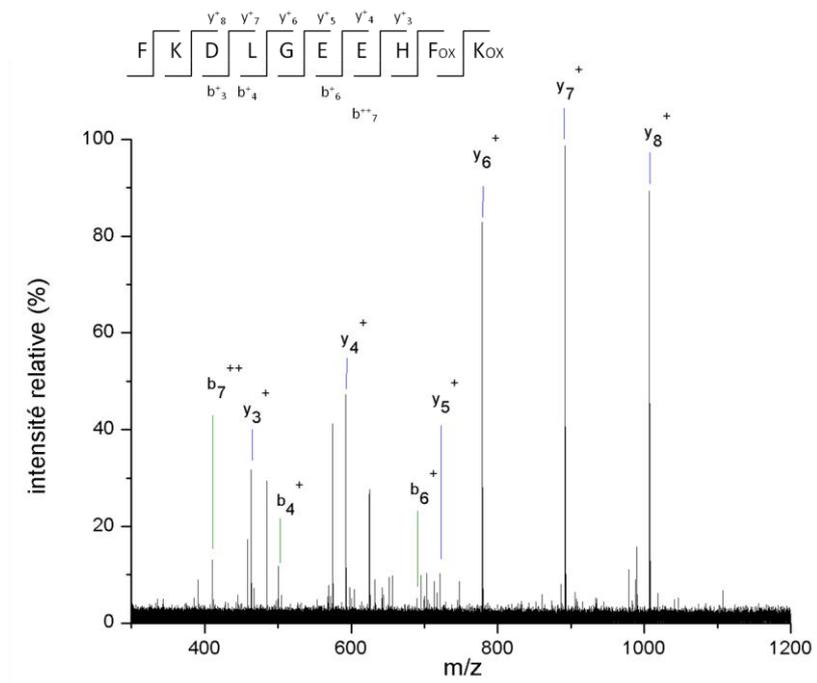


Annexe 2.2 : Spectre MS/MS du peptide 128-142 de l' α -lactalbumine avant traitement (MALDI-TOF/TOF).

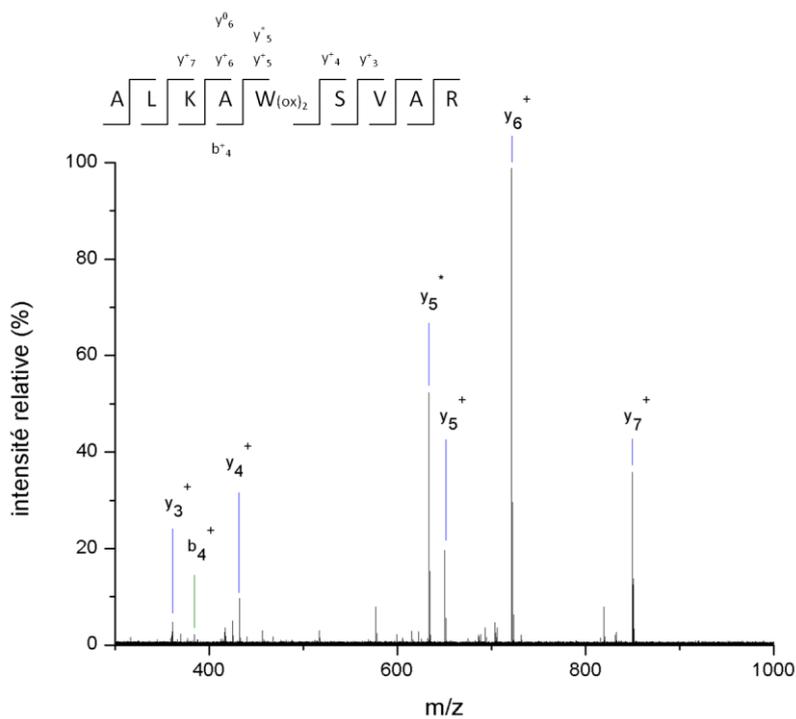


Chapitre 2

Annexe 2.3 : Spectre MS/MS du peptide 35-44 de la BSA, après traitement (FT-ICR MS). Les oxydations sont portées par les résidus F9 et K10.



Annexe 2.4 : Spectre MS/MS du peptide 233-241 oxydé de la BSA, après traitement (FT-ICR MS). La double oxydation est portée par les résidus W5.

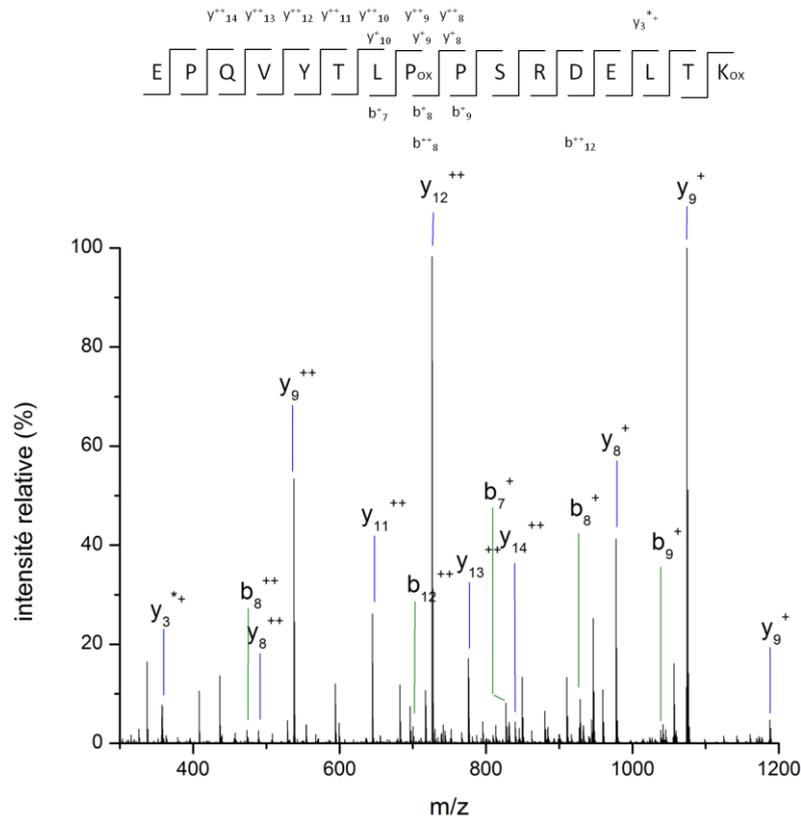


Annexe 2.6 : Les principaux logiciels développés pour l'alignement des analyses LC-MS (extrait de [26]).

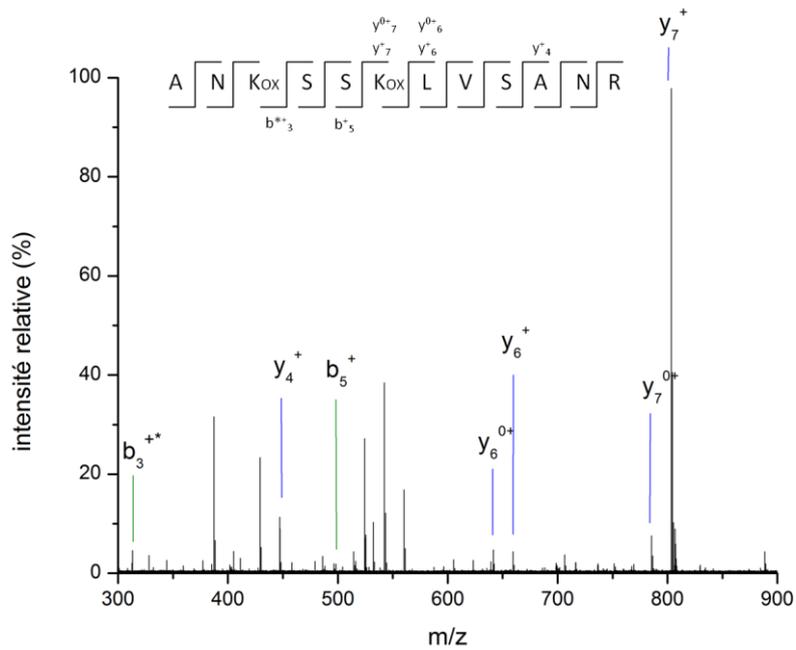
Software name	Supplier / author	Database/ environment	availability	Functionality
PLGS IdentityE Expression Informatics	Waters Corp	PLGS	commercial	f, h,i,b,a,r,s,l
SIEVE	Thermo Scientific	BioWorks	commercial	p,h,v,b,a,r,s,l
DeCyderMS	GE Healthcare		commercial	f,h,i,b,v,a,r,s,l
Rosetta Elucidator	Rosetta Biosoft-ware		commercial	f,h,i,b,v,a,r,s,l
MS-Xelerator	MsMetrix		commercial	f,l,i,b,a,r,s,
MassView	SurroMed		custom	f,l,i,b,a,r,s,l
MetAlign	WUR		free for acad.	p,l,b,a,s
MzMine	VTT Finland		open source	f,h,v,a,r
MSight	SIB		open source	f,h,i,v,(a)
MS Inspect	CPL (Fhrcr)	CPAS	open source	f,h,v,a,r (l,d)
SpecArray	ISB /SPC	TPP	open source	f,h,i,v,a,r,s
PePPER	BROAD MIT	Genepattern	open source	h,a,r,s,l
VIPER	PNNL	PRISM	open source	f,h,i,b,v,a,r,s,l,d
OpenMS	Berlin Saarland Tubingen Univ.	TOPP	open source	(f,h,i,b,v,a,r,s,l,d)
SuperHirn	IMSB @ETH	Corra	open source	f,i,b,v,a,r,s
CPM (continous profile models)	Listgarten/Emili	MatLab	free for acad.	l,a
Xalign	Purdue Univ	Xmass	upon request	(f,h),i,a,s
Fischer et.al.	ETH		not described	h,a
CRAWDAD	Washington Univ		upon request	f,l,i,a,r,s,l,d
CHAMS	Inst Pasteur, Paris		web server	h,a,s
OBI-WARP	Univ. Texas		open source	a,r,l
LCMSWARP	PNNL	PRISM	open source	h,a
LCMS2D	Albert Einstein College of Medicine			
PETAL	CPL (Fhrcr)	CPAS	open source	a

p/f: peak/feature detection; h/l: high/low resolution; i: de-isotoping; b: bat visualization; s: statistical analysis; l: link MS to MS/MS; d: results databas

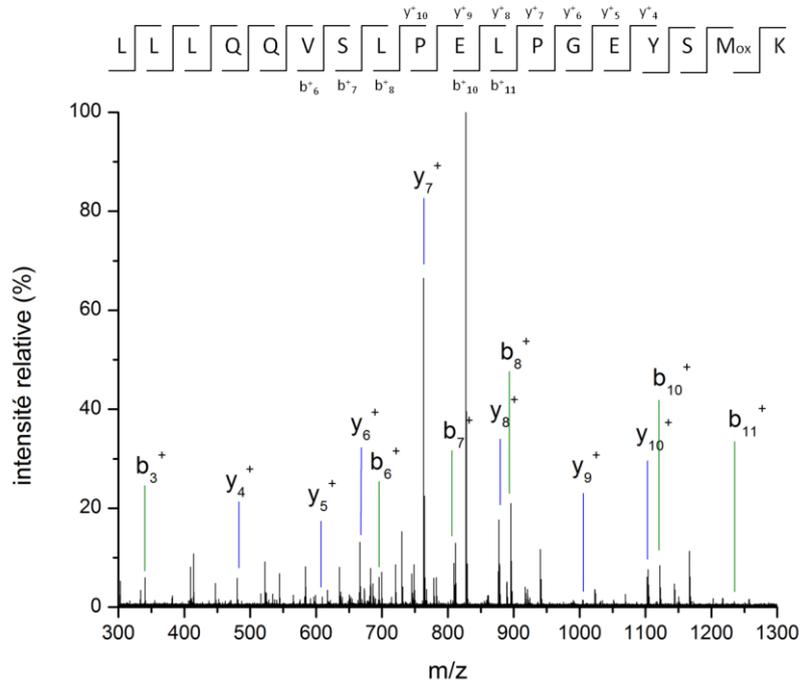
Annexe 2.6 : Spectre MS/MS correspondant au peptide EPQVYTLPPSRDELTK appartenant à l'immunoglobuline G (chaîne lourde), après traitement.



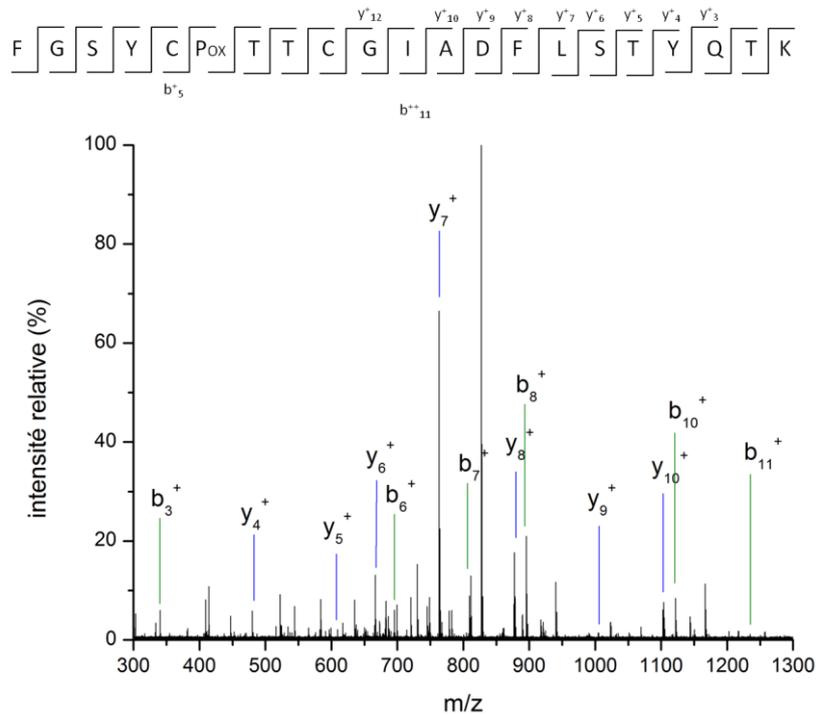
Annexe 2.7 : Spectre de MS/MS correspondant au peptide ANKSSKLVSANR oxydé de l'anti-thrombine III, après traitement.



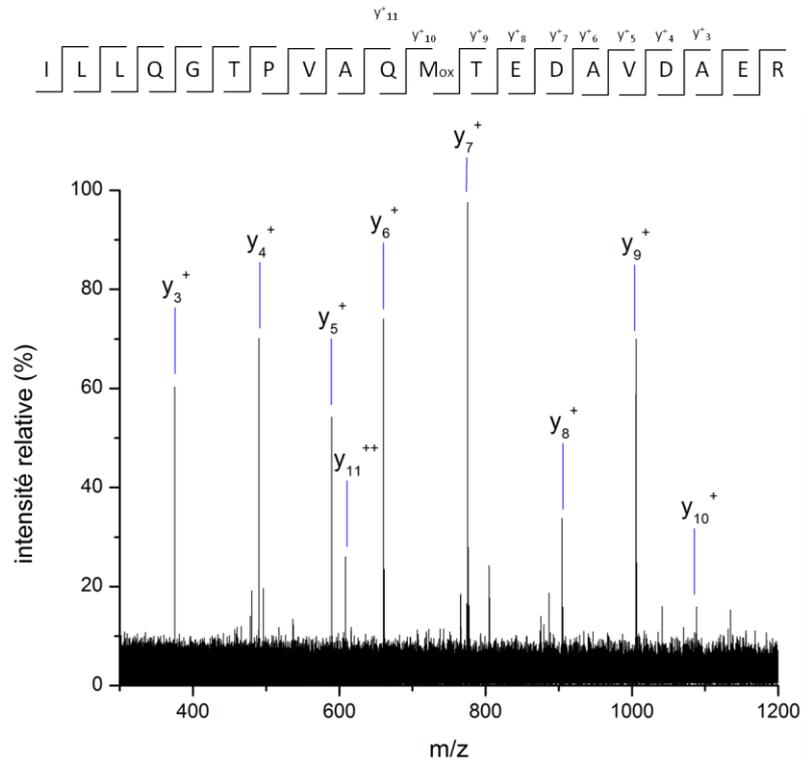
Annexe 2.8 : Spectre de MS/MS correspondant au peptide LLLQVSLPELPGEYYS_{ox}K oxydé de l'alpha-2-macroglobuline, après traitement.



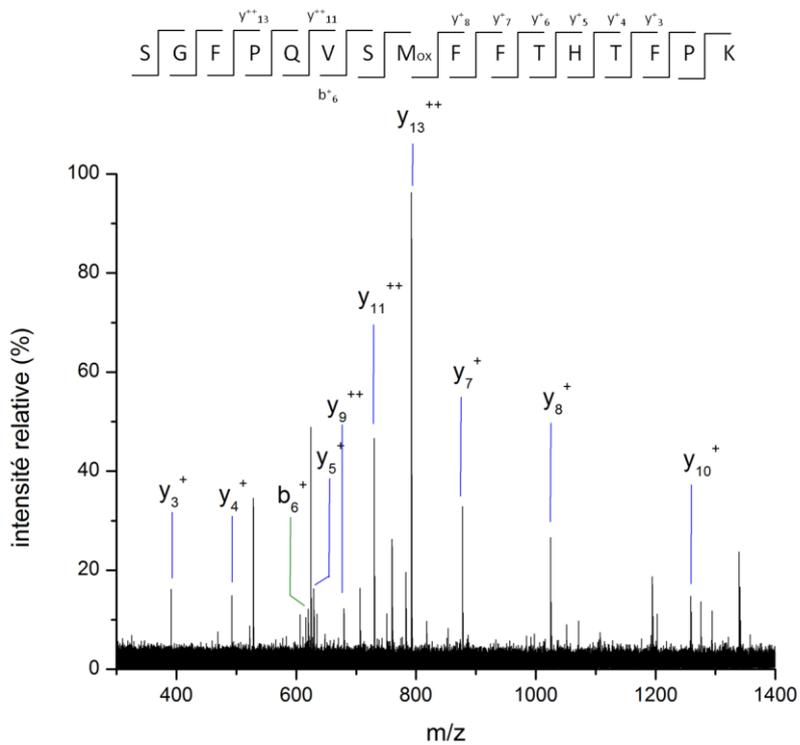
Annexe 2.7 : Spectre de MS/MS correspondant au peptide FSGYCPTTCGIADFLSTYQTK oxydé de la chaîne gamma du fibrinogène, après traitement.



Annexe 2.10 : Spectre de MS/MS correspondant au peptide ILLQGTPVAQMoxTEDAVDEAR oxydé du complément C3, après traitement.



Annexe 2.11: Spectre de MS/Ms correspondant au peptide SGFPQVSMFFHTHFPK oxydé de la glycoprotéine riche en histidine, après traitement.



Chapitre 3

Etude de l'impact du traitement au bleu de méthylène sur le fibrinogène

Sommaire

1	Le fibrinogène.....	158
1.1	Sa structure	158
1.2	Physiologie de l'hémostase	160
1.3	La cascade de coagulation	162
1.3.1	Son déroulement.....	162
1.3.2	Le fibrinogène et la fibrine.....	162
1.4	Purification du fibrinogène.....	164
1.4.1	Par précipitation	164
1.4.2	Chromatographique liquide.....	165
1.5	La chromatographie d'interaction hydrophobe	167
1.5.1	Généralités.....	167
1.5.2	HIC et approche par hydrophobicité critique.....	168
1.5.3	CHIC et fibrinogène	169
1.6	La chromatographie d'échange ionique	170
1.6.1	Principe.....	171
1.6.2	Les échangeurs ioniques.....	171
1.6.3	L'effet du pH et des sels.....	172
1.6.4	IEX et purification de protéines plasmatiques	174
2	Purification du fibrinogène	175
2.1	Purification par HIC	175
2.2	Purification par IEX.....	177
2.2.1	Validation de la purification.....	180
3	Impact du traitement au bleu de méthylène sur le fibrinogène.....	182
3.1	Etude des modifications induites par le traitement au bleu de méthylène.....	182
3.1.1	Sur le fibrinogène	182

Chapitre 3

3.2	Etude de la formation du caillot	185
3.2.1	Suivi UV cinétique	186
3.2.2	Les fibrinopeptides : LC-MS.....	187
3.2.3	Analyse FT-ICR du caillot de fibrine.....	189
4	Discussion & Conclusion	190

Bibliographie - Annexes

Table des figures

Figure 3.1 : Stratégie mise en place pour l'étude de l'impact du traitement photochimique d'inactivation des pathogènes par le bleu de méthylène sur le fibrinogène. 158

Figure 3.2 : Schéma illustrant les ponts disulfures intra- et inter-chaînes dans le fibrinogène [7] 159

Figure 3.3 : Structure 3D des fragments D du fibrinogène (en jaune : chaîne α , en vert : β , en bleu : chaîne γ), d'après [9] 160

Figure 3.4 : La cascade de coagulation 161

Figure 3.5 : Schéma de la fibrinolyse 161

Figure 3.6 : Schéma illustrant la fibrinoformation 163

Figure 3.7 : Formation d'une liaison isopeptidique, catalysée par le FXIII. De façon générale, ce type de liaison se forme entre les fonctions « acide carboxylique » et « groupe amine » de chaînes latérales 164

Figure 3.8 : Sigmoïdes des concentrations surfaciques des résidus immobilisés pour une série d'homologues alkyles (Seph-C4 (bleu), Seph-C5 (vert), Seph-C6 (rouge)) pour définir le point d'hydrophobicité critique (flèche noire) pour l'adsorption d'un mg de fibrinogène (d'après [32]) 170

Figure 3.9 : Effet du pH sur la sélectivité de l'élution des protéines 173

Figure 3.10 : Profil chromatographique d'un échantillon de plasma sur Seph-C5. par HIC.. 175

Figure 3.11 : Gel 1D réalisé en conditions non-dénaturantes sur les fractions B14 à C4 après HIC. Identification des bandes par MALDI-TOF MS 176

Figure 3.12 : A gauche, profil chromatographique de l'élution d'un échantillon de plasma sur DEAE ; à droite, gel 1D (10% T) en conditions dénaturantes des fractions 1 à 3 de l'éluat (piste 1 : marqueurs, piste 2 : plasma ; piste 3 : fraction 1 ; piste 4 : fraction 2 ; piste 5 : fraction 3) 178

Figure 3.13 : Gels 1D de la fraction I du procédé fractionnement de Cohn 179

Figure 3.14: Purification de la fraction de Cohn I, par DEAE en utilisant un gradient croissant de sel et un gradient décroissant de pH. 179

Figure 3.15 : Suivi de la purification effectuée sur DEAE par gradient de sel et de pH. A gauche : gel 1D en conditions non-dénaturantes. A droite : gel 1D en conditions SDS-PAGE. 180

Figure 3.16 : Résultat de l'interrogation MASCOT sur les échantillons de fibrinogène purifié, digérés en solution et analysés par nanoLC-nanoESI-FT-ICR MS. A gauche : fibrinogène

purifié à partir du plasma non-traité. A droite et encadré : le fibrinogène purifié à partir du plasma après traitement BM/lumière visible.....	183
Figure 3.17 : Changement induit par (a) la citrullination sur l'arginine et par (b) par carbamylation sur la lysine.....	184
Figure 3.18 : Stratégie analytique pour l'étude de la fibrinoformation	186
Figure 3.19 : Suivi turbidimétrique (340 nm) de la fibrinoformation	187
Figure 3.20 : Analyse LC-MS/MS du surnageant après conversion du fibrinogène en fibrine (en rouge : fibrinogène issu du plasma non-traité ; en bleu : fibrinogène issu du plasma traité au BM/lumière visible) et identification des fibrinopeptides et de leurs fragments	188
Figure 3.21 : Quantité relative des fibrinopeptides (bleu = non traité ; rouge = traité), à partir de l'intégration des appels d'ions correspondant à chaque fibrinopeptides identifiées).....	189

Tables des annexes

Annexe 3.1 : Les facteurs de coagulation	200
Annexe 3.2 : PMF correspondant à l'albumine, après purification par HIC, électrophorèse 1D en conditions non-dénaturantes, digestion en gel et analyse parMALDI-TOF MS (les flèches bleues correspondent aux pics d'autolyse de la trypsine)	201
Annexe 3.3 : PMF correspondant à l'apolipoprotéine B, après purification par HIC, électrophorèse 1D en conditions non-dénaturantes, digestion en gel et analyse parMALDI-TOF MS (les flèches bleues correspondent aux pics d'autolyse de la trypsine).....	201
Annexe 3.4 : PMF correspondant à l'apolipoprotéine A4, après purification par HIC, électrophorèse 1D en conditions non-dénaturantes, digestion en gel et analyse parMALDI-TOF MS (les flèches bleues correspondent aux pics d'autolyse de la trypsine).....	202
Annexe 5 : PMF correspondant au fibrinogène, après purification par HIC, électrophorèse 1D en conditions non-dénaturantes, digestion en gel et analyse parMALDI-TOF MS (les flèches bleues correspondent aux pics d'autolyse de la trypsine)	202
Annexe 3.6 : Identification des trois sous-unités à partir de la fraction A1 de l'élution de la fraction Cohn I sur DEAE (Gradient pH et gradient de sel),	203
Annexe 3.7 : Recouvrement de séquence pour chaque sous-unité de fibrinogène, après analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS et interrogation MASCOT à partir de Swissprot.....	204

Chapitre 3

Annexe 3.8 : Spectre MS/MS du peptide MGPTELLIEMEDWKGDKVK (sous-unité bêta) présentant une oxydation sur un résidu Met.....	205
Annexe 3.9 : Spectre MS/MS du peptide NYCGLPGEYWLGNDKISQLTR (sous-unité bêta) présentant une oxydation sur un résidu Pro.	205
Annexe 3.10 : Spectre MS/MS du peptide KGGETSEMYLIQPDSSVKPYR (sous-unité bêta) présentant une oxydation sur un résidu Met.....	206
Annexe 11 : Spectre MS/MS du peptide MELERPGGNEITR (sous-unité alpha) présentant une déamidation sur un résidu Asp.	206
Annexe 3.12 : Spectre MS/MS du peptide KMLEEIRMKYEASILTHDSSIR (sous-unité gamma) présentant une oxydation sur un résidu Met.	207
Annexe 3.13 : Spectre MS/MS du peptide AILQLTYNPDESSKPNMIDAATLK (sous-unité gamma) présentant une oxydation sur un résidu Met.	207
Annexe 3.14 : Spectre MS/MS du peptide GSESGIFTNTKESSSHHPGIAEFPSR (sous-unité alpha) présentant une oxydation sur un résidu Pro.	208
Annexe 3.15 : Spectre MS/MS du peptide ALTDMPQMR (sous-unité alpha) présentant une oxydation sur un résidu Met.....	208
Annexe 3.16 : Spectre MS/MS du peptide VELEDNNGR (sous-unité gamma) présentant une citrullination sur un résidu Arg.	209
Annexe 3.17 : Spectre MS/MS du peptide YYWGGQYTWDMAK (sous-unité gamma) présentant une oxydation sur un résidu Lys.	209
Annexe 3.18 : Spectre MS/MS du peptide MKPVPDLVPGNFKPSQLQK (sous-unité gamma) présentant une oxydation sur un résidu Met.	210
Annexe 3.19: Identification des fibrinopeptides présents dans le surnageant après la formation du caillot de fibrine.	211
Annexe 3.20 : Spectre MS/MS du peptide MELERPGGNEITR (sous-unité alpha) présentant une déamidation sur un résidu Asp.	212
Annexe 3.21 : Spectre MS/MS du peptide NSLFEYKQKNNKDSHSLTTNIMEILR (sous-unité alpha) présentant une déamidation un résidu Asp.....	213
Annexe 3.22 : Spectre MS/MS du peptide TFPGFFSPMGEFFVSETESR (sous-unité alpha) présentant une oxydation sur un résidu Met.....	213
Annexe 3.23 : Spectre MS/MS du peptide VELERDWNGRTSSTADYAMFK (sous-unité gamma) présentant une déamidation sur un résidu Asp.....	214

Chapitre 3

Annexe 3.24 : Spectre MS/MS du peptide KMLEEIRMKYEASILTHDSSIR (sous-unité gamma) présentant une oxydation sur un résidu Met.	214
Annexe 3.25 : Spectre MS/MS du peptide NYCGLPGEYWLGNDKISQLTR (sous-unité bêta) présentant une oxydation sur un résidu Pro et Trp.....	215
Annexe 3.26 : Spectre MS/MS du peptide NYCGLPGEYWLGNDKISQLTR (sous-unité bêta) présentant une oxydation sur un résidu Met et Pro.	215

Chapitre 3

Etude de l'impact du traitement au bleu de méthylène sur le fibrinogène

Le traitement au bleu de méthylène est le traitement d'inactivation des pathogènes le plus utilisé en France. Des tests biologiques, dans le cadre de la validation de ce traitement, ont souligné une perte d'activité de plusieurs protéines, en particulier celle du fibrinogène [1, 2], sans toutefois en expliquer la cause.

L'objectif de cette étude est donc de faire le lien entre les modifications induites sur le fibrinogène et le traitement au bleu de méthylène. Afin d'établir notre stratégie analytique, il a fallu tout d'abord étudier le fibrinogène, sa structure et son rôle, afin de comprendre son implication dans la physiologie de l'hémostase et les répercussions sur sa structure.

Ainsi, compte tenu de la complexité du plasma en termes de composition et de la spécificité de cette étude, nous avons cherché à mettre en place une stratégie de purification du fibrinogène, à partir d'une étude bibliographique des purifications existantes du fibrinogène.

Ensuite, nous avons procédé à l'analyse protéomique du fibrinogène purifié par nanoLC-nanoESI FT-ICR MS. Nous nous sommes également intéressés à l'analyse des fibrinopeptides et du caillot de fibrine. Enfin, nous avons étendu notre étude par un suivi de la cinétique de formation de la fibrine. La figure 3.1 présente la stratégie analytique mise en place:

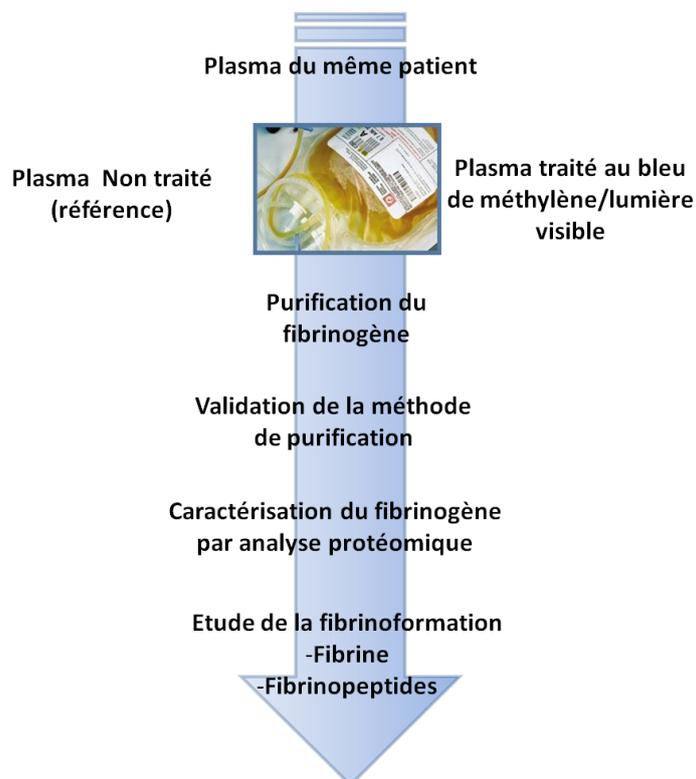


Figure 3.1 : Stratégie mise en place pour l'étude de l'impact du traitement photochimique d'inactivation des pathogènes par le bleu de méthylène sur le fibrinogène.

1 Le fibrinogène

1.1 Sa structure

Le fibrinogène est une glycoprotéine synthétisée et sécrétée par le foie. Sa concentration plasmatique peut osciller entre 2 et 4 g/L.

Le fibrinogène est une protéine longue de 45 nm qui se présente sous la forme d'un homodimère composé de trois chaînes non-identiques : $A\alpha$ (610 acides aminés), $B\beta$ (461 acides aminés) et γ (411 acides aminés) [3]. La forme la plus courante présente une masse moléculaire de 340 kDa ($\alpha = 70$ kDa, $\beta = 52$ kDa et $\gamma = 48$ kDa). Une forme à 420 kDa a été décrite où les chaînes α sont remplacées par des chaînes α plus longues (831 acides aminés), notées αE [4]. La fréquence d'occurrence de cette forme est donnée pour une molécule de Fib420 pour 100 molécules de Fib340. Il existe également un variant de la chaîne γ , noté γ' , issu d'un processus alternatif de la transcription de l'ARNm primaire [5]. Cette chaîne γ' représente 8% des chaînes γ et est principalement trouvée dans la forme hétérodimérique des molécules de fibrinogène, soit 15% du fibrinogène plasmatique. Les formes homodimériques $\gamma'\gamma'$ représentent moins de 1% de fibrinogène circulant.

La cohésion de la structure de cet édifice protéique est principalement assurée par 29 ponts disulfures inter- et intra-chaînes (figure 3.2) [6, 7]. On compte des ponts inter-chaînes symétriques situés entre $A\alpha$ Cys28- $A\alpha$ Cys28, $A\alpha$ Cys36- $B\beta$ 65 et γ 8- γ 9. Ce dernier étant réciproque, il est supposé responsable de l'orientation antiparallèle des chaînes [8]. Les autres sont situés entre $A\alpha$ Cys49- $B\beta$ Cys76, $A\alpha$ Cys165- $B\beta$ Cys193, $A\alpha$ Cys45- γ 23 et $A\alpha$ Cys161- γ 139. Plus nombreux, les ponts intra-chaînes décrivent des « boucles » [8]. Quelques études ont souligné l'importance des ponts disulfures intra-chaînes dans le processus de l'assemblage et de la sécrétion du fibrinogène [6].

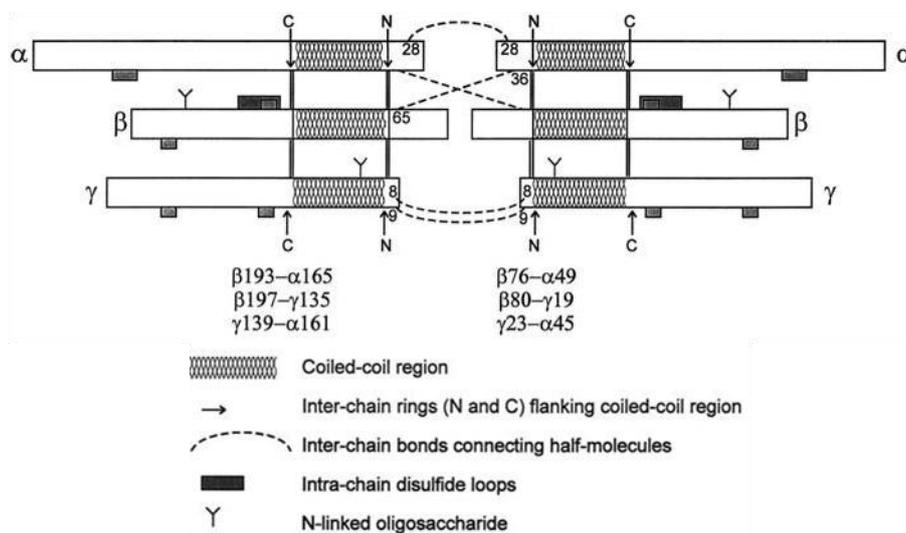


Figure 3.2 : Schéma illustrant les ponts disulfures intra- et inter-chaînes dans le fibrinogène [7]

Ces ponts disulfures confèrent à cette protéine une forme de fibre comportant trois globules : un central (domaine E), et deux distaux (domaines D). Le domaine E contient les cotés N-terminaux des six chaînes polypeptidiques. Il comprend également les sites d'ancrage de la thrombine abritant les fibrinopeptides A et B. Les domaines D (figure 3.3) sont formés par les domaines C globulaires des cotés COOH-terminaux des chaînes $B\beta$ et γ . Le côté globulaire COOH terminal des chaînes $A\alpha$ est plus volumineux, contribuant à la structure du domaine central par un repliement vers l'intérieur. Les domaines E et D sont reliés entre eux par un segment super-hélicoïdal (type α) long d'environ 111 acides aminés.

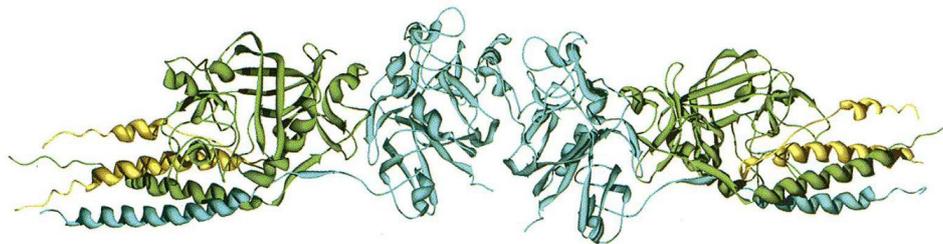


Figure 3.3 : Structure 3D des fragments D du fibrinogène (en jaune : chaîne α , en vert : β , en bleu : chaîne γ), d'après [9]

1.2 Physiologie de l'hémostase

Lorsque le système vasculaire est lésé, une série de processus cellulaires et biochimiques se mettent en place afin d'obturer la brèche et d'assurer le contrôle de l'hémorragie. Ce mécanisme vital de défense est appelé « l'hémostase ». L'hémostase comprend trois phases interdépendantes : (i) l'hémostase primaire qui correspond à l'agrégation plaquettaire, (ii) l'hémostase secondaire qui consiste en la coagulation plasmatique, et (iii) la fibrinolyse qui correspond à la lyse du caillot.

L'hémostase primaire est la première étape d'urgence du contrôle hémorragique conduisant au thrombus plaquettaire. Elle se déroule selon quatre phases : la vasoconstriction, l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium, l'activation métabolique des plaquettes et enfin, l'agrégation des plaquettes entre elles aboutissant au clou plaquettaire.

L'hémostase secondaire sert à consolider le thrombus plaquettaire par la formation d'un réseau protéique de fibrine. Elle aboutit à la formation du thrombus fibrinoplaquettaire, réseau de fibrine enserrant le clou plaquettaire. Ce processus s'effectue par le biais d'une série de réactions enzymatiques, appelée « cascade de coagulation » (Figure 3.4), dont le contrôle continu permet une réponse locale, sans diffusion au-delà de la zone de lésion. La partie 1.3 revient plus en détails sur cette étape.

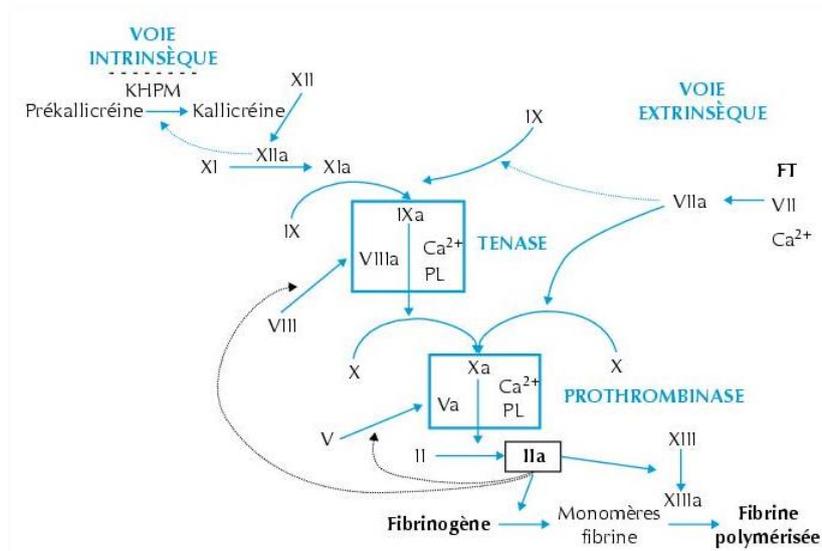


Figure 3.4 : La cascade de coagulation

Lorsque l'hémostase est terminée, il est nécessaire d'éliminer le caillot mais également de prévenir son extension afin d'éviter l'occlusion de la lumière vasculaire. La fibrinolyse est un processus physiologique permettant la dissolution progressive du caillot de fibrine. Le système fibrinolytique comprend des molécules dont l'activité protéolytique est contrôlée par un système d'activateurs et d'inhibiteurs permettant une régulation fine du processus. L'enzyme centrale est la plasmine ; elle provient d'un précurseur plasmatique inactif, le plasminogène. Celui-ci possède une grande affinité pour la fibrine, et s'y fixe avant d'être clivé en plasmine, par l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) ou l'urokinase (uPA). La plasmine clive la fibrine en différents fragments, les produits de dégradation de la fibrine et les D-dimères ; ceux-ci sont ensuite transportés dans le plasma jusqu'au foie où ils sont épurés par les macrophages (figure 3.5).

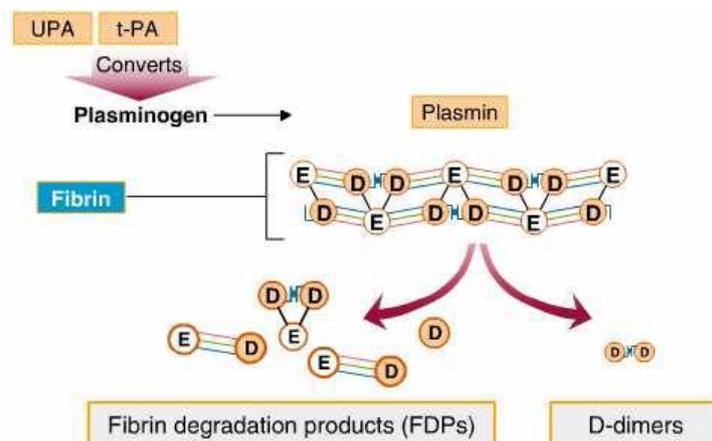


Figure 3.5 : Schéma de la fibrinolyse

1.3 La cascade de coagulation

1.3.1 Son déroulement

La cascade de la coagulation sanguine (figure 3.4) implique une série de réactions enzymatiques dans lesquelles un facteur de coagulation inactif est converti en une forme active, qui active ensuite le facteur de coagulation suivant. Les facteurs de coagulation sont désignés par des numéros allant de I à XIII. A l'exception du FXIII qui intervient dans la dernière étape, les autres facteurs interviennent dans l'ordre inverse de leur numérotation : ainsi le FXIIa initie la coagulation, et le FIIa la termine.

Le but final de la cascade de coagulation est la génération de thrombine, l'enzyme-clé permettant la transformation du fibrinogène en fibrine. Il existe deux voies d'activation aboutissant à la production de thrombine : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque, qui débouchent sur une voie commune finale. La voie intrinsèque comporte les facteurs présents dans la circulation, tandis que la voie extrinsèque repose sur les facteurs tissulaires absents normalement dans la circulation mais qui sont libérés lors d'une lésion vasculaire. L'annexe 3.1 présente les différents facteurs de coagulation et leurs principales caractéristiques. Le FXa est le carrefour de rencontre de ces deux voies.

Les premières étapes de la coagulation allant de l'activation du FXII à la formation du FX durent plusieurs minutes, alors que la transformation de la prothrombine FII en thrombine FIIa ainsi que la conversion du fibrinogène en fibrine ne durent que quelques secondes.

Le FXa, avec son cofacteur FVa, les phospholipides et le Ca^{2+} , forment le complexe pro-thrombinase qui convertit la prothrombine en thrombine. A partir de cette étape, on parle de voie commune qui transforme le fibrinogène en monomères de fibrine instables. Le FXIIIa, activé par la thrombine, forme des liaisons covalentes entre les monomères de fibrine, ce qui renforce le réseau de fibrine enserrant le clou plaquettaire.

Enfin, il existe également des boucles de rétro-activations de la thrombine qui lui permettent de réguler sa propre génération par activation du FVIII, du FV et des plaquettes, impliqués respectivement dans les complexes ténase intrinsèques et prothrombinases.

1.3.2 Le fibrinogène et la fibrine

Le fibrinogène est donc au centre de la cascade de coagulation ; il est responsable de la formation du caillot sous l'effet de la thrombine (FIIa) qui le transforme en fibrine (FIIa). Le fibrinogène se lie sur l'exosite de la thrombine par les résidus 27-50 de la chaîne A α , 15-42 de

la B β et 8-23 de la chaîne γ . Brièvement, la thrombine clive la partie N-terminale des chaînes A α (Arg16-Gly17) et B β (Arg15-Gly16) libérant les fibrinopeptides A (15 résidus) et B (14 résidus) dans le nodule central E pour former un monomère de fibrine [10] comme l'illustre la figure 3.6.

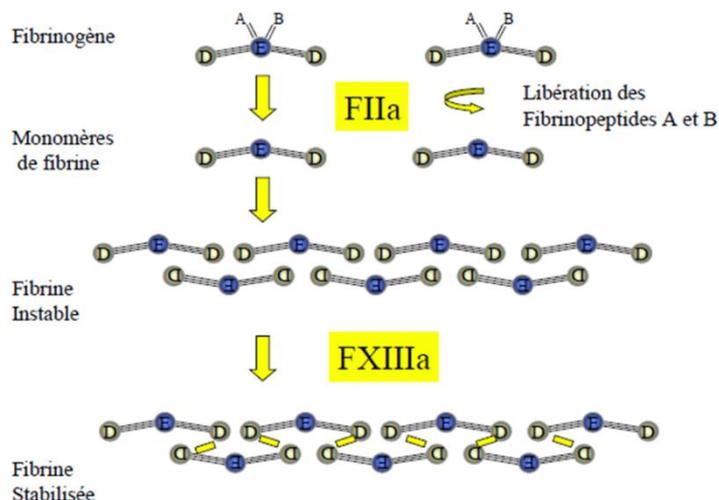


Figure 3.6 : Schéma illustrant la fibrinoformation

Rapidement, des protofibrilles (fibres naissantes) apparaissent puis évoluent ensemble jusqu'à la formation d'un caillot souple. Ce dernier subit ensuite plusieurs réticulations (ou « cross-links ») pour se consolider [9] :

- Une réticulation entre la région de la chaîne α au niveau des résidus Gly17-Arg19 et la région de la chaîne γ au niveau des résidus Thr374-Glu396,
- Une autre réticulation entre la région de la chaîne β au niveau des résidus Gly15-Arg17 et un monomère de fibrine adjacent,
- Des liaisons isopeptidiques (figure 3.7) entre des chaînes α (les résidus Gln328 et 366, Lys508, 539, 556, 562 et 580 ont été identifiés comme des sites impliqués), ainsi qu'une autre liaison isopeptidique entre des résidus Gln398 et Lys406 de deux chaînes γ . La formation de ces liaisons est catalysée par le FXIIIa, qui agit alors comme une transglutaminase.

Cette réticulation de la fibrine par le FXIIIa conduit à un caillot de fibrine à la fois chimiquement et mécaniquement stable. Les liaisons isopeptidiques ainsi formées conduisent à des dimères γ - γ , des hétérodimères α - γ , des chaînes polymériques issues de chaîne α et des multimères de chaînes γ . Enfin, le FXIIIa catalyse également la formation d'une liaison

isopeptidique entre le résidu Lys303 de la chaîne α de la fibrine et le résidu Gln2 de l' α 2-antiplasmine, pour protéger la fibrine d'une dégradation prématurée par l'action de la plasmine.

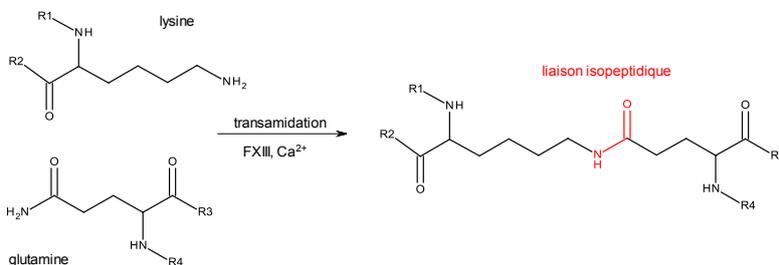


Figure 3.7 : Formation d'une liaison isopeptidique, catalysée par le FXIII. De façon générale, ce type de liaison se forme entre les fonctions « acide carboxylique » et « groupe amine » de chaînes latérales.

1.4 Purification du fibrinogène

La complexité du plasma en termes de composition impose qu'une étape de purification du fibrinogène soit mise en place.

Nous avons montré que le fibrinogène se présentait sous la forme d'un édifice protéique dont il est indispensable de préserver la structure afin d'évaluer l'impact du traitement au bleu de méthylène. Ainsi, il est impératif que la méthode de purification comporte un minimum d'étapes en termes de manipulation d'échantillon. De plus, elle devra se dérouler dans des conditions les moins dénaturantes possibles. Depuis plus d'un siècle, la purification du fibrinogène a fait l'objet de nombreuses publications et différentes stratégies ont été mises en place.

1.4.1 Par précipitation

Le procédé historique de fractionnement du plasma a été décrit par Cohn au cours de la seconde guerre mondiale pour la production d'albumine [11-13]. Il s'agit d'une purification en plusieurs étapes basée sur la précipitation séquentielle de protéines à partir de plasma. Ce procédé s'appuie sur la solubilité différentielle des protéines plasmatiques principalement selon des conditions de pH, de concentration d'éthanol, de force ionique et de température. A chaque étape, le précipité obtenu constitue une « fraction ». Chaque fraction est caractérisée par un numéro servant à qualifier la composition du précipité recueilli. Le fibrinogène se trouve enrichi dans la fraction I [14] tandis que le dernier précipité (ou fraction V) contient l'albumine pure. Les conditions de précipitation pour obtenir la fraction I utilisent 8%

d'éthanol et le pH du plasma a été préalablement ajusté à 7,2. La précipitation s'effectue à -3 °C. Ainsi, entre 65 et 80 % de fibrinogène pur pouvait être produit par cette approche [13, 15].

En 1956, Blombäck a proposé une méthode par précipitation en deux grandes étapes [16]: la précipitation de Cohn (fraction I) suivie d'une précipitation à la glycine dans un tampon citrate à pH 6,35. Cette approche a été développée dans le cadre de la purification du fibrinogène à partir de plasma bovin et humain. Chez l'être humain, cette méthode permet un rendement entre 65 et 75 %, présentant une activité coagulante entre 98 et 100 %.

Dans le même temps, en 1955, Kekwick a publié une méthode proche de celle décrite par Cohn. Inspirée par les travaux de McFarlane qui utilisait l'éther pour délipider le plasma (ou le sérum) [17], son approche consistait en l'utilisation de l'éther dans des conditions de pH, de force ionique et de température données [18, 19]. Parmi toutes les conditions testées, il est ressorti qu'en présence de 11 % d'éther à 0°C pendant 16h, le précipité recueilli contenait près 90% de fibrinogène.

D'autres méthodes de purification par précipitation ont été développées en utilisant des acides aminés. La plus utilisée est celle décrite par Kazal où le fibrinogène humain pouvait être complètement précipité par une solution saturée en glycine [20]. A partir de cette constatation, Mosesson a publié une nouvelle méthode permettant d'aboutir à un fibrinogène avec des propriétés de solubilisation élevée [21]. Cette précipitation utilise une solution de glycine à 2,1 M à 5°C. Le précipité est re-suspendu dans une solution contenant 0,15 M NaCl, et 0,01 M phosphate de sodium (pH 6,4) puis re-précipité avec une solution de glycine (mêmes conditions). A ce stade, le fibrinogène contenu dans le surnageant est enfin précipité par addition de 8 % puis 16% d'éthanol à -2°C. Cette étape permet d'obtenir un fibrinogène avec une activité de coagulation supérieure à 98 %.

Par ailleurs, il a été montré qu'il était possible d'utiliser la précipitation du fibrinogène à l'aide de bêta-alanine [22], ou encore d'héparine [23], d'un streptocoque [24]. Toutefois, les méthodes décrites précédemment sont de loin les plus utilisées.

1.4.2 Chromatographique liquide

De nombreux exemples basés sur la chromatographie liquide sont décrits dans la littérature, et couvrent quasiment tous les modes de chromatographie liquide.

Plusieurs ligands ont été ainsi proposés pour mettre en place des chromatographies d'affinité. Par exemple, en 1975, Matthias est parvenu à isoler du fibrinogène en greffant un

monomère de fibrine ou de fibrinogène insoluble sur une phase d'agarose [25]. Une autre phase stationnaire a été préparée par Suzuki en greffant de la ristocétine, un antibiotique connu pour interagir avec le fibrinogène [26]. Après élution en présence de 8 M d'urée, le fibrinogène obtenu possède une activité coagulante de 95%.

Un peu plus tard, une autre voie de chromatographie d'affinité a vu le jour, en s'appuyant sur des banques de peptides qui servent alors de ligands. Ainsi, Kuyas a décrit une procédure d'isolement utilisant le peptide Gly-Pro-Arg-Pro-Lys greffé sur une phase d'agarose [27]. Dans ces conditions, le fibrinogène est élué par une solution de 0,1 M d'acétate (pH 4,5) additionnée de 2 M d'urée, puis dialysé contre une solution contenant 0,05 M de Tris et 0,1 M de NaCl (pH 7,4). L'activité biologique est maintenue à plus de 90 %.

Sur le même principe, Kaufman [28] a montré qu'il était possible d'isoler le fibrinogène à partir du peptide Phe-Leu-Leu-Val-Pro-Leu. Les caractéristiques thermodynamiques de l'interaction ont été décrites (isothermes de Langmuir, calorimétrie, capacité de greffage, concentration surfacique du greffage). Les interactions mises en jeu sont alors principalement de natures hydrophobes et ioniques.

Plus récemment, Liu a suggéré une nouvelle approche de chromatographie d'affinité en immobilisant le segment appartenant au facteur de surface A (ClfA) de *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré). Le segment, compris entre les résidus 221 et 550 de la séquence de ClfA, interagit avec la chaîne gamma du fibrinogène (côté C-terminal). L'élution se fait avec une solution de citrate à 50 mM, pH 5,6. Cette voie de purification a permis l'isolement de fibrinogène de rat, de souris et humain.

On retrouve également dans la littérature des exemples de chromatographie d'échange ionique. On peut citer par exemple les travaux de Liu, qui ont montré une séparation sur une phase échangeuse d'anions en utilisant un gradient de pH pour l'élution de fibrinogène natif en présence d'un tampon phosphate additionné de diéthanolamine [29].

Par ailleurs, il est également possible de trouver des approches de purifications incluant précipitation et chromatographie liquide. En effet, l'approche décrite par Masahiro utilise successivement un fractionnement de Cohn à l'éthanol (Fraction I), une précipitation à la glycine et au NaCl puis une chromatographie d'affinité sur Sepharose-Lysine [30]. Dans ces conditions, un fibrinogène dont l'activité est préservée à 95% est obtenu. Une autre méthode s'inscrivant dans le cadre d'une étude sur la structure cristalline du fibrinogène [31] combine la précipitation à l'éthanol (Fraction I de Cohn) et une étape de chromatographie d'échange anionique sur DEAE.

Enfin, un mode encore peu utilisé pour la purification des protéines, la chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC) peut se révéler intéressante. Contrairement à la chromatographie d'affinité, ce mode chromatographique n'utilise pas de solvant pour l'élution préservant ainsi la structure des complexes protéiques. Jennissen a développé une approche permettant de purifier du fibrinogène à partir de plasma en une seule étape [32]. Cette séparation utilise une phase Sepharose-C5 (n-pentyl amine greffée sur Sepharose) dans des conditions d'hydrophobicité critique permettant une grande spécificité vis-à-vis du fibrinogène. L'élution se déroule selon un gradient inverse de concentration en NaCl. Le rendement de cette purification affiche un taux de 97%.

A partir de ce tour d'horizon, nous avons décidé d'évaluer deux approches de purification : (i) l'une qui repose sur la HIC en raison de sa spécificité mais également car elle s'effectue en une seule étape et directement sur un échantillon de plasma ; et (ii) la seconde qui repose sur la IEX dans la mesure où les conditions d'élutions peuvent être facilement ajustées pour cibler la protéine d'intérêt, de plus la capacité de chargement et la simplicité de mise en œuvre.

1.5 La chromatographie d'interaction hydrophobe

1.5.1 Généralités

Seules les chromatographies à phase inverse et d'interaction hydrophobe utilisent des supports (milieu, environnement) hydrophobes. En chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC), les analytes (protéines) sont adsorbés et séparés sur une phase stationnaire solide (c'est-à-dire un système à deux dimensions) portant des groupes hydrophobes immobilisés. En chromatographie à phase inverse, les solutés sont adsorbés et séparés, par partition, dans une phase stationnaire liquide apolaire (c'est-à-dire un système à trois dimensions), et non une phase solide.

L'hydrophobicité est la répulsion entre un composé apolaire et un environnement polaire, comme l'eau. Ce terme est aussi utilisé pour faire référence à l'arrangement des molécules d'eau autour de solutés apolaires. En effet, la force motrice de ces interactions hydrophobes est l'extrusion (ou expulsion) d'une couche mono-moléculaire de molécules d'eau ordonnées : lorsqu'un composé apolaire est introduit dans de l'eau, une augmentation globale du degré d'ordre des molécules d'eau au voisinage de ce composé est observée, et accompagnée par une augmentation d'entropie ($\Delta S < 0$). Selon la condition $\Delta H \ll T\Delta S$,

l'énergie libre de Gibbs est donc négative ($-\Delta G \sim T\Delta S$), rendant ainsi ce phénomène directement dépendant de la variation d'entropie et surtout thermodynamiquement favorable [33].

La HIC utilise donc l'hydrophobicité des protéines en mettant en jeu des interactions hydrophobes entre des ligands hydrophobes immobilisés et les régions non-polaires à la surface des protéines. L'adsorption augmente avec la concentration en sel de la phase mobile, et l'élution se déroule en diminuant la concentration en sel de l'éluant [34, 35].

La HIC est souvent utilisée quand d'autres chromatographies sont délicates à mettre en place [36]. Van Oss a avancé l'idée que l'interaction hydrophobe repose essentiellement sur les forces de van der Waals [37]. Ainsi, les modifications structurales des biomolécules sont en théorie minimisées et leur activité biologique préservée en HIC. En effet, les interactions mises en avant sont plus faibles que celles développées en chromatographie d'affinité [38, 39].

La HIC apparaît donc comme une alternative pour exploiter les propriétés hydrophobes des protéines en utilisant un environnement plus polaire et moins dénaturant que la RPC, car elle utilise des solvants non-polaires pour l'élution des protéines [40].

1.5.2 HIC et approche par hydrophobicité critique

Depuis son introduction, la HIC n'a pas encore su s'affirmer comme méthode de référence dans la séparation de protéines comme l'est la chromatographie d'affinité, bien qu'un grand nombre de protéines aient été purifiées par cette voie. Toutefois les adsorbants classiques commercialement disponibles sont le plus souvent inadaptés aux protocoles expérimentaux à cause de leur hydrophobicité élevée. La problématique est donc de trouver une matrice hydrophobe qui développe des propriétés d'hydrophobicité faibles permettant à la fois une interaction avec la (ou les) protéine(s) et une élution en conditions natives.

De bons rendements en HIC peuvent être obtenus si la protéine est complètement éluee dans des conditions proches des conditions physiologiques, c'est-à-dire à faible force ionique. Cela implique que le gel doit être non-adsorbant dans ces conditions. De plus, la purification ne s'effectue que si la protéine interagit avec le support ; ce qui impose à la matrice chromatographique d'être conçue pour que l'adsorption soit induite facilement tout en évitant la dénaturation de la protéine d'intérêt, soit par des sels neutres. C'est pourquoi se placer dans des conditions expérimentales proches du point d'hydrophobicité critique doit répondre ces deux conditions. En pratique, le point d'hydrophobicité critique définit la

concentration de résidus alkyles immobilisés sur le support, pour une longueur de chaîne alkyle donnée, pour laquelle l'adsorption de la protéine d'intérêt débute. L'interaction d'une protéine sur de tels supports non chargés décrit une sigmoïde. Le point d'hydrophobicité peut être déterminé aussi bien dans des conditions de fortes ou de faibles concentrations en sels.

Dans la synthèse de tels gels dits « gels d'hydrophobicité critique », les résidus immobilisés doivent strictement être limités aux dérivés d'alcane afin de ne développer que des interactions hydrophobes.

Cette approche comprend donc trois étapes : (i) le choix d'une longueur de chaîne alkyle, (ii) la détermination de la concentration surfacique, (iii) la détermination de la concentration minimale ou maximale en sel (NaCl) nécessaire pour une totale adsorption de la protéine. L'idée ici est de synthétiser un gel sans charge résiduelle et sans aucune propriété d'adsorption. Cette dernière devra être déclenchée exclusivement dans les conditions d'hydrophobicité critique par une augmentation en sels, ce qui en fait donc une méthode de purification spécifique.

1.5.3 CHIC et fibrinogène

Dans ses travaux sur la CHIC, Jennissen s'est notamment intéressé à la purification du fibrinogène. Il a donc pu établir une méthodologie permettant de purifier le fibrinogène à partir de plasma brut en une seule étape et dans des conditions non-dénaturantes. Dans son article, après avoir présenté l'approche par hydrophobicité critique de la HIC, il détaille les paramètres requis pour une séparation spécifique du fibrinogène à partir de plasma humain, en une seule étape.

La chaîne alkyle et la concentration surfacique ont été déterminées à partir d'une gamme d'homologues de support d'alkyl-agarose. La matrice choisie par les auteurs est la Sepharose 4B (4 % d'agarose, GE Lifescience) car il s'agit d'un support commercial qui ne présente pas de modification chimique ni de réticulation. L'activation de la Sepharose 4B pour le greffage des chaînes alkyles est réalisé avec du carbonyle diimidazole (CDI) pour ne pas induire de charges à l'inverse du CNBr habituellement plus utilisé. Le greffage des chaînes alkyles repose sur l'utilisation d'amines primaires par l'intermédiaire de liaisons amide.

A partir d'une quantité de fibrinogène commercial fixée (1 mg), les auteurs définissent le point d'hydrophobicité critique, qui fixe a été la longueur de chaîne à cinq carbones (Seph-C5) et la concentration surfacique de chaîne pentyle à 13,2 μmol (figure 3.8).

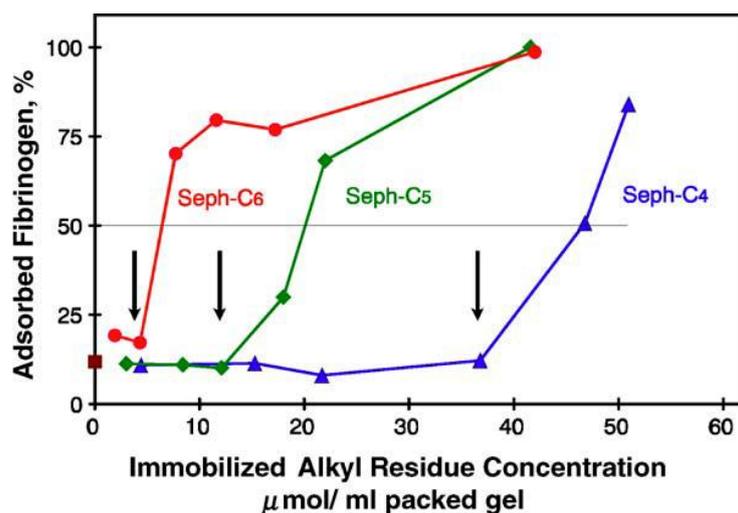


Figure 3.8 : Sigmoïdes des concentrations surfaciques des résidus immobilisés pour une série d'homologues alkyles (Seph-C4 (bleu), Seph-C5 (vert), Seph-C6 (rouge)) pour définir le point d'hydrophobicité critique (flèche noire) pour l'adsorption d'un mg de fibrinogène (d'après [32])

En ce qui concerne le sel utilisé pour promouvoir l'adsorption du fibrinogène sur les résidus alkyles, le chlorure de sodium a été sélectionné en raison de sa neutralité (faible force ionique) et de ses pouvoirs de « salting-in » et de « salting-out » intermédiaires, d'après la série d'Hofmeister. En effet, un sel comme le sulfate d'ammonium ne conduit pas à des agrégations de protéines (salting-out) ou comme le cyanate de sodium (NaSCN) qui dénature les protéines. Ainsi, il a été mis en avant qu'une augmentation de la concentration en NaCl conduit à une augmentation de la capacité à adsorber le fibrinogène. 100% d'adsorption ont été observés pour une concentration de 1,5 M de NaCl ; de même, une élution quantitative utilisant 0,15 M de NaCl a été démontrée. Ceci définit ainsi les conditions dans lesquelles doit se dérouler la purification du fibrinogène.

1.6 La chromatographie d'échange ionique

C'est en 1951 que S. Moore et W. Stein décrivent la méthode de chromatographie d'échange d'ions en utilisant comme support du polystyrène sulfonaté [41]. Ils parvinrent, grâce à cette méthode, à déterminer le site actif de la ribonucléase bien avant que l'on ne puisse établir sa structure tridimensionnelle. Pour ces travaux, ils reçurent le prix Nobel de Chimie en 1972.

1.6.1 Principe

La chromatographie d'échange d'ions (IEX) est une forme de chromatographie d'adsorption, qui sépare des molécules ionisables sur la base des différences de charges quelle que soit leur taille, comme des ions minéraux, acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques. Le principe de la séparation repose sur l'interaction réversible d'une protéine chargée et d'un support chromatographique de charge opposée (échangeur ionique, voir partie 1.6.2) [42]. L'éluion des protéines s'effectue par changement de pH et/ou par un gradient croissant de sel de la phase mobile.

1.6.2 Les échangeurs ioniques

L'IEX utilise des ligands chargés soit positivement soit négativement. Les échangeurs chargés négativement adsorbent les cations. A l'inverse, les échangeurs chargés positivement adsorbent les anions. Le tableau 3.1 présente les principaux échangeurs utilisés en IEX. Selon les valeurs de pKa des ligands chargés, les échangeurs sont divisés en deux familles :

- Les échangeurs forts (SAX : *Strong Anion eXchanger*, SCX : *Strong Cation eXchanger*), possédant une charge permanente indépendamment du pH.
- Les échangeurs faibles (WAX : *Weak Anion eXchanger*, WCX : *Weak Cation eXchanger*), qui peuvent chargés ou non suivant le pH.

Tableau 3.1 : Les principaux échangeurs ioniques utilisés en IEX

Echangeur anionique			Echangeur cationique		
Ammonium quaternaire (Q)	Fort	$\text{OCH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Sulfopropyl (SP)	Fort	$\text{OCH}_2\text{CHOCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
Diethylaminoethyl (DEAE)	Faible	$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$	Methylsulfonate (S)	Fort	$\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{SO}_3^-$
Diethylamoniopropyl (ANX)	Faible	$\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$	Carboxymethyl (CM)	Faible	OCH_2COO^-

Les échangeurs forts sont ionisés quel que soit le pH alors que les carboxylates ne le sont qu'à $\text{pH} > 3$, et les amines tertiaires ne sont protonées qu'à pH acide. On utilise les échangeurs d'anions forts pour séparer des acides faibles comme les acides carboxyliques, et les échangeurs faibles pour séparer des acides forts, comme les esters-phosphates. Le même type de raisonnement s'applique aux échangeurs de cations.

Les supports d'IEX les plus courants sont à base de cellulose ou d'agarose sur lesquels sont immobilisés les échangeurs ioniques. L'utilisation de matériaux polymériques se justifie par leur grande stabilité mécanique (bonne résistance à la pression) et leur grande tolérance vis-à-vis de pH extrêmes. Des supports à base de polymères monolithiques sont explorés pour renforcer ces propriétés [43-45].

1.6.3 L'effet du pH et des sels

Les protéines portent des acides aminés chargés à leur surface, responsables de l'adsorption sur l'échangeur d'ions. De plus, la charge nette d'une protéine varie selon le pH de la solution dans laquelle elle est solubilisée. Ainsi, lorsque le pH est supérieur au point isoélectrique (pI) d'une protéine, cette dernière interagit avec un échangeur anionique ; à l'inverse, lorsque le pH de la solution est inférieur au pI, la protéine s'adsorbe sur un échangeur cationique.

Il est, par ailleurs, intéressant de noter qu'il est possible d'effectuer des gradients de pH, qui auront pour but de jouer sur les états de charges des protéines et/ou de la phase stationnaire, dans le cas des échangeurs WAX et WCX (tableau 3.2). La maîtrise du pH pour ce mode de chromatographie est essentielle, c'est pourquoi le choix du tampon est déterminant. Le tableau suivant présente les principaux tampons utilisés suivant les types d'échangeurs.

Tableau 3.2 : Tampons utilisés en IEX suivant le type d'échangeurs [46]

Chromatographie d'échange cationique			Chromatographie d'échange anionique		
Tampon	pKa	Gamme de pH	Tampon	pKa	Gamme de pH
acide citrique	3,1	2,6 – 3,6	N-méthyl-piperazine	4,7	4,25 – 5,25
acide lactique	3,8	3,4 – 4,3	Piperazine	5,7	5,2 – 6,2
acide acétique	4,7	4,3 – 5,2	Bis-Tris	6,5	6,0 – 7,0
MES	6,1	5,6 – 6,6	Bis-Tris propane	6,8	6,3 – 7,3
ADA	6,6	6,1 – 7,1	Triéthanolamine	7,8	7,25-8,25
MOPS	7,2	6,7 – 7,7	Tris	8,1	7,6 – 8,6
phosphate	7,2	6,8 – 7,6	N-méthyl diéthanolamine	8,5	8,0 – 9,0
HEPES	7,2	7,0 – 8,0	Diéthanolamine	8,9	8,4 – 9,4
Bicine	8,3	7,6 – 9,0	Ethanolamine	9,5	9,0 – 10,0

L'élution a pour but d'affaiblir l'adsorption des analytes sur le support chromatographique. En IEX, la désorption (ou l'élution) des protéines s'effectue par changement de pH et/ou par un gradient croissant de sel de la phase mobile. En effet, en

modifiant le pH de la phase mobile, la charge nette de la protéine fixée est réduite jusqu'à porter une charge de même signe que l'échangeur d'ions : il n'existe alors plus d'interaction électrostatique entre les molécules et le groupement chargé porté par la résine. Cette approche offre un réel contrôle de la sélectivité de la séparation (ordre d'élution, résolution des pics), comme le montre la figure 3.9.

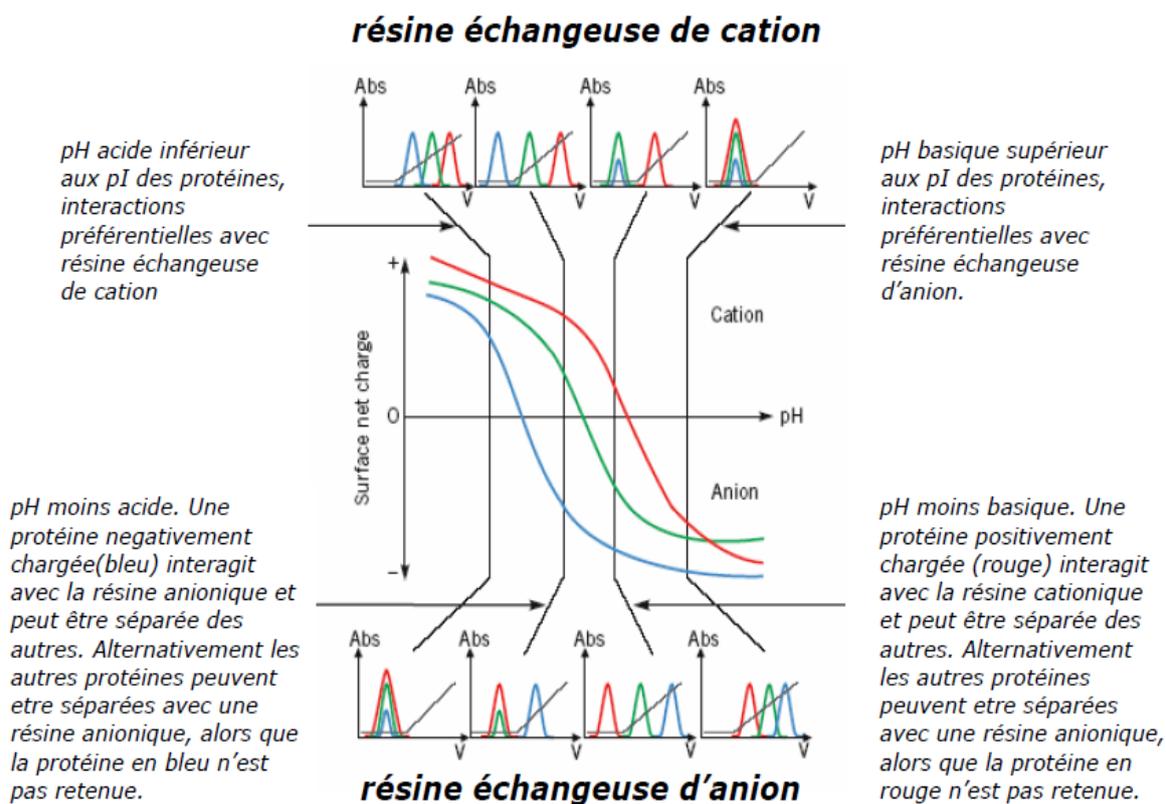


Figure 3.9 : Effet du pH sur la sélectivité de l'élution des protéines

Enfin, l'élution peut également se dérouler en augmentant la force ionique de la phase mobile. Cet ajout de sel, typiquement NaCl, induit nécessairement un contre-ion de même charge que les molécules fixées, qui entre en compétition avec l'analyte en venant bloquer les charges disponibles à la surface de l'échangeur ionique. L'ajout d'un contre-ion ne modifie pas grandement la sélectivité de la séparation mais assiste la désorption des analytes. Le gradient se termine généralement par un palier à concentration en sel très élevée pour décrocher les molécules les plus fortement adsorbées et régénérer la colonne.

Ainsi, l'IEX possède plusieurs avantages tels qu'une grande capacité de chargement alliée à une grande résolution de séparation. Par ailleurs, les conditions chromatographiques qu'elle nécessite sont relativement douces pour les protéines, préservant ainsi leur activité. En

effet, il est possible d'envisager des conditions proches des conditions physiologiques, ce qui est intéressant pour la séparation de protéines plasmatiques.

1.6.4 IEX et purification de protéines plasmatiques

La IEX est l'un des modes chromatographiques le plus utilisé pour la purification de protéines [47]. Quelques exemples d'utilisations de l'IEX sont présentés afin de souligner ses diverses possibilités dans le cadre de la séparation et la purification de protéines plasmatiques [48, 49].

Dès 1956, un premier fractionnement des protéines du sérum (i.e. plasma ayant été débarrassé de fibrinogène) a été décrit, en utilisant l'IEX sur échangeur anionique, de type DEAE-cellulose [50], à partir des gradients de pH et de sel.

Shimano a montré que l'IEX sur DEAE-Sepharose 6B permet d'isoler des sous-classes de protéines, comme les LDL (Low Density Lipoproteins) et les LDL présentant des oxydations labiles [51].

A partir d'une étude théorique, Goheen a montré qu'il était possible d'isoler des immunoglobulines, de l'albumine et du fibrinogène sur un échangeur anionique, dans le cadre d'une étude visant à étudier les processus d'adsorption/désorption sur un support non-poreux.

De plus, l'IEX permet la préparation à grande échelle de certains facteurs de coagulation comme la thrombine [52]. Elle sert également de méthode de référence pour la purification du facteur VIII (facteur anti-hémophile A) et du facteur von Willebrand sur un échangeur anionique [53-55].

En 2008, Kovac utilise l'analyse protéomique pour caractériser des protéines plasmatiques dont la séparation est effectuée par échange anionique, permettant ainsi la purification des facteurs vitamine K-dépendants (prothrombine (FII), les facteurs VII, facteur IX, et facteur X) et des inhibiteurs de la coagulation (protéine C et protéine S).

Enfin, appliquée au fibrinogène, l'IEX a permis de mettre en évidence différents variants de la chaîne gamma [56]. Sur cette base, Siebenlist a pu identifier deux formes de fibrinogène qui se différencient par leur chaîne gamma, par IEX sur DEAE-cellulose [57], et lui a permis de souligner l'interaction spécifique du fibrinogène contenant un variant de la chaîne gamma avec le facteur XIII. Plus récemment, Kollman a mis en place une purification du fibrinogène en associant une précipitation à l'éthanol (fraction I du fractionnement de Cohn) et une séparation du précipité sur DEAE [31], dans le cadre d'une étude comparative de la structure du fibrinogène entre plusieurs espèces dont le fibrinogène humain.

2 Purification du fibrinogène

Deux approches ont été évaluées pour la purification du fibrinogène : par chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC) et par chromatographie d'échange ionique (IEX). Un suivi par gel d'électrophorèse 1D (conditions non-dénaturantes : 8 %T ; conditions SDS-PAGE : 12% T) a été effectué à chaque étape sur les fractions jugées d'intérêt.

2.1 Purification par HIC

Après synthèse de la phase Seph-C5 et remplissage de la colonne, les conditions chromatographiques proposées par Jennissen [32] ont été appliquées sur un échantillon de plasma (1 mL de plasma dilué au 1/5). Le profil chromatographique, présenté dans la figure 3.10 correspond à celui décrit dans la littérature : au cours de l'élution, six pics sont observés. Le premier pic (le plus intense) correspond à l'élution des protéines non-retenues et s'étend sur 5 mL.

En effet, l'interaction spécifique du fibrinogène avec la Seph-C5 s'effectue en présence d'une forte concentration de NaCl ; l'élution est réalisée par un gradient négatif de concentration en sel. Il semble également qu'une faible proportion de fibrinogène soit également éluée en présence d'eau. L'urée permet de désorber toutes les protéines qui n'auraient pas été encore éluées.

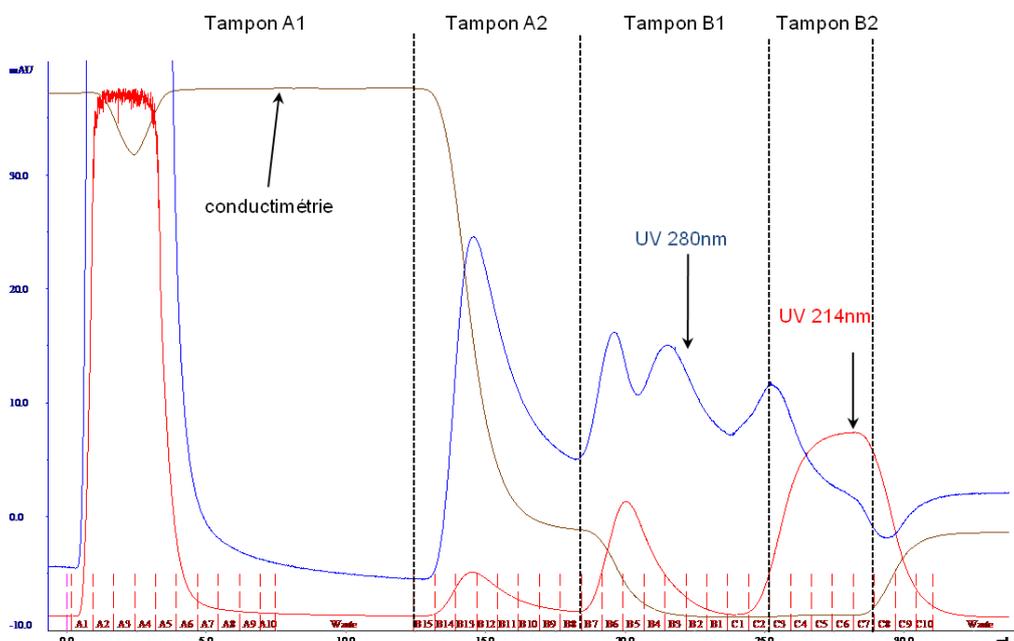


Figure 3.10 : Profil chromatographique d'un échantillon de plasma sur Seph-C5. par HIC.

Pour déterminer la composition des fractions d'intérêt, un suivi par électrophorèse 1D a été conduit en conditions non-dénaturantes (Figure 3.11) afin de préserver la structure des édifices protéiques.

Dans la zone de hautes masses moléculaires (> 220 kDa), on observe deux bandes distinctes présentes dans les fractions B14 à B6. La première bande est plus intense que la seconde ; toutefois, au-delà de la fraction B5, elle disparaît complètement. Dans les basses masses moléculaires et dans chaque fraction, on observe deux bandes majoritaires : la bande, dont la masse supérieure est à 53 kDa, est plus intense dans les fractions B14 à B9, alors que la bande correspondant à une protéine d'environ 40 kDa est éluée en fin de chromatographie, notamment en présence d'urée.

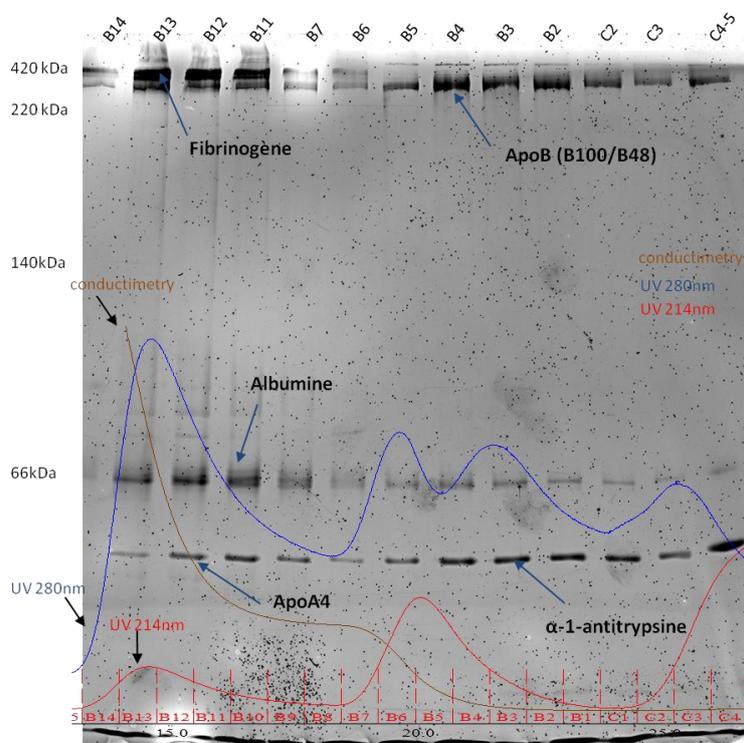


Figure 3.11 : Gel 1D réalisé en conditions non-dénaturantes sur les fractions B14 à C4 après HIC. Identification des bandes par MALDI-TOF MS

Ensuite, les bandes principales ont été excisées manuellement, digérées par la trypsine et analysées par MALDI-TOF MS. Plusieurs protéines ont pu être ainsi identifiées. Conformément à nos attentes, le fibrinogène a été identifié dans la première bande intense à travers ses trois chaînes (Annexe 3.2). On le retrouve dans les fractions B14 à B6. L'analyse de la bande située en-dessous de celle du fibrinogène a permis d'identifier l'apolipoprotéine B (B100/B48) avec une masse de 240 kDa. L'albumine (66 kDa) et l'apolipoprotéine A4 (45 kDa)

ont été également mises en évidence. A partir de la fraction B5, on constate l'élution de l' α -1-antitrypsine (46 kDa).

Il n'est pas surprenant de constater la présence de ces protéines. En effet, il existe un indice qui permet de caractériser le caractère hydrophobe ou hydrophile d'une protéine [58] : l'indice « gravity ». Calculé à partir de la séquence en acides aminés, cet indice varie entre -1.7 et 1.7 où une valeur négative définit un caractère majoritairement hydrophile, et inversement une valeur positive définit un caractère majoritairement hydrophobe. On peut faire ainsi le lien entre leur élution des protéines éluées et leur « gravity ». Ainsi l'apolipoprotéine A4 et les chaînes α , β et γ du fibrinogène ont un « gravity » respectif de -0,939, 0,885, 0,849 et -0,682, et éluent donc dans le même temps, alors que l'apolipoprotéine B et l' α -1-antitrypsine sont plus retenues et éluées avec l'urée du fait de leur forte hydrophobicité. En effet, toutes deux possèdent un « gravity » respectif de -0.341 (ApoB48) et -0.302 (A1AT). On remarque, enfin, que l'albumine est présente dans toutes les fractions collectées.

Ainsi, la purification par HIC par approche critique permet une réelle spécificité vis-à-vis du fibrinogène. Toutefois, au cours de cette purification, on note la présence de protéines contaminantes comme l'albumine et certaines apolipoprotéines. Par ailleurs, même si la synthèse de la phase Seph-C5 est facile à mettre en œuvre, elle pose un problème de reproductibilité d'une synthèse à l'autre. De même, on a également pu se rendre compte que l'étape de remplissage est délicate, et conditionne les résultats de la purification. Enfin, la capacité de chargement de la colonne est limitée.

2.2 Purification par IEX

Nous avons envisagé une seconde approche qui s'appuie sur la chromatographie d'échange ionique (IEX). Pour la purification du fibrinogène, la phase stationnaire utilisée est une phase DEAE (échangeur d'anion faible) dans la mesure où ce type d'échangeur semble être le plus utilisé [31, 59, 60].

Nous avons débuté, de façon intuitive, avec une élution de 1 mL de plasma, selon un gradient de sel. Ainsi, la colonne est conditionnée par un tampon initial constitué de 50 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 8,3. Le tampon utilisé pour générer le gradient de sel est composé de phosphate 1 M de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 8,3. A partir du profil chromatographique, on se rend compte que ces conditions permettent de fractionner le plasma selon trois fractions distinctes (figure 3.12). Les fractions 1 à 3 ont été recueillies puis séparées sur gel 1D. Plusieurs protéines ont pu être identifiées (apoB, sérotransferrine,

albumine, fibrinogène, apoA1). On constate, par ailleurs, que l'albumine est majoritairement éluée dans la fraction 2, tandis que le fibrinogène semble être préférentiellement élué dans la fraction 1 (d'après l'intensité de ses bandes des sous-unités).

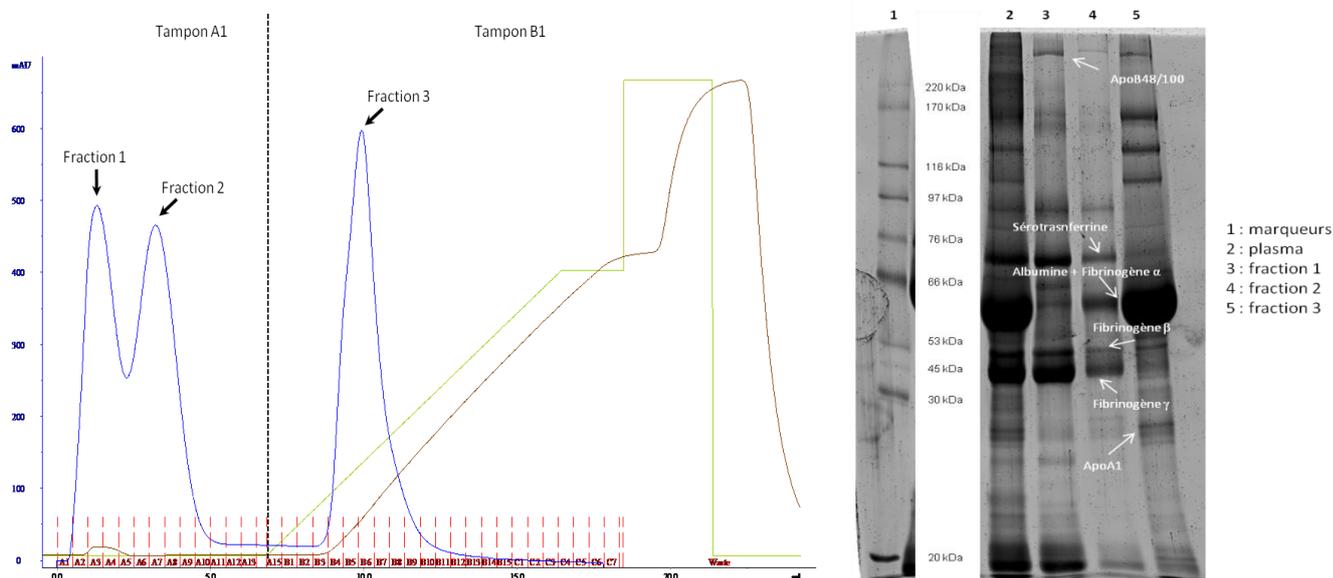


Figure 3.12 : A gauche, profil chromatographique de l'éluat d'un échantillon de plasma sur DEAE ; à droite, gel 1D (10% T) en conditions dénaturantes des fractions 1 à 3 de l'éluât (piste 1 : marqueurs, piste 2 : plasma ; piste 3 : fraction 1 ; piste 4 : fraction 2 ; piste 5 : fraction 3)

De fait, il est clair que la IEX ne présente pas de spécificité particulière vis-à-vis du fibrinogène ; c'est pourquoi une étape préliminaire de précipitation, inspirée du procédé de fractionnement décrit par Cohn est ajoutée. En effet, la fraction I est la fraction la plus enrichie en fibrinogène [14]: les gels 1D, présentés dans la figure 3.13, démontrent la présence du fibrinogène dans cette fraction. En conditions non-dénaturantes, le fibrinogène se trouve sous la forme complexée à 320 kDa ; en conditions SDS-PAGE, on le retrouve sous la forme de ses trois sous-unités. On note, par ailleurs, la présence de quelques protéines supplémentaires comme l'albumine et la sérotransferrine. Il est normal de les observer puisque l'albumine est purifiée dans la fraction V, et la sérotransferrine l'est à partir de la fraction IV dans le fractionnement de Cohn [14].

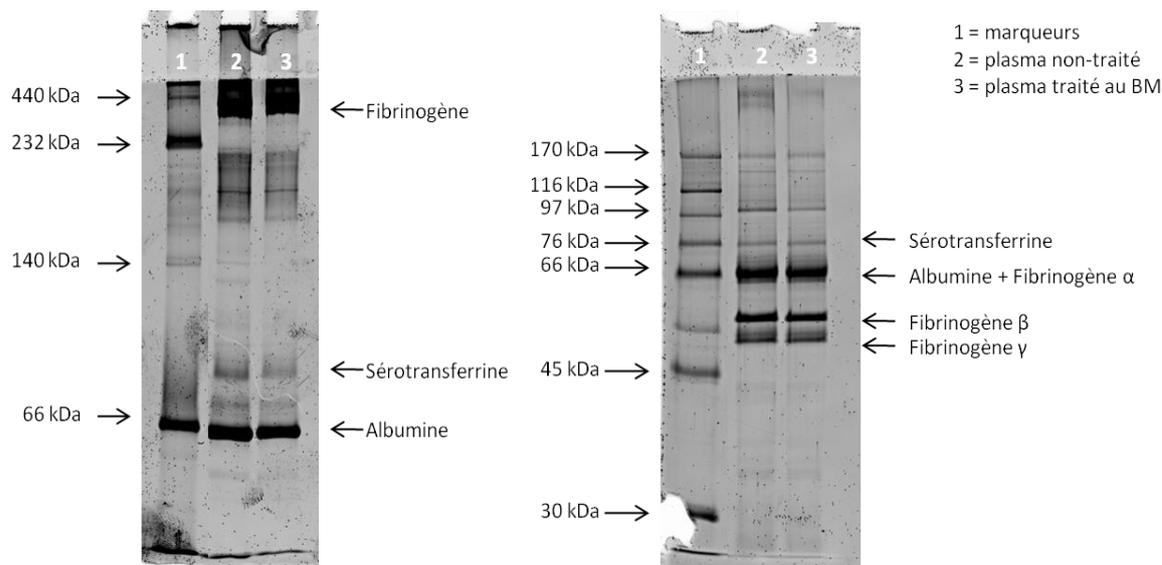


Figure 3.13 : Gels 1D de la fraction I du procédé fractionnement de Cohn (à gauche : conditions non-dénaturantes (8%T) ; à droite : SDS-PAGE (12%T))

Ainsi, dans un second temps, nous avons cherché à améliorer les conditions d’élution en ajoutant un gradient afin de dissocier le complexe albumine/fibrinogène. Après optimisation des compositions des deux phases mobiles, les conditions les plus favorables pour notre étude utilisent un tampon initial composé de 50 mM Tris-HCl, 50 mM phosphate, 10 mM NaCl, pH 8,5 ; le gradient est réalisé à partir d’un tampon constitué 500 mM Tris-HCl, 500 mM phosphate, 500 mM NaCl, pH 4,2. Le profil chromatographique est représenté dans la figure 3.14 sur lequel on observe cinq fractions majoritaires, désignées par des flèches verticales sur la figure.

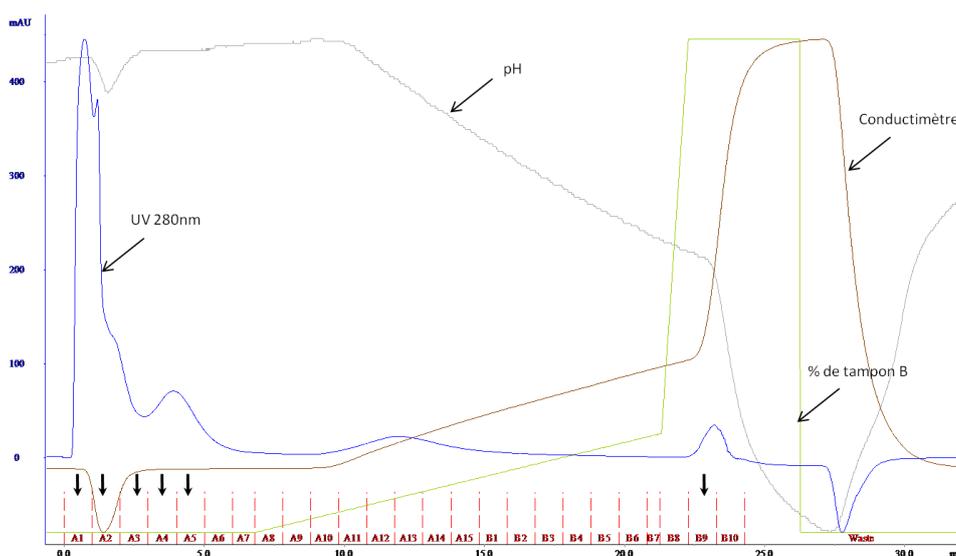


Figure 3.14: Purification de la fraction de Cohn I, par DEAE en utilisant un gradient croissant de sel et un gradient décroissant de pH.

Là encore, les fractions correspondantes sont séparées par gel 1D, en conditions non-dénaturantes, afin d'en déterminer la composition (Figure 3.15). La digestion in-gel des bandes A1 et A2 permet de confirmer la présence du fibrinogène. Ces fractions contiennent le fibrinogène, correspondant aux deux formes du fibrinogène à 340 kDa et à 420 kDa. La piste 3 du gel non-dénaturant, correspondant à la fraction A1, permet d'estimer la pureté du fibrinogène à 90%. A partir du gel 1D SDS-PAGE, il est facile d'identifier les trois sous-unités du fibrinogène.

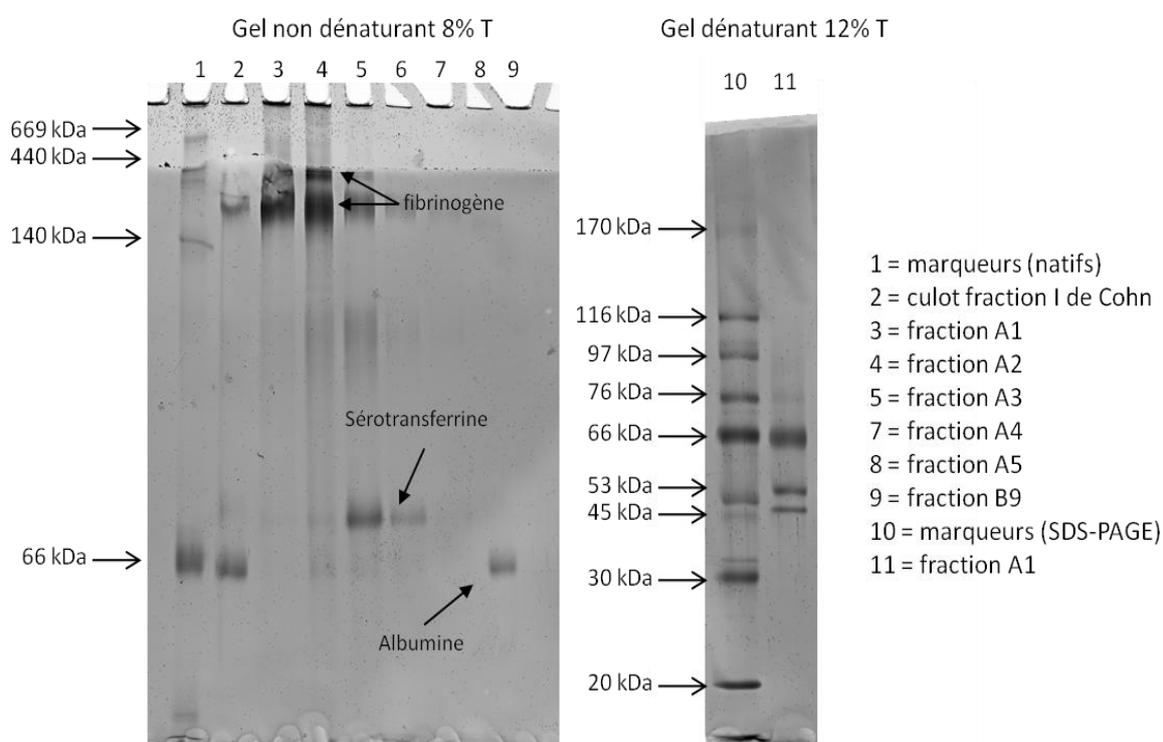


Figure 3.15 : Suivi de la purification effectuée sur DEAE par gradient de sel et de pH. A gauche : gel 1D en conditions non-dénaturantes. A droite : gel 1D en conditions SDS-PAGE.

La fraction A1 sera utilisée pour la suite de cette étude. Cette méthode a donc été ensuite appliquée à la purification du fibrinogène, à partir des échantillons de plasma non-traité et traité, issus du même donneur.

2.2.1 Validation de la purification

Au cours de la purification de protéines, il est important de veiller à conserver l'activité de la protéine purifiée. Il existe plusieurs méthodes pour la mesure de l'activité du fibrinogène [61]. Chacune explore la fonctionnalité de la fibrinoformation, c'est-à-dire la formation du caillot de fibrine. La méthode la plus simple consiste à évaluer l'effet de la

Chapitre 3

thrombine sur le fibrinogène, explorant ainsi la voie finale commune de la cascade de coagulation. Ainsi, on mesure le temps de coagulation d'un plasma déplaqueté en présence d'une quantité connue de thrombine et d'ions Ca^{2+} (ou « mesure du temps de thrombine »). La mesure est déclenchée à l'ajout de la thrombine calcique, et arrêtée à l'apparition des premières fibres de fibrine (caillot).

A partir de cette méthode, l'activité du fibrinogène est évaluée pour chacune des étapes de la purification mise en place : (i) sur les échantillons de plasma avant purification, (ii) sur les fractions I de Cohn, et (iii) sur les fractions A1 issues de la IEX sur DEAE. Les temps de coagulation mesurés sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 3.3). Ces mesures ont été effectuées à partir de deux purifications différentes.

Tableau 3.3 : Mesure du temps de thrombine au cours de la purification du fibrinogène, sur les deux types d'échantillons de plasma (avant et après traitement BM/UV-visible)

Type d'échantillon	Temps de thrombine (sec)		
	Plasma	Fraction I Cohn	Fraction A1 (DEAE)
Avant traitement	18-20	20-25	30-32
Après traitement	20-22	24-28	32-40

Tout d'abord, on constate que le temps de coagulation (ou temps de thrombine) augmente légèrement au cours des deux étapes de la purification, traduisant une diminution de l'activité. De plus, on remarque que le temps de thrombine est, à chaque fois, plus long dans le cas du plasma ayant traité au BM/UV-visible. Il s'agit de la première conséquence du traitement BM/UV-visible sur le fibrinogène et rejoint les observations décrites par la littérature [1, 62-65]. Par ailleurs, il est intéressant de souligner que cette différence de temps de coagulation est maintenue tout au long de la purification.

Ces observations nous permettent de valider cette méthode (Cohn I et IEX) comme méthode de purification pour notre étude sur l'impact du traitement au bleu de méthylène sur le fibrinogène.

3 Impact du traitement au bleu de méthylène sur le fibrinogène

Le traitement d'inactivation virale au bleu de méthylène est connu pour avoir un impact sur certaines protéines plasmatiques. Comme l'on a déjà démontré précédemment, le traitement induit une baisse de l'activité du fibrinogène. Toutefois, aucune étude ne permet à ce jour d'expliquer clairement l'origine de cette diminution.

L'objectif de cette étude est désormais de faire le lien entre les modifications éventuelles induites sur le fibrinogène et sa baisse d'activité coagulante. Dans un premier temps, nous avons procédé à l'analyse protéomique du fibrinogène purifié par nanoLC-nanoESI FT-ICR MS. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'analyse des fibrinopeptides et du caillot de fibrine. Nous avons également étendu notre étude par un suivi de la cinétique de la formation de la fibrine par turbidimétrie.

3.1 Etude des modifications induites par le traitement au bleu de méthylène

3.1.1 Sur le fibrinogène

Les fractions A1 de fibrinogène purifié par DEAE, à partir des deux types d'échantillons de plasma (FibNT et FibBM), ont été digérées directement en solution. Les peptides résultants ont été analysés ensuite par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS. Six réplicats par type de plasma ont été réalisés pour s'assurer de la reproductibilité des résultats. L'identification des protéines a été effectuée à partir de la banque de données SwissProt (taxonomie : Homo Sapiens (Human)). La figure 3.16 présente les protéines identifiées ; les trois chaînes du fibrinogène sont aisément identifiées avec des scores élevés ; on note également la présence d'albumine, de fibronectine et de complément facteur 3. Le recouvrement de séquence pour chaque sous-unité du fibrinogène est supérieur à 60% (Annexe 3.3)

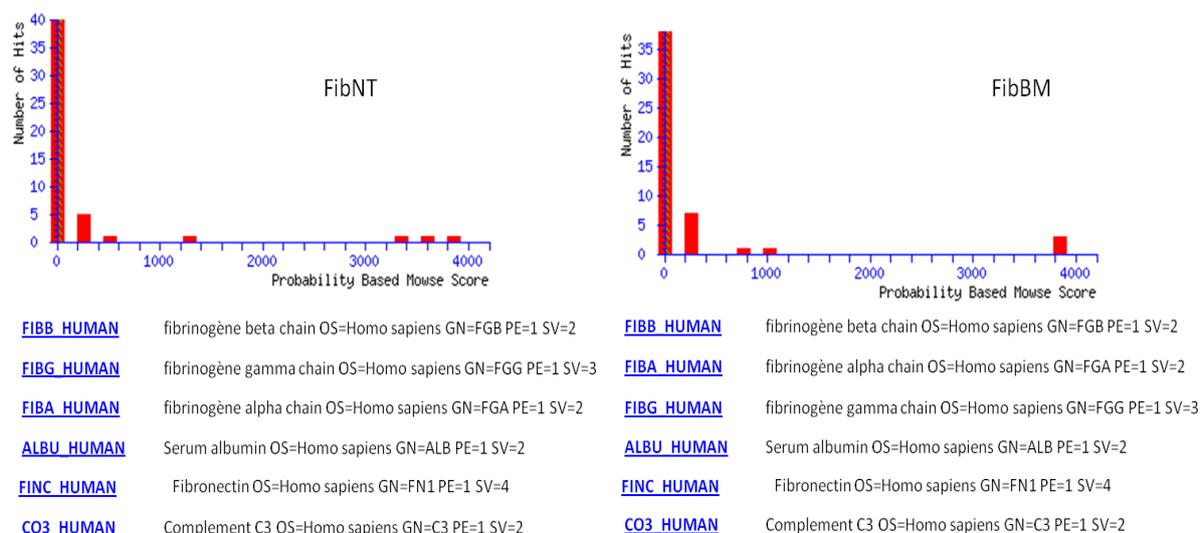


Figure 3.16 : Résultat de l'interrogation MASCOT sur les échantillons de fibrinogène purifié, digérés en solution et analysés par nanoLC-nanoESI-FT-ICR MS. A gauche : fibrinogène purifié à partir du plasma non-traité. A droite et encadré : le fibrinogène purifié à partir du plasma après traitement BM/lumière visible.

Plusieurs modifications ont pu être identifiées dans l'échantillon de fibrinogène issu du plasma traité par BM/UV-visible. En effet, la chaîne α présente une déamidation sur le peptide MELERPGGNEITR et quatre oxydations dont trois portées par un résidu Met (peptides concernés : NNKDSHSLTTNIMEILR, ALTDMPQMR et MKPVPDLVPGNFKSQK) et l'une implique un résidu Pro sur le peptide GSESGIFTNTKESSSHHPGIAEFPSR. En ce qui concerne les modifications de la chaîne β , elles reprennent deux oxydations de Met sur les peptides MGPTELLIEMEDWKGDKVK et KGETSEMYLIQPDSSVKPYR, ainsi qu'une oxydation de Pro sur le peptide NYCGLPGEYWLGNDKISQLTR. Enfin, deux oxydations sur des résidus Met ont été observées sur les peptides KMLEEIMKYEASILTHDSSIR et AIQLTYNPDESSKPNMIDAATLK.

Il est intéressant de noter que la recherche des modifications a été étendue à la recherche de citrullinations, dans la mesure où elles sont impliquées dans la dégradation protéique [66, 67] au même titre que la déamidation. Toutes deux induisent un incrément de masse de 0,9840 Da. Il n'est d'ailleurs pas rare que les deux termes soient confondus. Toutefois, la citrullination concerne exclusivement la conversion de la fonction imine d'un résidu Arg en fonction carbonyle pour former une citrulline, acide aminé non codé par l'ADN (Figure 3.17a). On identifie une citrullination sur la chaîne γ sur le peptide VELEDWNGR.

Par ailleurs, à partir du tableau 2.1 établi dans le chapitre 2, nous sommes parvenus à identifier une carbamylation sur la chaîne β au niveau du peptide YYWGGQYTWDMAK. Cette modification concerne les lysines, les cystéines et les N-terminaux [68], induisant un

incrément de masse de 43,0058 Da. Dans notre cas, elles sont localisées sur des lysines. La Figure 3.17b illustre la conversion du résidu lysine en homocitrulline. Pour expliquer l'origine de cette modification, on avance l'hypothèse de la participation de l'urée ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{N}_2\text{H}$) circulant dans le plasma qui au cours du traitement BM/Lumière visible forme un dérivé isocyanate ($\text{N}=\text{C}=\text{O}^-$) évoluant vers une forme d'acide isocyanique ($\text{HN}=\text{C}=\text{O}$) qui réagit ensuite sur le groupe latéral NH_2 de la lysine. La validation de cette hypothèse est actuellement en cours.

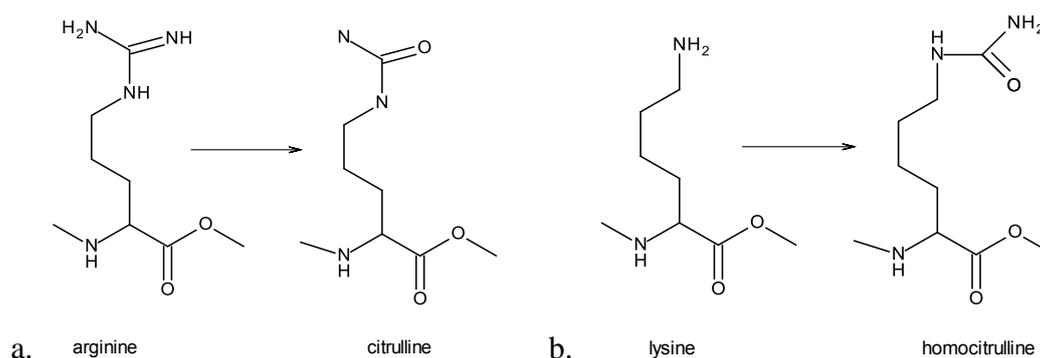


Figure 3.17 : Changement induit par (a) la citrullination sur l'arginine et par (b) par carbamylation sur la lysine.

A partir des données LC-MS et après normalisation, il apparaît trois types de modifications : (i) celles qui s'avèrent spécifiques du traitement, (ii) celles qui sont surexprimées après traitement, et (iii) celles que l'on ne peut pas clairement relier au traitement. Le tableau 3.4 récapitule les modifications observées ainsi que le comportement vis-à-vis du traitement BM/UV-visible. De plus, les annexes 3.8 à 3.20 illustrent la localisation des modifications observées, à partir des spectres MS/MS des peptides concernés.

Tableau 3.4 : Récapitulatif des modifications identifiées sur le fibrinogène, issu du plasma après traitement BM/UV-vis.

Peptides	Modification	Résidu	Sous-unité	% peptide modifié FibNT	% peptide modifié FibBM	Statut
<u>M</u> GPTELLIEMEDWKGDKVK	Oxydation	M	beta	0	96	spécifique BM
NYCGL <u>P</u> GEYWLGNKISQLTR	Oxydation	P	beta	0	37	spécifique BM
KGG <u>T</u> SEM <u>Y</u> LIQPDSSVKPYR	Oxydation	M	beta	0	76	spécifique BM
YYWGGQYTWDM <u>A</u> K	carbamylation	K	beta	0		spécifique BM
MELERPGG <u>N</u> EITR	déamidation	N	alpha	0	63	spécifique BM
NNKDSHSLTTN <u>M</u> EILR	oxydation	M	alpha	91	94	surexprimé
GSESGIFTNTKESSSH <u>H</u> PGIAEFPSR	oxydation	P	alpha	53	54	surexprimé
ALTDMPQ <u>M</u> R	oxydation	M	alpha	0	78	spécifique BM
<u>M</u> KPVPDLVPGNFKSQLQK	oxydation	M	alpha	25	77	spécifique BM
AIQLTYNPDESSKPN <u>M</u> IDAATLK	oxydation	M	gamma	0	79	spécifique BM
<u>K</u> MLEEIMKYEASILTHDSSIR	oxydation	M	gamma	18	29	discutable
VELEDWNG <u>R</u>	citrullination	R	gamma	57	84	discutable

3.2 Etude de la formation du caillot

La thrombine convertit le fibrinogène en fibrine par protéolyse dans le domaine central, libérant les fibrinopeptides A et B (notés ultérieurement respectivement FpA et FpB). La libération de ces fibrinopeptides dévoile un site de polymérisation N-terminal sur les chaînes α et β et conduit à la formation d'une liaison isopeptidique spontanée avec un site C-terminal d'un fibrinogène et/ou d'un monomère de fibrine voisin. Une fois ces monomères générés, ils s'alignent spontanément pour former des fibres de fibrine instables. En présence de calcium, le facteur XIII entre ensuite en jeu pour renforcer les liaisons entre les monomères et stabiliser la fibrine en créant des ponts entre la lysine et la glutamine des chaînes $\text{A}\alpha$ et γ (liaisons isopeptidiques).

La figure 3.18 illustre la méthodologie que l'on a appliquée pour l'étude de la fibrinoformation : elle comprend un suivi cinétique par turbidimétrie au cours de la formation de fibrine, une analyse des fibrinopeptides relargués dans le surnageant après une heure de polymérisation et enfin une caractérisation protéomique du caillot de fibrine.

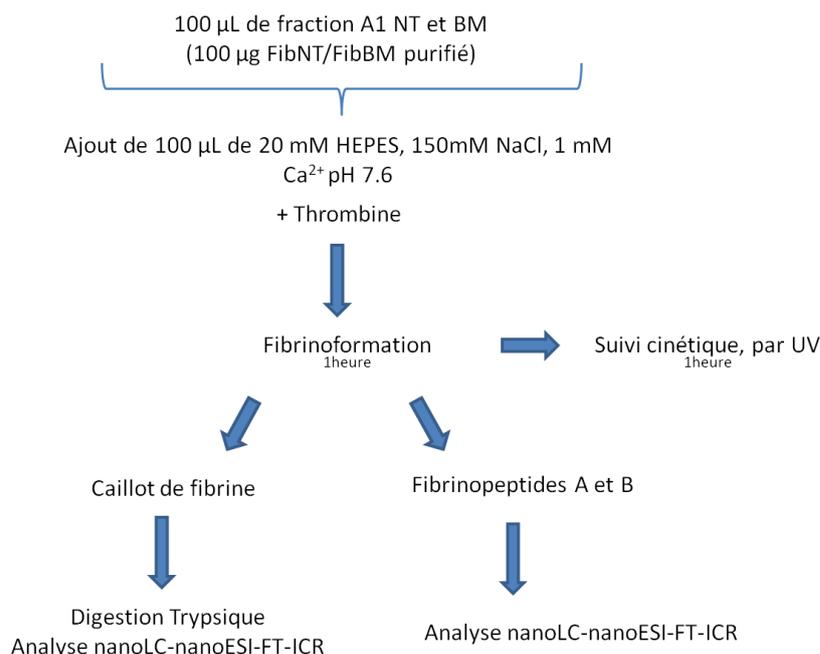


Figure 3.18 : Stratégie analytique pour l'étude de la fibrinoformation

3.2.1 Suivi UV cinétique

Contrairement aux conditions présentées pour la mesure du temps de thrombine, la polymérisation du fibrinogène en fibrine est déclenchée par une quantité de thrombine calcique inférieure (62,5 U/mL). De même, l'échantillon de fibrinogène est également dilué au dixième afin de ralentir la formation de fibrine, et ainsi favoriser le suivi turbidimétrique de la polymérisation. La turbidimétrie est mesurée à $\lambda = 340$ nm, pendant 65 minutes, pour chaque type de fibrinogène issu de plasma non-traité (noté FibNT) et de plasma traité au BM/UV-vis (noté FibBM).

La figure 3.19 représente l'évolution de l'absorbance au cours des deux fibrinoformations. Plusieurs points peuvent être soulignés. Les temps et les absorbances caractéristiques sont regroupés dans le tableau présenté dans la figure 3.19. Tout d'abord, l'absorbance finale de chaque caillot est différente ; en effet, elle est plus élevée dans le cas du FibNT ($Abs_{max}(NT) = 0,35$ uA contre $Abs_{max}(BM) = 0,25$ uA). Cela peut suggérer (i) soit un changement en termes de structure ou de densité du caillot, après le traitement BM/UV-vis, (ii) une quantité de fibrinogène impliqué dans la conversion en fibrine réduite, après traitement BM/UV-vis. De plus, un zoom entre les temps 0 et 100 sec permet de mettre en avant un retard à l'initiation (« lag period ») de la formation des premières fibres de fibrines. La fibrinoformation débute à 30 sec dans le FibNT, alors qu'elle ne débute qu'après 50 sec

dans le cas du FibBM. Toutefois après normalisation des données turbidimétriques, il est intéressant de souligner que les deux courbes se superposent, traduisant ainsi que les caractéristiques de cette polymérisation (constante cinétique, ordre de la réaction, mécanisme) sont conservées. Enfin, on remarque que le temps, au bout duquel l'absorbance est maximale, présente un écart réel entre les deux caillots, soit 360 sec, alors qu'initialement la différence des « lag periods » n'était que de 20 sec. Cela témoigne que la polymérisation du FibBM est ralentie tout au long de la formation du caillot.

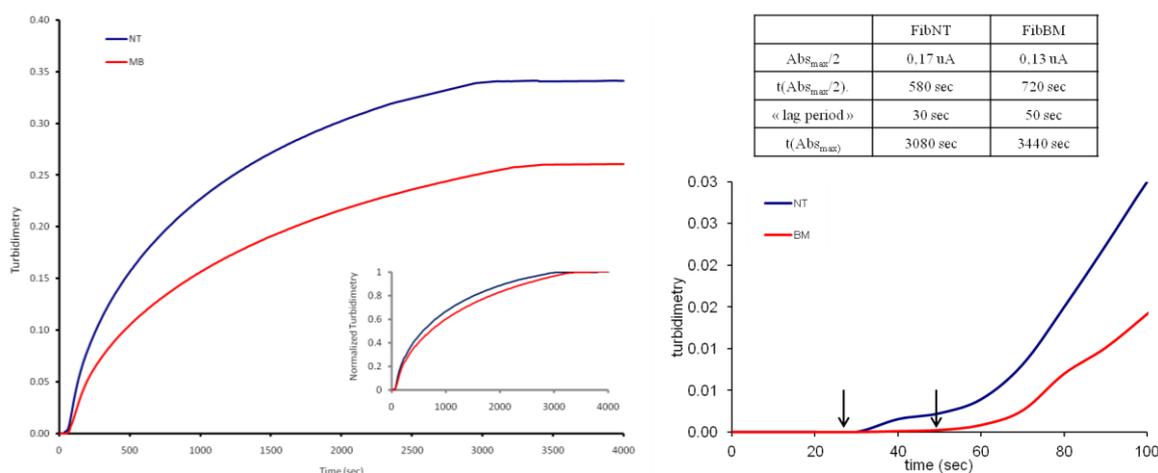


Figure 3.19 : Suivi turbidimétrique (340 nm) de la fibrinoformation (en rouge : fibrinogène issu du plasma traité ; en bleu : fibrinogène issu du plasma traité au BM/UV-vis)

3.2.2 Les fibrinopeptides : LC-MS

Au cours de la formation de fibrine, la thrombine libère le FpA et FpB des chaînes du fibrinogène α et β , pour former les monomères de fibrine qui évoluent vers les fibres de fibrines. Dès lors, nous avons décidé de nous intéresser aux fibrinopeptides présents dans le surnageant, après formation du caillot de fibrine. En effet, le FpA est un peptide de 15 acides aminés, présentant une masse théorique de 1536,5 Da ; de même, le FpB est un peptide de 14 acides aminés, avec une masse de 1569,4 Da.

Une fois la coagulation déclenchée à partir du FibNT et du FibBM, le surnageant est récupéré (10 μ L) au bout d'une heure, puis dessalé par un système SPE (ZipTip C18, Millipore), et enfin analysé par nanoLC-nanoESI-FT-ICR MS. Les TICs de chaque analyse sont présentés dans la figure suivante (Figure 3.20).

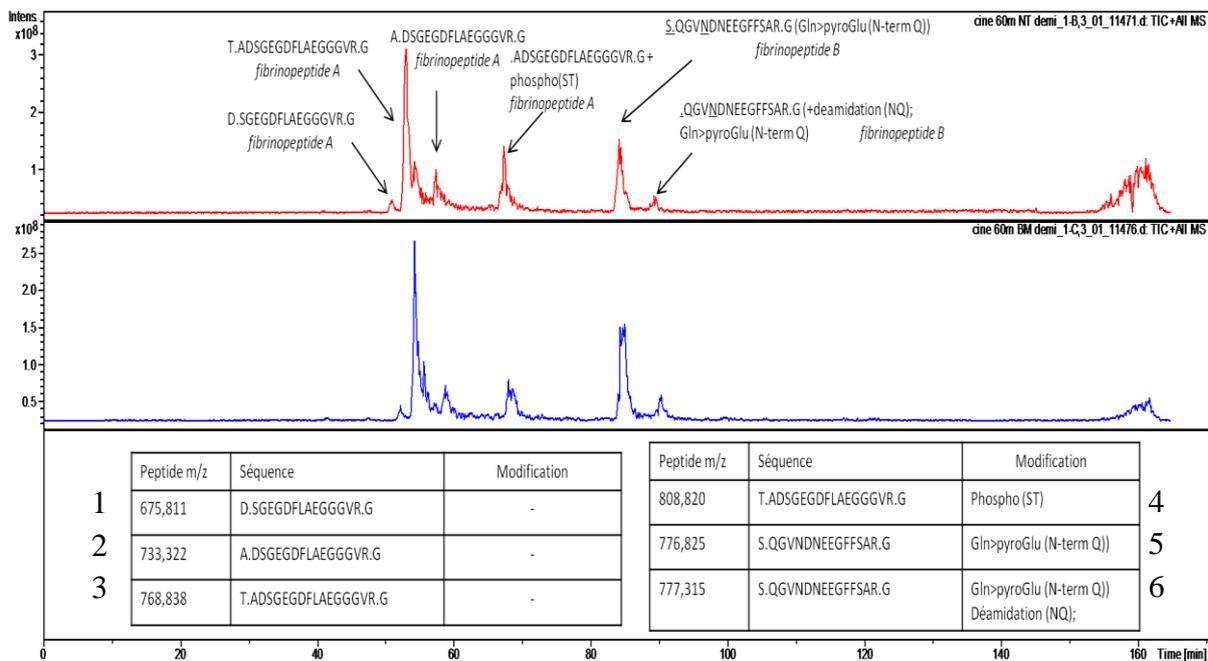


Figure 3.20 : Analyse LC-MS/MS du surnageant après conversion du fibrinogène en fibrine (en rouge : fibrinogène issu du plasma non-traité ; en bleu : fibrinogène issu du plasma traité au BM/lumière visible) et identification des fibrinopeptides et de leurs fragments

L'interrogation des banques des données a permis d'identifier plusieurs fragments des fibrinopeptides. L'annexe 3.4 rapporte le résultat de l'interrogation des banques de données avec tous les peptides identifiés avec +/- 5 ppm. Ainsi, tous les peptides sont identifiés ainsi que leurs modifications dans chaque cas. La phosphorylation du FpA sur le résidu Ser est connue [69] ; on estime entre 25 -30 % des chaînes A α phosphorylées sur cet acide aminé. Une étude cinétique a pu mettre en avant que la présence de cette modification augmentait la spécificité de la reconnaissance FpA-thrombine en vue de l'hydrolyse du fibrinogène pour libérer le FpA [70]. De plus, cette même étude suggère que le groupe phosphorylé interagit avec la thrombine (par RMPN 3P), et que cette modification renforce l'interaction des acides aminés avec la thrombine (par RMN 1H). Par ailleurs, l'addition d'acide pyrrolidone carboxylique (ou acide pyrrolidone carboxylique) correspond à la cyclisation spontanée de la glutamine N-terminale.

Nous avons, par ailleurs, cherché à comparer la quantité relative des fibrinopeptides relargués au cours de la formation de la fibrine. Ainsi, nous avons calculé les aires sous-tendues par chaque pic chromatographique (Figure 3.21). On remarque que les quantités de fibrinopeptides relargués sont plus importantes dans le cas du caillot formé à partir de FibNT. Ceci nous permet de renforcer l'idée qu'une quantité inférieure de fibrinogène prend part à la conversion en fibrine.

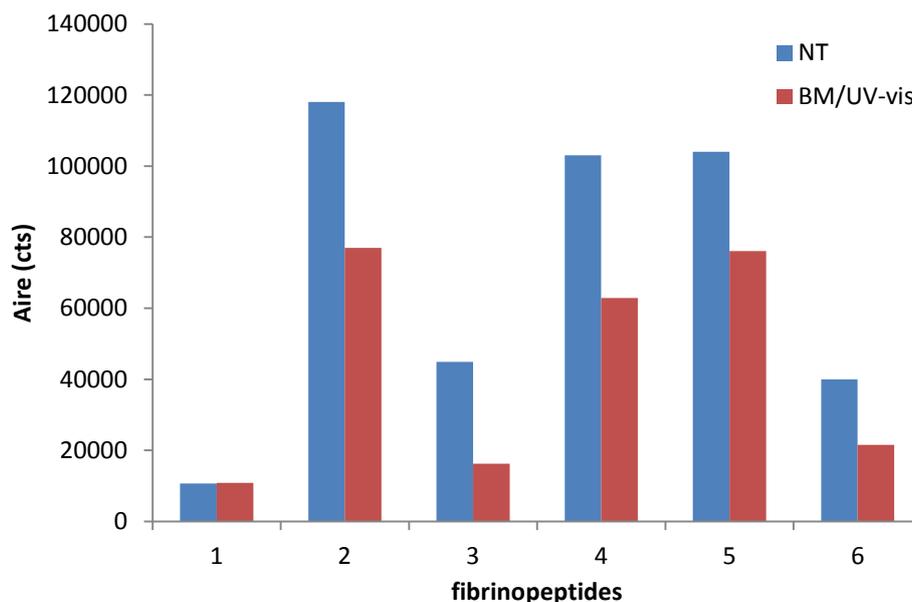


Figure 3.21 : Quantité relative des fibrinopeptides (bleu = non traité ; rouge = traité), à partir de l'intégration des appels d'ions correspondant à chaque fibrinopeptides identifiées)

3.2.3 Analyse FT-ICR du caillot de fibrine

La thrombine convertit le fibrinogène en fibrine par protéolyse dans le domaine central, libérant les FpA et FpB. Le produit de cette réaction est les monomères de fibrine.

Ainsi, nous avons récupéré la fibrine après une heure de polymérisation. Le traitement de dénaturation en présence de DTT et de TFE, utilisé dans notre protocole de digestion, suffit à solubiliser la fibrine. La digestion en solution est alors réalisée. Les peptides sont ensuite analysés par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS. Les paramètres d'interrogation des banques de données sont identiques aux précédents.

Le tableau 3.5 reprend les modifications présentes dans la fibrine issue du FibBM. Dès lors, on constate que certaines modifications déjà observées sont retrouvées. De fait, les oxydations portées par les peptides KMLEEIMKYEASILTHDSSIR (sous-unité γ), MGPTELLIEMEDWK (sous-unité β), ainsi que la déamidation portée par le peptide MELERPGGNEITR (sous-unité α) et la citrullination portée par le peptide VELEDWGRTSRADYAMFK (sous-unité γ) sont à nouveau identifiées. On parvient à identifier une double oxydation sur le NYCGLPGEYWLGNDKISQLTR (sous-unité β) sur le résidu Pro et Trp. Trois modifications supplémentaires ont pu être également mises en avant sur la chaîne α : deux oxydations sur un résidu Met sur les peptides MELERPGGNEITR et

Chapitre 3

TFPGFFSPMLGEFVSETESR, et une déamidation sur le résidu Asp porté également sur le peptide MELERPGGNEITR.

De plus, à partir des intensités des pics correspondants aux appels d'ions de ces peptides et de leur normalisation, nous avons pu évaluer une nouvelle fois l'impact du traitement BM/UV-vis sur les modifications constatées. Le tableau 3.5 récapitule ces conclusions. Il apparaît ainsi que la déamidation portée par le peptide NNKDSHSLTTNIMEILR ainsi que toutes les modifications des chaînes bêta et gamma apparaissent uniquement une fois l'échantillon traité au BM/UV-vis.

Tableau 3.5 : Récapitulatif des modifications identifiées sur la fibrine, issu du plasma après traitement BM/lumière visible.

Séquence peptidique	Modification	Résidu	chaîne	% peptide modifié FibNT	% peptide modifié FibBM	statut
MELERPGG <u>N</u> EITR	Déamidation	N	alpha	42	54	surexprimé
<u>NN</u> KDSHSLTTNIMEILR	Déamidation	N	alpha	0	68	spécifique BM
TFPGFFSP <u>M</u> LGEFVSETESR	Oxydation	M	alpha	90	98	surexprimé
<u>M</u> ELEP <u>R</u> GGNEITR	Oxydation	M	alpha	9	23	discutable
VELEDWNG <u>R</u> TSRADIYAMFK	Citrullination	R	gamma	0	98	spécifique BM
<u>K</u> MLEEIMKYEASILTHDSSIR	Oxydation	M	gamma	0	52	spécifique BM
NYCGL <u>P</u> GEY <u>W</u> LGNKD <u>K</u> ISQLTR	Oxydation	P,W	beta	0	42	spécifique BM
<u>M</u> GPTELLIEMEDWK	Oxydation	M	beta	0	11	spécifique BM

4 Discussion & Conclusion

L'objectif de ce travail avait pour but d'identifier les modifications induites sur le fibrinogène après le traitement d'inactivation virale photochimique au bleu de méthylène. Cette étude repose sur deux échantillons de plasma issus d'un même donneur. Après aphérèse, le plasma prélevé a été divisé en deux lots, dont l'un sert de référence et l'autre est traité par l'unité de production de l'EFS Nord-de-France, strictement dans les conditions d'inactivation de routine.

La complexité du plasma en termes de composition impose la mise en place d'une étape de purification du fibrinogène. C'est pourquoi nous avons évalué deux voies de purification. La première méthode repose sur HIC par approche critique proposé par Jennissen [32] où les conditions chromatographiques permettent une interaction spécifique du

fibrinogène avec un support Seph-C5, spécialement synthétisé pour notre étude. Toutefois, des protéines au caractère hydrophobe similaire sont éluées simultanément, ce qui diminue la pureté du fibrinogène préparé. La deuxième méthode utilise les travaux de Mosesson [60] et Finslay [59], récemment repris par Kollman [31]. Elle comprend ainsi une précipitation à l'éthanol correspondant à la fraction I du fractionnement de Cohn [12, 14] dont le culot est ensuite séparé par IEX sur DEAE-Sepharose par gradient de pH et de force ionique. Nous avons ainsi pu récupérer une fraction contenant près de 90 % de fibrinogène. Cette méthode a ensuite été appliquée aux deux échantillons de plasma.

Des analyses nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS, sur les peptides résultant de digestions en solution des fractions de fibrinogène, nous a permis de mettre en avant des modifications majoritaires ou spécifiques sur le fibrinogène issu de plasma ayant été traité. Ces modifications concernent des oxydations sur des résidus M, P et W, des déamidations sur des résidus N et des citrullinations sur des résidus R et enfin des carbamylations sur des résidus K. Toutes ces modifications ont été envisagées à partir de l'étude préliminaire du chapitre 2. Des modifications similaires ont été observées sur la fibrine.

Des études sur les modifications du fibrinogène ainsi que les conséquences sur son activité ont été récemment publiées. Ainsi, il apparaît que cette protéine possède une grande susceptibilité vis-à-vis des modifications oxydatives par rapport aux autres protéines plasmatiques [71, 72]. En présence d'espèces radicalaires, le fibrinogène subit plusieurs modifications post-traductionnelles qui affectent sa fonction [72-81]. Les modifications les plus observées sont des oxydations, des acétylations, des carbonylations, des nitrations et des citrullinations.

Cependant toutes ces modifications ont été réalisées in-vitro, à partir de conditions expérimentales destinées à induire de manière forcée des oxydations ou encore des nitrations, afin de valider leur implication dans des pathologies. Ainsi, de telles études suggèrent que des formes oxydées et nitrées du fibrinogène sont impliquées dans des maladies cardiovasculaires, des cas de cancers comme le cancer du poumon, des chocs septiques, des arthrites rhumatoïdes ou du diabète [82-85]. Par ailleurs, aucune d'entre elles ne caractérise ces modifications par analyse protéomique, mais toutes supposent simplement la présence des modifications à partir des conditions expérimentales employées.

Jusqu'à présent, seule la diminution de l'activité du fibrinogène a été constatée, une fois le plasma inactivé par le traitement BM/UV-vis [1, 2, 62, 86-88]. Des études protéomiques sur le plasma transfusionnel et les traitements d'inactivation sont rares.

Toutefois, les travaux de Crettaz ont pu montrer à partir de gels d'électrophorèse 2D que le traitement BM/UV-vis avait un impact sur le profil électrophorétique de certaines protéines, comme la sous-unité γ du fibrinogène, l'apolipoprotéine A1 et la transthyréline [89]. En effet, à partir de la comparaison entre un plasma non-traité, puis traité au BM, et enfin filtré, on note l'apparition d'isoformes après exposition au BM/UV-vis ; la filtration n'induit pas de modification supplémentaire. Toutefois, ni l'origine ni les modifications responsables de ces isoformes n'ont pu être clairement précisées. A partir de nos travaux, les modifications par le traitement au bleu de méthylène ont pu être ainsi identifiées et localisées pour la première fois.

La première conséquence de l'oxydation du fibrinogène est l'inhibition [90] voire l'absence de la formation [78, 91] du caillot de fibrine, selon les conditions dont les modifications ont été induites. En effet, de telles espèces sont générées au cours de l'exposition du BM à la lumière visible, au cours de réactions secondaires [92, 93]. En effet, la molécule excitée de BM est relativement stable et peut être l'objet de réarrangement électronique, grâce à ses systèmes conjugués (π - π). Cette forme réarrangée est reconnue comme un état triplet excité qui facilite l'action photo-dynamique du BM. L'état triplet excité surmonte l'énergie d'excitation d'autres molécules. L'interaction directe avec des molécules adjacentes conduit à un transfert d'électrons ou à l'abstraction d'un hydrogène allylique de molécules insaturées (processus de type 1) et/ou à la formation d'espèces radicalaires (processus de type 2).

Dès 1978, l'effet du bleu de méthylène a été souligné pour la première fois par Inada qui a mis en avant la photo-oxydation du fibrinogène ainsi que son effet sur sa polymérisation [62]. Notre étude turbidimétrique a pu le confirmer une nouvelle fois. Nous avons également pu nous rendre compte que la cinétique de fibrinof ormation est globalement maintenue, mais que la quantité de fibrinogène impliquée apparaît inférieure. Ces conclusions sont confortées par une étude récente portant sur l'étude de l'activité du fibrinogène et sur l'indice de polymérisation de la fibrine [88], et sont en accord avec les observations faites dans des cas de dysfibrinogénémie [3, 94, 95]. Par ailleurs, l'étude des fibrinopeptides A et B a souligné qu'une fois le fibrinogène exposé au BM, une quantité moins importante de fibrinopeptides était relarguée. Ceci est cohérent avec le retard de l'initiation de la polymérisation (« lag-period » plus longues) et l'absorbance finale inférieure mesurée après traitement.

Les travaux de cette étude permettent d'expliquer, pour la première fois, l'origine de l'altération du fibrinogène au cours du traitement photochimique d'inactivation au bleu de

Chapitre 3

méthylène, démontrant l'intérêt et l'apport de la protéomique à la médecine transfusionnelle. Cette étude est également prolongée par un nombre de plasma non-traité/traité plus important afin d'appuyer nos résultats.

De plus, à partir des outils mis en place, il apparaît désormais possible d'étendre ce type d'étude aux autres traitements photochimiques actuellement en place, tels que l'inactivation à l'amotosalen ou à la riboflavine. Ces traitements sont également susceptibles d'induire des modifications similaires, dans la mesure où elles reposent sur l'irradiation de molécules photosensibles (UVA pour l'amotosalen, UV-visible pour la riboflavine)

Afin d'approfondir nos travaux, une étude de l'évolution de la conformation des chaînes du fibrinogène avec l'apparition des modifications est envisagée pour comprendre pleinement leur impact sur la structure de cette protéine ainsi que les répercussions sur son activité. Un intérêt similaire sera porté sur la structure du caillot de fibrine.

Par ailleurs, un travail en collaboration avec Macopharma, le fabricant du traitement au bleu de méthylène, a débuté visant à améliorer le procédé d'inactivation utilisant le bleu de méthylène, en stabilisant par exemple le fibrinogène au cours du traitement de façon à minimiser l'impact de ce traitement sur le fibrinogène.

Bibliographie

1. Solheim BG: Pathogen reduction of blood components. *Transfusion and Apheresis Science* 2008; **39**:75-82.
2. Zeiler T, Riess H, Wittmann G, et al.: The effect of methylene blue phototreatment on plasma proteins and in vitro coagulation capability of single-donor fresh-frozen plasma. *Transfusion* 1994; **34**:685-9.
3. Mosesson MW: Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; **3**:1894-904.
4. Grieninger G: Contribution of the α EC Domain to the Structure and Function of Fibrinogen-420. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001; **936**:44-64.
5. Mosesson MW: Fibrinogen γ chain functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003; **1**:231-8.
6. Zhang JZ, Redman CM: Role of interchain disulfide bonds on the assembly and secretion of human fibrinogen. *Journal of Biological Chemistry* 1994; **269**:652-8.
7. Zhang J-Z, Redman C: Fibrinogen Assembly and Secretion. *Journal of Biological Chemistry* 1996; **271**:30083-8.
8. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA: The Structure and Biological Features of Fibrinogen and Fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001; **936**:11-30.
9. Schaller J, Gerber S, Kämpfer U, Lejon S, Trachsel C, eds. Human Blood Plasma Proteins : Structure and Functions. Chichester; 2008.
10. Blombäck B, Hessel B, Hogg D, Therkildsen L: A two-step fibrinogen--fibrin transition in blood coagulation. *Nature (London, U K)* 1978; **275**:501-5.
11. Cohn E, Luetscher J, Oncley J, Armstrong S, Davis B: Preparation and properties of serum and plasma proteins : Size and charge of proteins separating upon equilibration across membranes with ethanol-water mixtures of controlled pH, ionic strength and temperature *Journal of the American Chemical Society* 1940; **62**:3396-33400.
12. Cohn EJ, Oncley JL, Strong LE, Hughes WL, Armstrong SH: Chemical, clinical and immunological studies of products of human plasma fractionation : I. the characterization of the protein fractions of human plasma. *Journal of Clinical Investigation* 1944; **23**:417-32.
13. Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, et al.: Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids1a,b,c,d. *Journal of the American Chemical Society* 1946; **68**:459-75.
14. Cohn E: The separation of blood into fractions of therapeutic value. *Annals of Internal Medicine* 1947; **26**:341-52.
15. Cohn EJ, Gurd FRN, Surgenor DM, et al.: A System for the Separation of the Components of Human Blood: Quantitative Procedures for the Separation of the Protein Components of Human Plasma1a,b,c. *Journal of the American Chemical Society* 1950; **72**:465-74.
16. Blomback B, Blomback M: Purification of human and bovine fibrinogen. 1956; **10**:415-43.
17. McFarlane: Behaviour of Lipoids in Human Serum. *Nature (London, U K)* 1942; **149**:439.
18. Kekwick R, MacKay M, Nance M, Record B: The purification of human fibrinogen. *Biochemistry journal* 1955; **60**:671-83.
19. Kekwick R, MacKay M, Record B: Fractionation of Human Plasma with Ether. *Nature (London, U K)* 1946; **157**:629.

20. Kazal L, Amsel S, Miller O, Tocantins L: The preparation and some properties of fibrinogen precipitated from human plasma by glycine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1963; **113**.
21. Mosesson MW, Sherry S: The Preparation and Properties of Human Fibrinogen of Relatively High Solubility. *Biochemistry* 1966; **5**:2829-35.
22. Jakobsen E, Kierulf P: A modified beta-alanine precipitation procedure to prepare fibrinogen free of antithrombin-III and plasminogen. *Thrombosis Research* 1973; **3**:145-59.
23. Godal H: Precipitation of Human Fibrinogen with Heparin. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory* 1960; **12**:56-65.
24. Kantor F: Fibrinogen precipitation by streptococcal M protein *The Journal of Experimental Medicine* 1965; **121**:861-72.
25. Matthias FR, Hocke G, Lasch HG: Isolation of fibrinogen from plasma by affinity chromatography on insolubilized fibrinogen (FG-ag) and insolubilized fibrin-monomer (FM-ag). *Thrombosis Research* 1975; **7**:861-70.
26. Suzuki K, Nishioka J, Hashimoto S: A simple technique for purification of fibrinogen from plasma by affinity chromatography on ristocetin-agarose. *Thrombosis Research* 1980; **18**:707-15.
27. Kuyas C, Haeberli A, Walder P, Straub PW: Isolation of human fibrinogen and its derivatives by affinity chromatography on Gly-Pro-Arg-Pro-Lys-Fractogel. *Thromb Haemostasis* 1990; **63**:439-44.
28. Kaufman DB, Hentsch ME, Baumbach GA, et al.: Affinity purification of fibrinogen using a ligand from a peptide library. *Biotechnology and Bioengineering* 2002; **77**:278-89.
29. Liu C-Z, Cheng H-J, Chang L-Y: A new feasible method for fibrinogen purification based on the affinity of *Staphylococcus aureus* clumping factor A to fibrinogen. *Protein Expression and Purification* 2008; **61**:31-5.
30. Masahiro O, Yahiro U, Noriyuki T. Quality control material for plasma fibrinogen test produced from purified human fibrinogen. In: Hindawi Publishing Corporation; 2003.
31. Kollman JM, Pandi L, Sawaya MR, Riley M, Doolittle RF: Crystal Structure of Human Fibrinogen. *Biochemistry* 2009; **48**:3877-86.
32. Jennissen HP, Demiroglou A: Interaction of fibrinogen with n-alkylagaroses and its purification by critical hydrophobicity hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 2006; **1109**:197-213.
33. Jennissen HP. Hydrophobic Interaction Chromatography. In: eLS: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
34. Melander W, Horváth C: Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1977; **183**:200-15.
35. Fausnaugh JL, Regnier FE: Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Chromatography A* 1986; **359**:131-46.
36. Janson J-C, Rydén L. In: Protein Separation and Purification: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2008:617-42.
37. Van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK: Nature of the antigen-antibody interaction. Primary and secondary bonds: optimal conditions for association and dissociation. *Journal of Chromatography* 1986.
38. Fausnaugh JL, Kennedy LA, Regnier FE: Comparison of hydrophobic-interaction and reversed-phase chromatography of proteins. *Journal of Chromatography A* 1984; **317**:141-55.
39. Regnier FE: The role of protein structure in chromatographic behavior. *Science* 1987; **238**:319-23.

40. El Rassi Z: Recent progress in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrate species. *Journal of Chromatography A* 1996; **720**:93-118.
41. Moore S, Stein W: Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *Journal of Biological Chemistry* 1951; **192**:663-81.
42. Malmquist G, Nilsson UH, Norrman M, Skarp U, Strömgren M, Carredano E: Electrostatic calculations and quantitative protein retention models for ion exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* 2006; **1115**:164-86.
43. Nordborg A, Hilder E: Recent advances in polymer monoliths for ion-exchange chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2009; **394**:71-84.
44. Krenkova J, Gargano A, Lacher NA, Schneiderheinze JM, Svec F: High binding capacity surface grafted monolithic columns for cation exchange chromatography of proteins and peptides. *Journal of Chromatography A* 2009; **1216**:6824-30.
45. Haddad PR, Nesterenko PN, Buchberger W: Recent developments and emerging directions in ion chromatography. *Journal of Chromatography A* 2008; **1184**:456-73.
46. Simpson RJ. Purifying proteins for proteomics: a laboratory manual: CSHL Press; 2004.
47. Regnier FE, Gooding KM: High-performance liquid chromatography of proteins. *Analytical Biochemistry* 1980; **103**:1-25.
48. Kovac S, Yang X, Huang F, Hixson D, Josic D: Proteomics as a tool for optimization of human plasma protein separation. *Journal of Chromatography A* 2008; **1194**:38-47.
49. Goheen SC, Hilsenbeck JL: High-performance ion-exchange chromatography and adsorption of plasma proteins. *Journal of Chromatography A* 1998; **816**:89-96.
50. Sober HA, Gutter FJ, Wyckoff MM, Peterson EA: Chromatography of Proteins. II. Fractionation of Serum Protein on Anion-exchange Cellulose. *Journal of the American Chemical Society* 1956; **78**:756-63.
51. Shimano H, Yamada N, Ishibashi S, et al.: Oxidation-labile subfraction of human plasma low density lipoprotein isolated by ion-exchange chromatography. *Journal of Lipid Research* 1991; **32**:763-73.
52. Aizawa P, Winge S, Karlsson G: Large-scale preparation of thrombin from human plasma. *Thrombosis Research* 2008; **122**:560-7.
53. Mori F, Nardini I, Rossi P, Nardini C, Farina C: Progress in large-scale purification of factor VIII/von Willebrand factor concentrates using ion-exchange chromatography. *Vox Sanguinis* 2008; **95**:298-307.
54. Josic D, Schwinn H, Stadler M, Strancar A: Purification of factor VIII and von Willebrand factor from human plasma by anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1994; **662**:181-90.
55. Teh LC, Froger M: Direct Capture of Plasma Factor VIII:C by Ion Exchange Chromatography. *Vox Sanguinis* 1994; **67**:8-13.
56. Francis CW, Keele EM, Marder VJ: Purification of three [gamma]-chains with different molecular weights from normal human plasma fibrinogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1984; **797**:328-35.
57. Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW: Plasma Factor XIII Binds Specifically to Fibrinogen Molecules Containing γ' Chains. *Biochemistry* 1996; **35**:10448-53.
58. Kyte J, Doolittle RF: A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 1982; **157**:105-32.
59. Finlayson JS, Mosesson MW: Heterogeneity of Human Fibrinogen. *Biochemistry* 1963; **2**:42-6.
60. Mosesson MW, Finlayson JS, Umfleet RA, Galanakis D: Human Fibrinogen Heterogeneities. *Journal of Biological Chemistry* 1972; **247**:5210-9.

61. Davey FR, Carrington CE, Nelson DA: Comparison of Rapid Clottable Fibrinogen Assays. *Clin Chem* 1972; **18**:1360-3.
62. Inada Y, Hessel B, Blombäck B: Photooxidation of fibrinogen in the presence of methylene blue and its effect on polymerization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 1978; **532**:161-70.
63. Suontaka A-M, Blombäck M, Chapman J: Changes in functional activities of plasma fibrinogen after treatment with methylene blue and red light. *Transfusion* 2003; **43**:568-75.
64. Pamphilon D: Viral inactivation of fresh frozen plasma. *British Journal of Haematology* 2000; **109**:680-93.
65. Rock G: A comparison of methods of pathogen inactivation of FFP. *Vox Sanguinis* 2011; **100**:169-78.
66. György B, Tóth E, Tarcsa E, Falus A, Buzás EI: Citrullination: A posttranslational modification in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2006; **38**:1662-77.
67. van Venrooij WJ, Pruijn GJM: Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000; **2**:249 - 51.
68. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, et al.: Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nature Medicine* 2007; **13**:1176-84.
69. Blombäck B, Blombäck M, Edman P, Hessel B: Amino-Acid Sequence and the Occurrence of Phosphorus in Human Fibrinopeptides. *Nature (London, U K)* 1962; **193**:883-4.
70. Maurer MC, Peng J-L, An SS, Trosset J-Y, Henschen-Edman A, Scheraga HA: Structural Examination of the Influence of Phosphorylation on the Binding of Fibrinopeptide A to Bovine Thrombin†. *Biochemistry* 1998; **37**:5888-902.
71. Shacter E, Williams JA, Lim M, Levine RL: Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: Examination by western blot immunoassay. *Free Radical Biology and Medicine* 1994; **17**:429-37.
72. Nowak P, Zbikowska HM, Ponczek M, Kolodziejczyk J, Wachowicz B: Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: Functional consequences. *Thrombosis Research* 2007; **121**:163-74.
73. Nielsen VG, Crow JP, Mogal A, Zhou F, Parks DA: Peroxynitrite Decreases Hemostasis in Human Plasma In Vitro. *Anesthesia & Analgesia* 2004; **99**:21-6.
74. Shacter E: Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews* 2000; **32**:307-26.
75. Stief TW, Kurz J, Doss MO, Fareed J: Singlet Oxygen Inactivates Fibrinogen, Factor V, Factor VIII, Factor X, and Platelet Aggregation of Human Blood. *Thrombosis Research* 2000; **97**:473-80.
76. Gugliucci A: Human Plasminogen Is Highly Susceptible to Peroxynitrite Inactivation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2003; **41**:1064-8.
77. Nowak P, Kołodziejczyk J, Wachowicz B: Peroxynitrite and fibrinolytic system: The effect of peroxynitrite on plasmin activity. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004; **267**:141-6.
78. Shacter E, Williams JA, Levine RL: Oxidative modification of fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed clot formation. *Free Radical Biology and Medicine* 1995; **18**:815-21.
79. Selmeçi L, Székely M, Soós P, et al.: Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels. *Free Radical Research* 2006; **40**:952-8.
80. Sauls DL, Lockhart E, Warren ME, Lenkowski A, Wilhelm SE, Hoffman M: Modification of Fibrinogen by Homocysteine Thiolactone Increases Resistance to

Fibrinolysis: A Potential Mechanism of the Thrombotic Tendency in Hyperhomocysteinemia. *Biochemistry* 2006; **45**:2480-7.

81. Ponczek M, Nowak P, Wachowicz B: The effects of nitronium ion on nitration, carbonylation and coagulation of human fibrinogen *General Physiology and Biophysics* 2008; **27**:55-8.

82. Pignatelli B, Li CQ, Boffetta P, et al.: Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer Research* 2001; **61**:778-84.

83. Vadseth C, Souza JM, Thomson L, et al.: Pro-thrombotic State Induced by Post-translational Modification of Fibrinogen by Reactive Nitrogen Species. *Journal of Biological Chemistry* 2004; **279**:8820-6.

84. Aldred S, Grant MM, Griffiths HR: The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. *Clinical Biochemistry* 2004; **37**:943-52.

85. Kaur H, Halliwell B: Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Letters* 1994; **350**:9-12.

86. Naegelen C, Isola H, Dernis D, et al.: Evolution of techniques for preparation of labile blood products (LBP): pathogen inactivation in LBP. *Transfusion Clinique et Biologique* 2009; **16**:179-89.

87. Solheim BG, Seghatchian J: The six questions of pathogen reduction technology: An overview of current opinions. *Transfusion and Apheresis Science* 2008; **39**:51-7.

88. Depasse F, Sensebé L, Seghatchian J, Andreu G, Samama M-M: The influence of methylene blue light treatment and methylene blue removal filter on fibrinogen activity states and fibrin polymerisation indices. *Transfusion and Apheresis Science* 2005; **33**:63-9.

89. Crettaz D, Sensebe L, Vu D-H, et al.: Proteomics of methylene blue photo-treated plasma before and after removal of the dye by an absorbent filter. *Proteomics* 2004; **4**:881-91.

90. Tetik S, Kaya K, Yardimci TK: Effect of Oxidized Fibrinogen on Hemostatic System: In Vitro Study. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2010; **17**:259-63.

91. Lupidi G, Angeletti M, Eleuteri AM, Tacconi L, Coletta M, Fioretti E: Peroxynitrite-mediated oxidation of fibrinogen inhibits clot formation. *FEBS Letters* 1999; **462**:236-40.

92. Davies MJ: Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; **305**:761-70.

93. Davies MJ: Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2004; **3**:17-25.

94. Haverkate F, Samama M: Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia - Report on a study of the SSC subcommittee on fibrinogen. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; **73**:151-61.

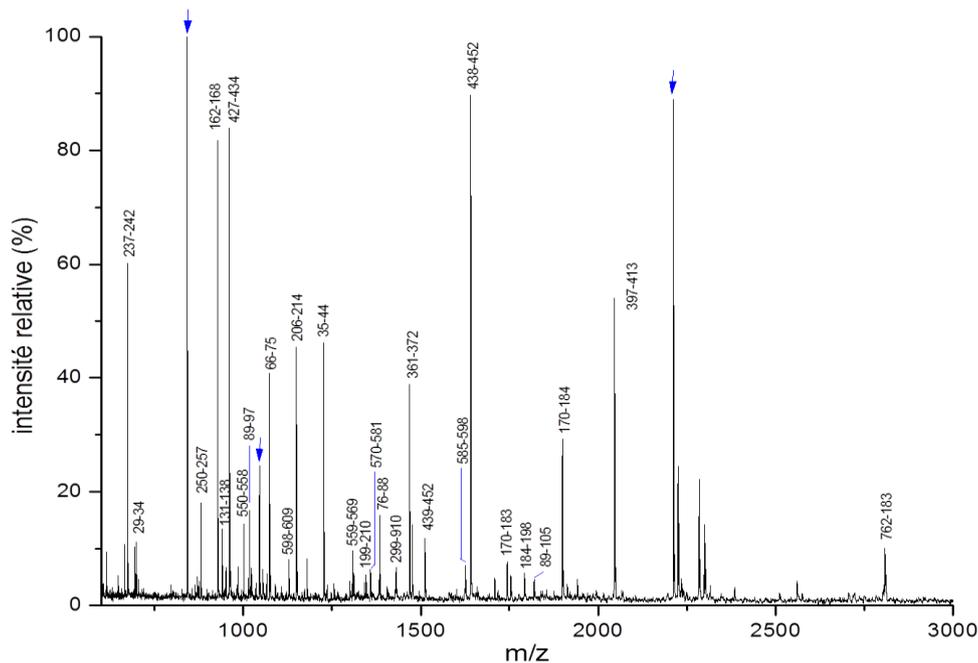
95. Weisel JW. Fibrinogen and Fibrin. In: David ADP, John MS, eds. *Advances in Protein Chemistry*: Academic Press; 2005:247-99.

Annexes

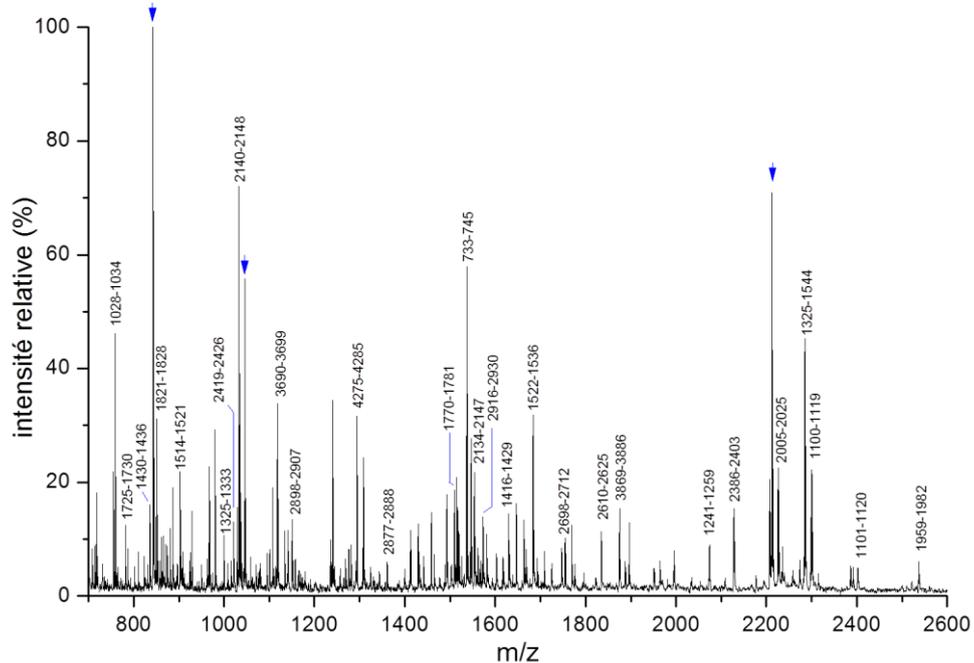
Annexe 3.1 : Les facteurs de coagulation

Numéro	Nom usuel	Demi-vie	Concentration massique	Fonction
I	Fibrinogène	3,5 – 4,5 jours	2 – 4 g/L	Substrat
II	Prothrombine	60 h	110 mg/L	Protéase à sérine
III	Thromboplastine tissulaire ou facteur tissulaire	-	-	Cofacteur
IV	<i>Calcium</i>		-	<i>Cofacteur</i>
V	Proaccélélerine	12 h	4 – 10 mg/L	Cofacteur
VII	Proconvertine	2 – 2,5 h	0,4 – 0,6 mg/L	Protéase à sérine
VIII	Facteur anti-hémophilique A	8 – 12 h	0,1 – 0,4 mg/L	Cofacteur
IX	Facteur anti-hémophilique B (ou facteur de Christmas)	18 – 24 h	3 – 5 mg/L	Protéase à sérine
X	Facteur de Stuart	40 h	7 – 10 mg/L	Protéase à sérine
XI	Antécédent plasmatique de la thromboplastine	30 – 60 h	4 – 6 mg/L	Protéase à sérine
XII	Facteur de Hageman	50 – 70 h	24 mg/L	Protéase à sérine
XIII	Facteur stabilisant de la fibrine	10 – 14 jours	22 mg/L	Transglutaminase
	Prékallikréine		35 – 50 mg/L	Protéase à sérine
	Kininogène de haut poids moléculaire	2 – 3 jours	55 – 93 mg/L	Protéase à sérine

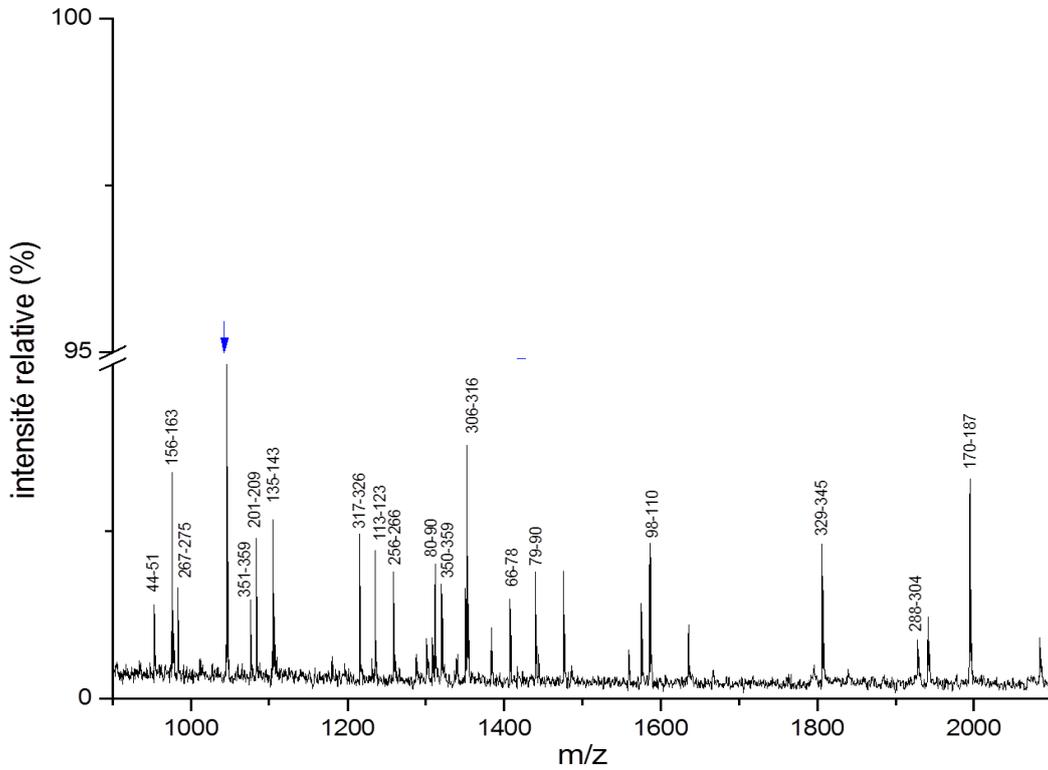
Annexe 3.2 : PMF correspondant à l'albumine, après purification par HIC, électrophorèse 1D en conditions non-dénaturation, digestion en gel et analyse parMALDI-TOF MS (les flèches bleues correspondent aux pics d'autolyse de la trypsine)



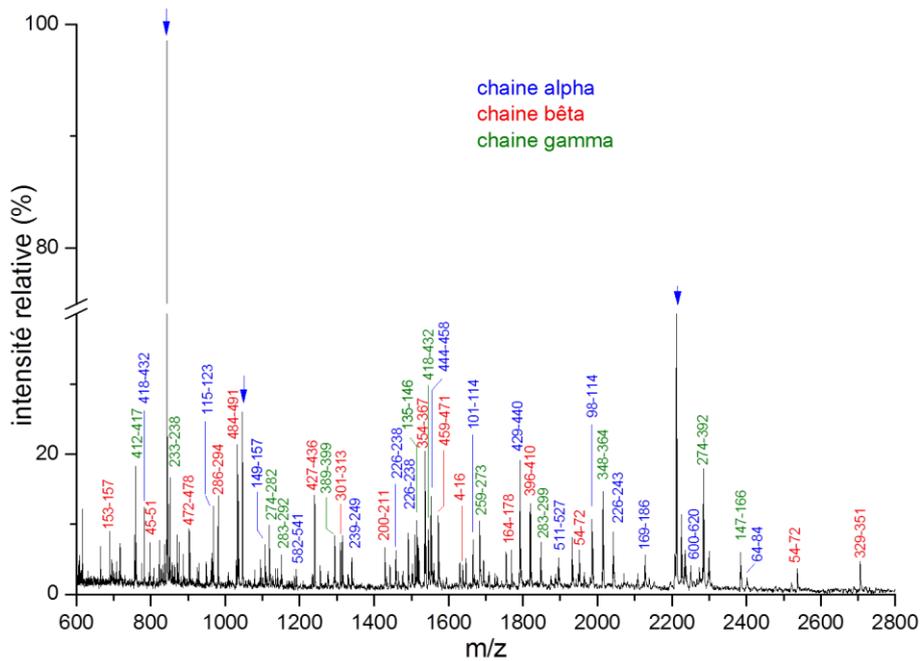
Annexe 3.3 : PMF correspondant à l'apolipoprotéine B, après purification par HIC, électrophorèse 1D en conditions non-dénaturation, digestion en gel et analyse parMALDI-TOF MS (les flèches bleues correspondent aux pics d'autolyse de la trypsine)



Annexe 3.4 : PMF correspondant à l'apolipoprotéine A4, après purification par HIC, électrophorèse 1D en conditions non-dénaturantes, digestion en gel et analyse parMALDI-TOF MS (les flèches bleues correspondent aux pics d'autolyse de la trypsine)



Annexe 3.5 : PMF correspondant au fibrinogène, après purification par HIC, électrophorèse 1D en conditions non-dénaturantes, digestion en gel et analyse parMALDI-TOF MS (les flèches bleues correspondent aux pics d'autolyse de la trypsine)



Annexe 3.6 : Identification des trois sous-unités à partir de la fraction A1 de l'éluion de la fraction Cohn I sur DEAE (Gradient pH et gradient de sel),

Fibrinogen alpha chain precursor [Contains: Fibrinopeptide A] - Homo sapiens (Human)

Sequence Coverage: 56% Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MFSMRIVCLV LSVVGTAWTA DSGEGDFLAE GGGVRGPRVV ERHQSACKDS
51 DWPFCSDEDW NYKCPSGCRM KGLIDEVNQD FTNRINKLKN SLFEYQKNNK
101 DSHSLTTNIM EILRGDFSSA NNRDNTYNRV SEDLRSRIEV LKRKVKIEKVQ
151 HIQLLQKNVR AQLVDMKRLE VDIKIRSC RGSCSRALAR EVDLKDIEDQ
201 QKQLEQVIK DLLPSRDRQH LPLIKMKPVP DLVPGNFKSQ LQKVPPEWKA
251 LTDMPQMRME LERPGGNEIT RGGSTSYGTG SETESPRNPS SAGSWNSGSS
301 GPGSTGNRNP GSSGTGGTAT WKPGSSGPGS TGSWNSGSSG TGSTGNQNP
351 SPRPGSTGTW NPGSSERGSA GHWTSESSVS GSTGQWHSES GSFPRDPSGS
401 GNARPNPDW GTFEEVSGNV SPGTRREYHT EKLVTSGDK ELRTGKEKVT
451 SGSTTTTTRS CSKTVTKVI GPDGHKEVTK EVVTSEDGSD CPEAMDGLTL
501 SGIGTLDFGR HRHPDEAAFF DTASTGKTFP GFFSPMLGEF VSETESRGSE
551 SGIFTNTKES SSHHPGIAEF PSRGKSSSYS KQFTSSTSYN RGDSTFESKS
601 YKMADEAGSE ADHEGTHSTK RGHAKSRPVR DCDDVLQTHP SGTQSGIFNI
651 KLPSSKIFS VYCDQETSLG GWLLIQRMD GSLNFRNTWQ DYKRGFGLN
701 DEGEFEWLG NDYLHLLTQR GSVLVELED WAGNEAYAAY HFRVGSEAG
751 YALQVSSYEG TAGDALIEGS VEEGAEYTSN NNMQFSTFDR DADQWEENCA
801 EVYGGGWYN NCQAANLNGI YYPGGSYDPR NNSPYEIENG VVWVSFRGAD
851 YSLRAVRMKI RPLVTQ

Fibrinogen beta chain precursor [Contains: Fibrinopeptide B] - Homo sapiens (Human)

Sequence Coverage: 61% Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MKRMVSWSFH KLKTMKHL LLLCVFLVKS QGVNDNEEGF FSARGHRPLD
51 KKREEAPSLR PAPPISGGG YRARPAAAA TQKKVERKAP DAGGCLHADP
101 DLGVLCTGC QLQEALLQQE RPIRNSVDEL NNNVEAVSQT SSSFQYMYL
151 LKDLWQKRQK QVKDNENVVN EYSSELEKHQ LYIDETVNSN IPTNLRVLR
201 ILENLRSKI QKLESDVSAQM EYCRTPCTVS CNIPVVSQKE CEEIRKGG
251 TSEMYLIQPD SSVKPYRVYC DMNTENGGWT VIQNRQDGSV DFGRKWDPYK
301 QGFGNVATNT DGKNYCGLPG EYWLGNKIS QLTRMGPTL LIEMEDWKGD
351 KVKAHYGGFT VQNEANKYQI SVNKYRGTAG NALMDGASQL MGENRTMTIH
401 NGMFFSTYDR DNDGWLTS DP RKQCSKEDGG GWWYNRCHAA NPNGRYYWGG
451 QYTWDMAKHG TDDGVVWMNW KGSWYSMRKM SMKIRPFPQ Q

Fibrinogen gamma chain precursor - Homo sapiens (Human)

Sequence Coverage: 43% Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MSWSLHPRNL ILYFYALLFL SSTCVAYVAT RDNCCILDER FGSYCPTTCG
51 IADFLSTYQT KVDKDLQSL E DILHQVENKT SEVKLIKAI QLTYNPDESS
101 KPNMIDAATL KSRKMLEEIM KYEASILTHD SSIRYLQEIY NSNNQKIVNL
151 KEKVAQLEAQ CQEPCKDTVQ IHDITGKDCQ DIANKGAKQS GLYFIKPLKA
201 NQQFLVYCEI DGSGNGWTVF QKRLDGSVDF KKNWIQYKEG FGHLSPGTG
251 EFWLGNKIH LISTQSAIPY ALRVELEDWN GRTSTADYAM FKVGPADKY
301 RLTYAYFAGG DAGDAFDGFD FGDDPSDKFF TSHNGMQFST WDNDNDKFEG
351 NCAEQDGSW WMNKCHAGHL NGVYQGGTY SKASTPNGYD NGIIWATWKT
401 RWYSMKKTTM KIIPFNRLTI GEGQQHHLGG AKQVRPEHPA ETEYDSLPE
451 DDL

Annexe 3.7 : Recouvrement de séquence pour chaque sous-unité de fibrinogène, après analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS et interrogation MASCOT à partir de Swissprot (à gauche = fibrinogène purifié à partir du plasma non-traité, à droite, encadré = le fibrinogène purifié à partir du plasma après traitement BM/lumière visible.)

Fibrinogène Alpha – 62%

```

1 MFSMRIVCLV LSVVGTAWIA DSGEGDFLAE GGGVGRPRVV ERHQSACKDS
51 DWPFCSDEDW NYKCPGRCRM KGLIDEVNDQ FTNRINKLRN SLFEYQKNNK
101 DSHSLTTNIM EILRGDFSSA NNRDNTYNRV SEDLSRRIEV LKRKVIKRVQ
151 HIQLLQKQNR AQLVDMKRL EVDIDIKRSC RGSCSRALAR EVDLKDVEDQ
201 QKQLEQVIK DLLPSRDRQH LPLIRMKPVP DLVPGNFKSQ LQKVPEWKA
251 LTDMPQMRME LERPGQNEIT RGGSTSYGTG SETESPRNPS SAGSWNSGSS
301 GPGSTGNRNP GSSGTGGTAT WKPSSSGPGS TGSWNSGSSG TGSTGNQMPG
351 SPRPGSTGTW NPGSSERGSA GHWTSESSVS GSTGQWHS ESFRPDSPGS
401 GNARFNNPDW GTFEEVSGNV SPGTRREYHT EKLVTSEKDK ELRTGKEKVT
451 SGTSTTTTRS CSKIVTKVI GPDGHREVTK EVVTSDESDS CPEAMDGLTL
501 SGIGTLDGFR HRHPDEAAFF DTASTGKTFP GFFSPMLGEF VSETESRGSE
551 SGIFTNTKES SSHHPGIAEF PSRGKSSSYS KQFTSSTSYN RGDSTFESKS
601 YKMADEAGSE ADHEGTHSTK RGHAKSRPVR GIHTSPLGKP SLSP
    
```

Fibrinogène Beta – 68%

```

1 MKRMVSWSFH KLKTMKHL LLLCVFLVKS QGVNDNEEGF FSARGHRPLD
51 KKREAPSLR PAPPFISGG YRARPAKAAA TQKVERKAP DAGGCLHADP
101 DLGVLCPGTC QLQEALLQE RPIRNSVDEL NNNVEAVSQT SSSSFQMYL
151 LKDLWQKRQK QVKDNEMVNV EYSSELEKQ LYIDETVNSN IPTNLRVLS
201 ILENLRSKIQ KLES DVSAQM EYCRTPCTVS CNIPVVSQGE CEEIIRKQGE
251 TSEMYLIQPD SSVKPYRVYC DMNTENGGWT VIQNRQDGSV DFGRKWDPYK
301 QGFGNVATNT DGNKYCGLPG EYWLGNDKIS QLTRMGPTL LIEMEDWKG
351 KVKAHYGGFT VQNEANKYQI SVNKYRGTAG NALMDGASQL MGENRMTIH
401 NGMFFSTYDR DNDGWLISDP RKQCSKEDGG GWYNYRCHAA NPNGRYVWGG
451 QYTWDMARKH TDDGVVMMWV KGSWYSMRKM SMKIRPFPPQ Q
    
```

Fibrinogène Gamma – 75%

```

1 MSWSLHPRNL ILYFYALLFL SSTCVAYVAT RDNCCLIDER FGSYCPTTGG
51 IADFLSTYQT KVDKDLQSL EILHQVENKT SEVKLIKAI QLYTNPDESS
101 KPNMIDAATL KSRKMLEEIM KYEASILTHD SSIRYLQEIY NSNNQKIVNL
151 KERVAQLEAQ CQEPCKDVTQ IHDITGKDCQ DIANKGARQS GLYFIKPLKA
201 NQQFLVYCEI DSGNGWTVF QKRLDGSVDF KKNWIKYKQG FGHLSPTGTT
251 EFWLGNEKIH LISTQSAIPY ALRVELEDWN GRTSTADYAM FRVGPADKY
301 RLTYAYFAGG DAGDAFDGFD FGDDPSDKFF TSHNGMST WNDNDKFEF
351 NCAEQDSSGW WMNKCHAGHL NGVYVQGGTY SKASTPNGYD NGIINATWKT
401 RWYSMKKTTM KIIFPNRLTI GEGQQHHLGG AKQVRPEHPA ETEYDSLYPE
451 DDL
    
```

Fibrinogène Alpha – 63%

```

1 MFSMRIVCLV LSVVGTAWIA DSGEGDFLAE GGGVGRPRVV ERHQSACKDS
51 DWPFCSDEDW NYKCPGRCRM KGLIDEVNDQ FTNRINKLRN SLFEYQKNNK
101 DSHSLTTNIM EILRGDFSSA NNRDNTYNRV SEDLSRRIEV LKRKVIKRVQ
151 HIQLLQKQNR AQLVDMKRL EVDIDIKRSC RGSCSRALAR EVDLKDVEDQ
201 QKQLEQVIK DLLPSRDRQH LPLIRMKPVP DLVPGNFKSQ LQKVPEWKA
251 LTDMPQMRME LERPGQNEIT RGGSTSYGTG SETESPRNPS SAGSWNSGSS
301 GPGSTGNRNP GSSGTGGTAT WKPSSSGPGS TGSWNSGSSG TGSTGNQMPG
351 SPRPGSTGTW NPGSSERGSA GHWTSESSVS GSTGQWHS ESFRPDSPGS
401 GNARFNNPDW GTFEEVSGNV SPGTRREYHT EKLVTSEKDK ELRTGKEKVT
451 SGTSTTTTRS CSKIVTKVI GPDGHREVTK EVVTSDESDS CPEAMDGLTL
501 SGIGTLDGFR HRHPDEAAFF DTASTGKTFP GFFSPMLGEF VSETESRGSE
551 SGIFTNTKES SSHHPGIAEF PSRGKSSSYS KQFTSSTSYN RGDSTFESKS
601 YKMADEAGSE ADHEGTHSTK RGHAKSRPVR GIHTSPLGKP SLSP
    
```

Fibrinogène Beta – 74%

```

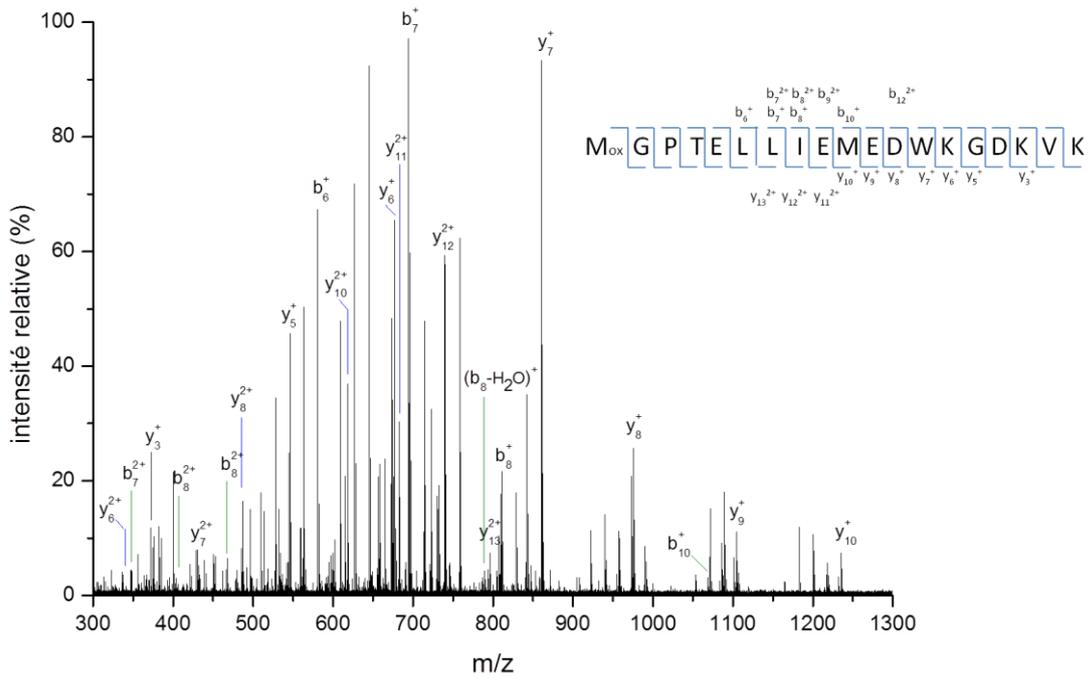
1 MKRMVSWSFH KLKTMKHL LLLCVFLVKS QGVNDNEEGF FSARGHRPLD
51 KKREAPSLR PAPPFISGG YRARPAKAAA TQKVERKAP DAGGCLHADP
101 DLGVLCPGTC QLQEALLQE RPIRNSVDEL NNNVEAVSQT SSSSFQMYL
151 LKDLWQKRQK QVKDNEMVNV EYSSELEKQ LYIDETVNSN IPTNLRVLS
201 ILENLRSKIQ KLES DVSAQM EYCRTPCTVS CNIPVVSQGE CEEIIRKQGE
251 TSEMYLIQPD SSVKPYRVYC DMNTENGGWT VIQNRQDGSV DFGRKWDPYK
301 QGFGNVATNT DGNKYCGLPG EYWLGNDKIS QLTRMGPTL LIEMEDWKG
351 KVKAHYGGFT VQNEANKYQI SVNKYRGTAG NALMDGASQL MGENRMTIH
401 NGMFFSTYDR DNDGWLISDP RKQCSKEDGG GWYNYRCHAA NPNGRYVWGG
451 QYTWDMARKH TDDGVVMMWV KGSWYSMRKM SMKIRPFPPQ Q
    
```

Fibrinogène Gamma – 65%

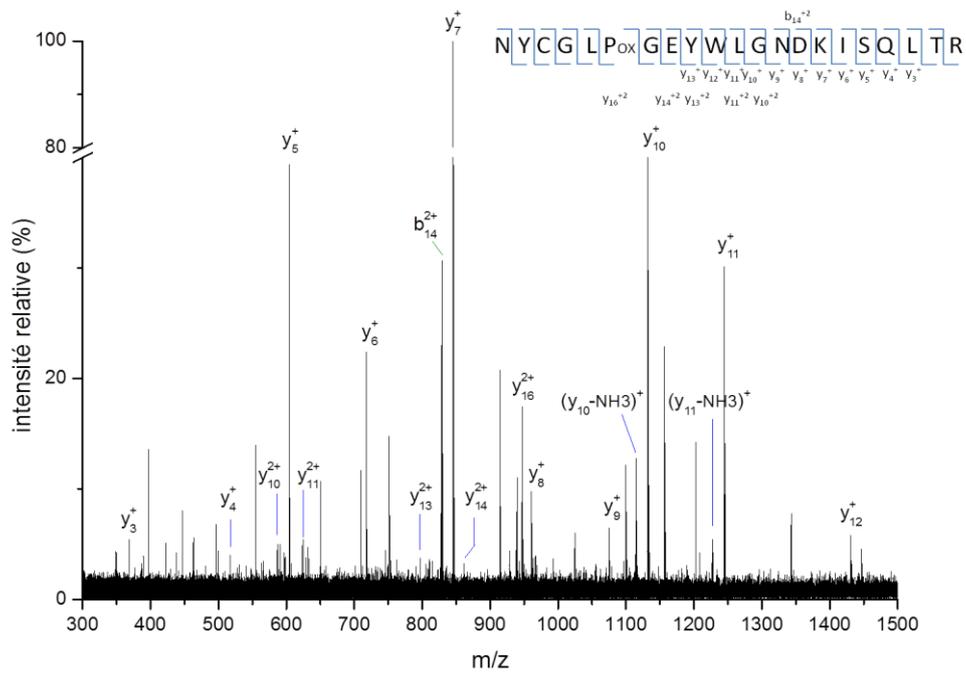
```

1 MSWSLHPRNL ILYFYALLFL SSTCVAYVAT RDNCCLIDER FGSYCPTTGG
51 IADFLSTYQT KVDKDLQSL EILHQVENKT SEVKLIKAI QLYTNPDESS
101 KPNMIDAATL KSRKMLEEIM KYEASILTHD SSIRYLQEIY NSNNQKIVNL
151 KERVAQLEAQ CQEPCKDVTQ IHDITGKDCQ DIANKGARQS GLYFIKPLKA
201 NQQFLVYCEI DSGNGWTVF QKRLDGSVDF KKNWIKYKQG FGHLSPTGTT
251 EFWLGNEKIH LISTQSAIPY ALRVELEDWN GRTSTADYAM FRVGPADKY
301 RLTYAYFAGG DAGDAFDGFD FGDDPSDKFF TSHNGMST WNDNDKFEF
351 NCAEQDSSGW WMNKCHAGHL NGVYVQGGTY SKASTPNGYD NGIINATWKT
401 RWYSMKKTTM KIIFPNRLTI GEGQQHHLGG AKQVRPEHPA ETEYDSLYPE
451 DDL
    
```

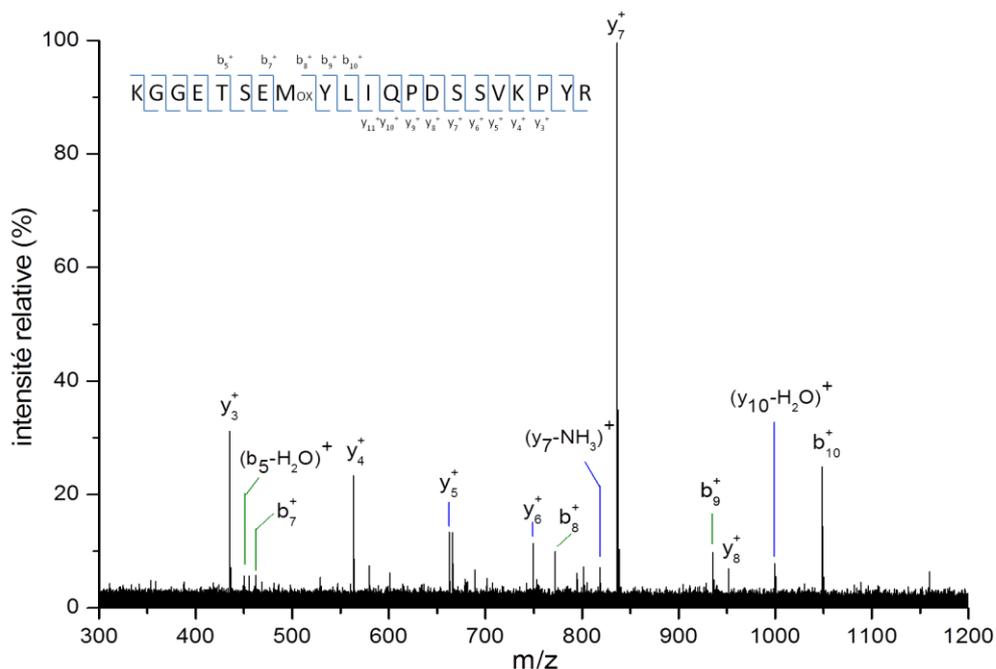
Annexe 3.8 : Spectre MS/MS du peptide MGPTELLIEMEDWKGDVK (sous-unité bêta) présentant une oxydation sur un résidu Met.



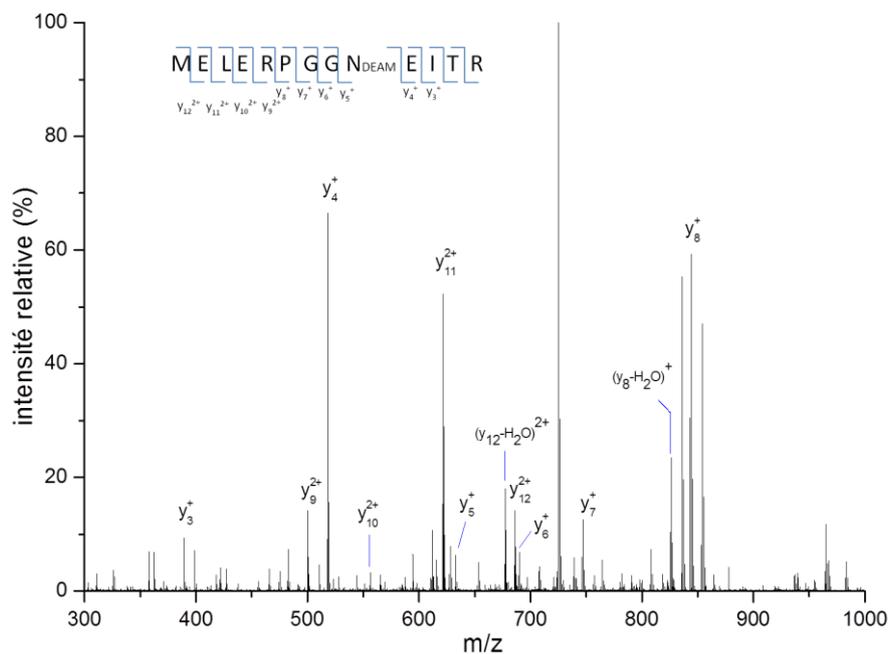
Annexe 3.9 : Spectre MS/MS du peptide NYCGLPGEYWLGNKISQLTR (sous-unité bêta) présentant une oxydation sur un résidu Pro.



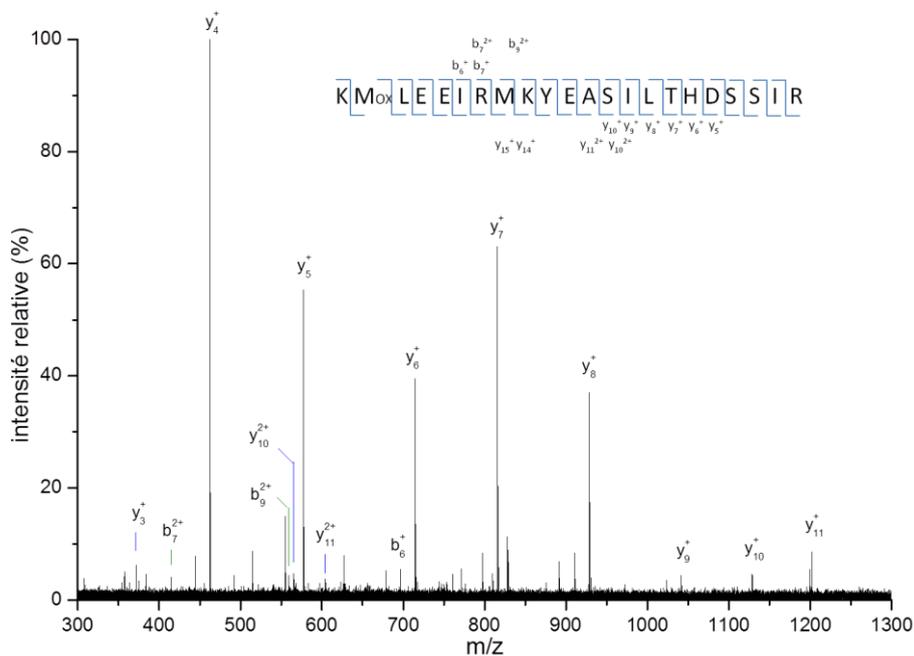
Annexe 3.10 : Spectre MS/MS du peptide KGGTSEMYLIQPDSSVKPYR (sous-unité bêta) présentant une oxydation sur un résidu Met.



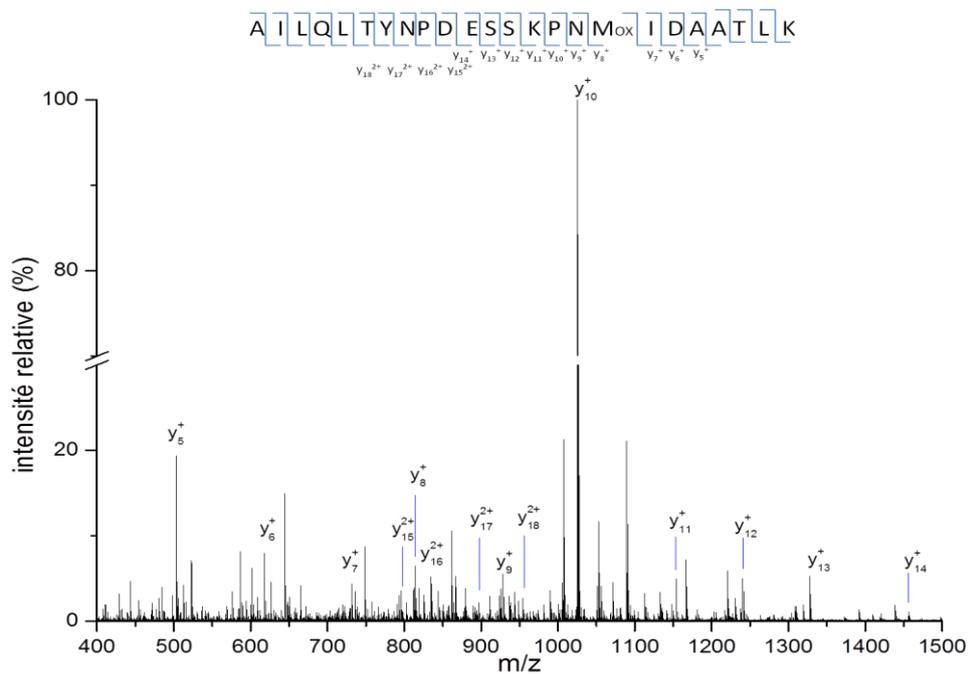
Annexe 3.11 : Spectre MS/MS du peptide MELERPGGND_{DEAM}EITR (sous-unité alpha) présentant une déamidation sur un résidu Asp.



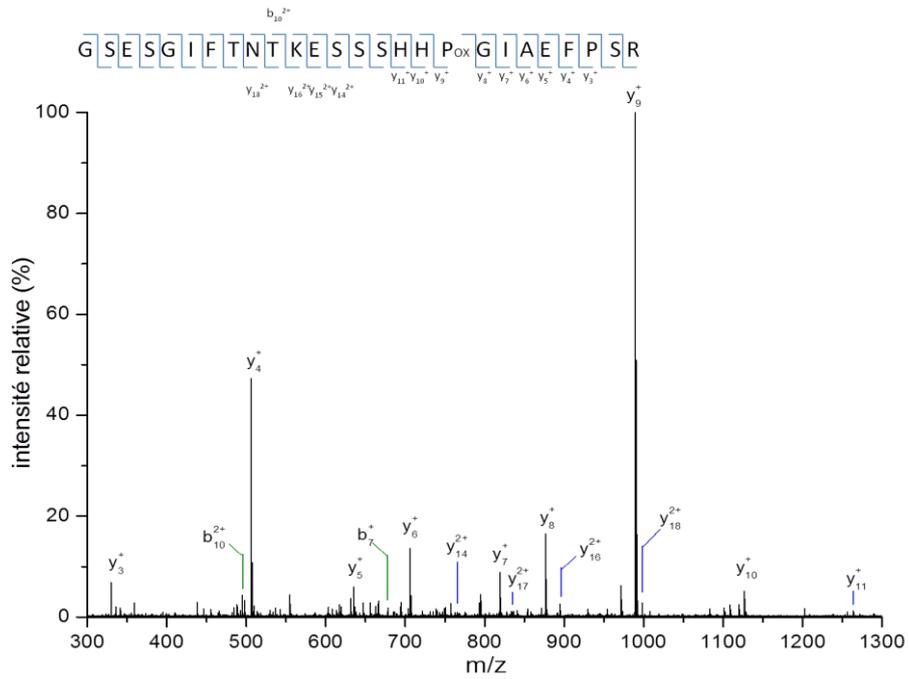
Annexe 3.12 : Spectre MS/MS du peptide KM_{ox}LEEI₂RMKYEASILTHDSSIR (sous-unité gamma) présentant une oxydation sur un résidu Met.



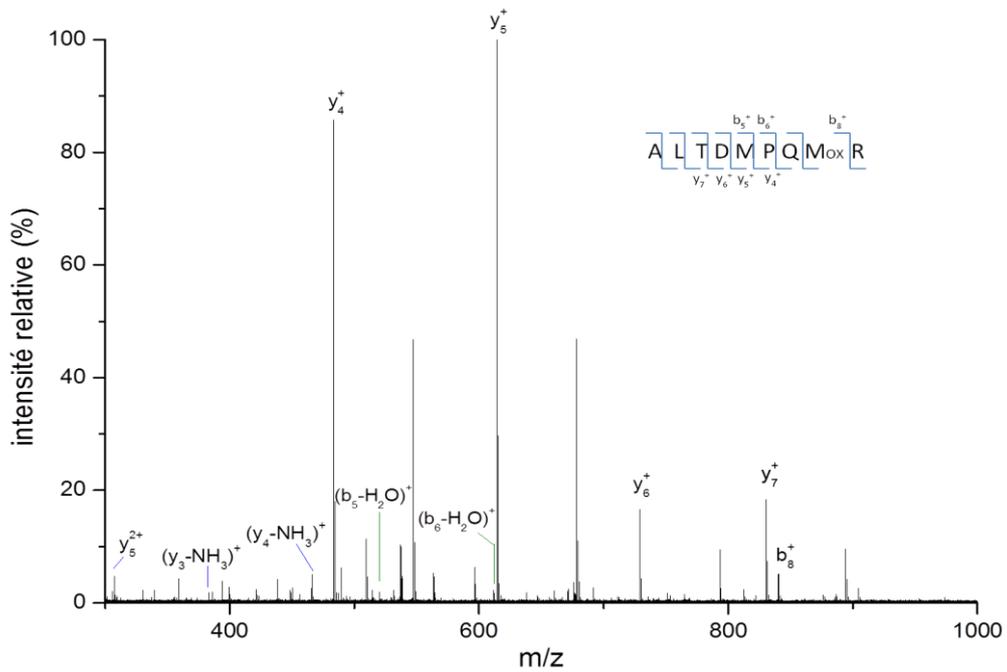
Annexe 3.13 : Spectre MS/MS du peptide AILQLTYNPDESSKPNM_{ox}IDAATLK (sous-unité gamma) présentant une oxydation sur un résidu Met.



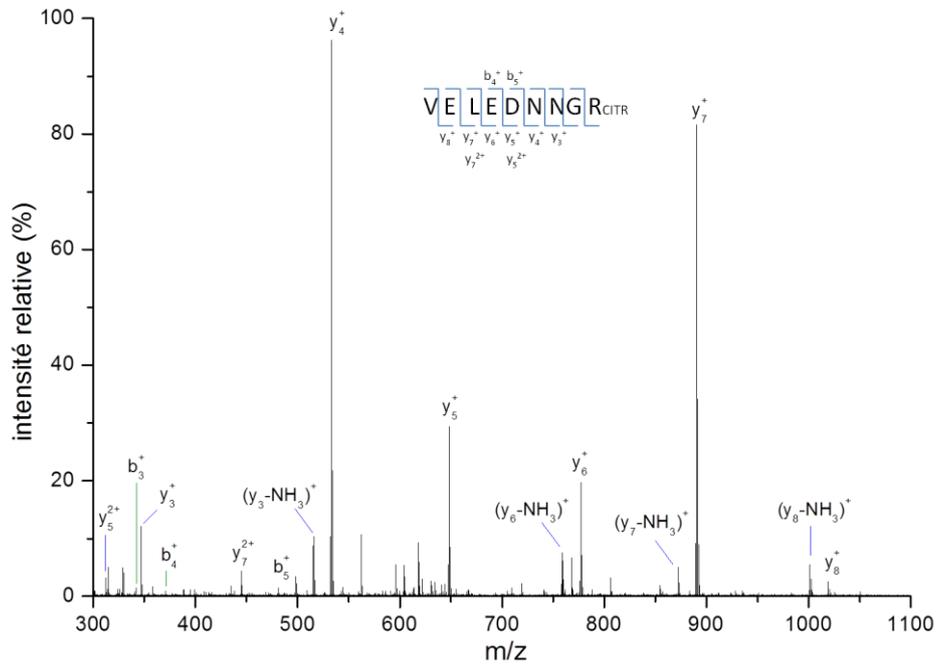
Annexe 3.14 : Spectre MS/MS du peptide GSESGIFNTNTKESSSHHP_{ox}GIAEFPSR (sous-unité alpha) présentant une oxydation sur un résidu Pro.



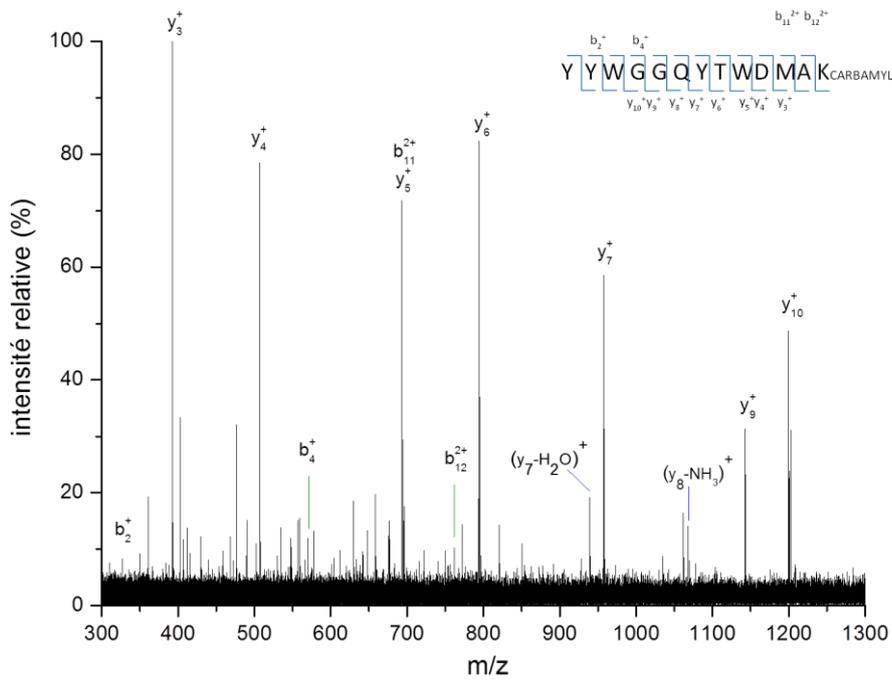
Annexe 3.15 : Spectre MS/MS du peptide ALTDMPQMR (sous-unité alpha) présentant une oxydation sur un résidu Met.



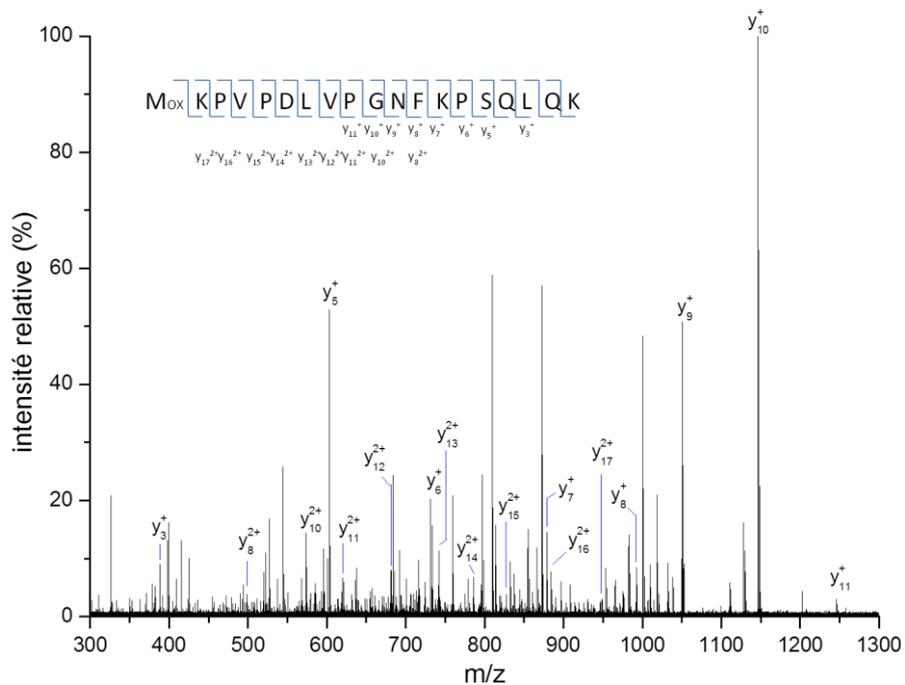
Annexe 3.16 : Spectre MS/MS du peptide VELEDNNGR (sous-unité gamma) présentant une citrullination sur un résidu Arg.



Annexe 3.17 : Spectre MS/MS du peptide YYWGGQYTWDMAK (sous-unité gamma) présentant une oxydation sur un résidu Lys.



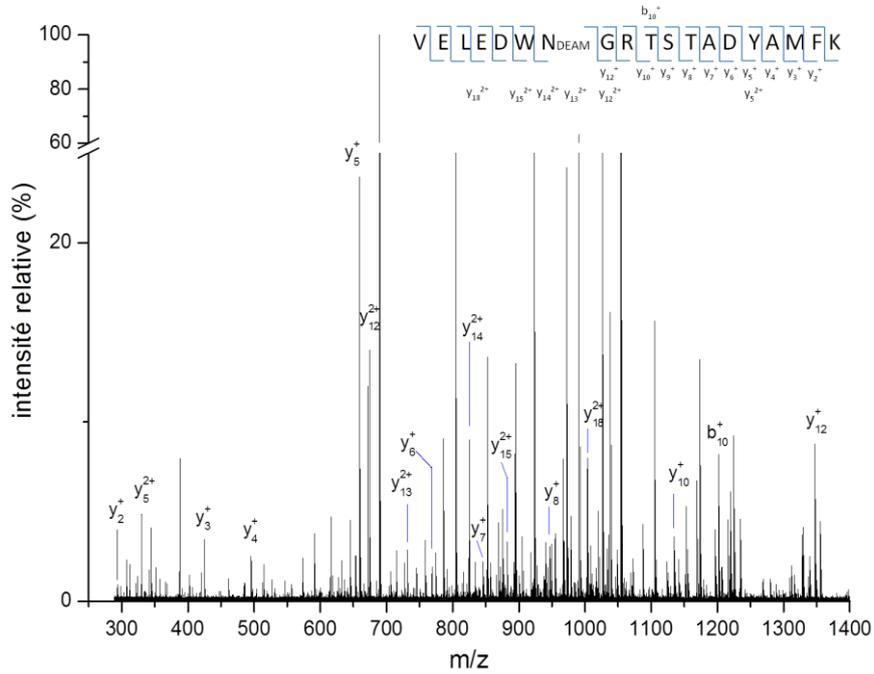
Annexe 3.18 : Spectre MS/MS du peptide MKPVPDLVPGNFKPSQLQK (sous-unité gamma) présentant une oxydation sur un résidu Met.



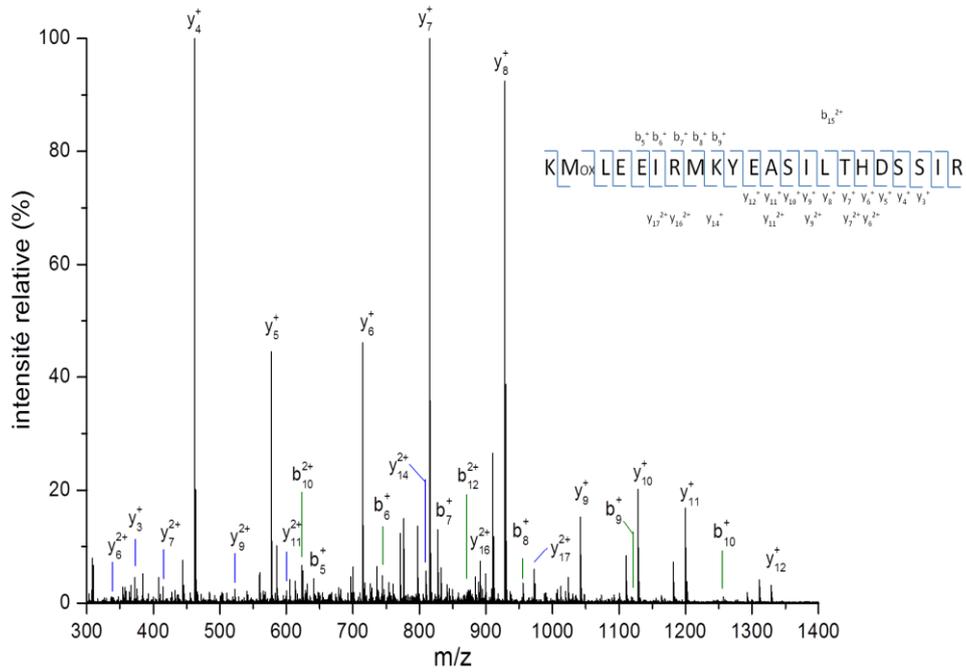
Annexe 3.19 : Identification des fibrinopeptides présents dans le surnageant après la formation du caillot de fibrine.

Protéine	Masse de l'ion multichargé (m/z)	Masse calculé du peptide correspondant (Da)	Masse théorique du peptide (Da)	Précision (ppm)	Séquence du peptide	Modification
FIBA_HUMAN	808,829	1615,6435	1615,6516	-5,0	ADSGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBA_HUMAN	768,8461	1535,6777	1535,6852	-4,9	ADSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	808,8292	1615,6438	1615,6516	-4,8	ADSGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBA_HUMAN	768,8462	1535,6779	1535,6852	-4,8	ADSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	768,8465	1535,6785	1535,6852	-4,4	ADSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	768,8474	1535,6803	1535,6852	-3,2	ADSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	768,8476	1535,6806	1535,6852	-3,0	ADSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	808,8307	1615,6469	1615,6516	-2,9	ADSGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBA_HUMAN	768,8477	1535,6808	1535,6852	-2,9	ADSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	808,8316	1615,6486	1615,6516	-1,9	ADSGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBA_HUMAN	808,8323	1615,65	1615,6516	-1,0	ADSGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBA_HUMAN	768,8492	1535,6839	1535,6852	-0,8	ADSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	768,8496	1535,6847	1535,6852	-0,3	ADSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	808,8328	1615,6511	1615,6516	-0,3	ADSGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBA_HUMAN	768,8503	1535,6861	1535,6852	0,6	ADSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	808,8336	1615,6527	1615,6516	0,7	ADSGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBA_HUMAN	808,8339	1615,6533	1615,6516	1,1	ADSGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBA_HUMAN	808,8342	1615,6539	1615,6516	1,4	ADSGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBA_HUMAN	808,8353	1615,656	1615,6516	2,7	ADSGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBA_HUMAN	808,8355	1615,6564	1615,6516	3,0	ADSGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBA_HUMAN	808,8355	1615,6564	1615,6516	3,0	ADSGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBA_HUMAN	808,8364	1615,6583	1615,6516	4,1	ADSGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBA_HUMAN	645,3295	644,3223	644,3242	-2,9	AEGGGVR	
FIBA_HUMAN	645,3327	644,3254	644,3242	1,9	AEGGGVR	
FIBA_HUMAN	510,7592	1019,5039	1019,5036	0,3	DFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	733,3288	1464,6431	1464,6481	-3,4	DSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	733,3295	1464,6444	1464,6481	-2,5	DSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	733,3307	1464,6468	1464,6481	-0,9	DSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	733,3336	1464,6527	1464,6481	3,1	DSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	733,3337	1464,6529	1464,6481	3,3	DSGEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	592,6178	1774,8316	1774,8235	4,6	DSGEGDFLAEGGGVVRGPR	
FIBA_HUMAN	603,794	1205,5735	1205,5677	4,8	EGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	574,2926	573,2853	573,2871	-3,1	EAGGGVR	
FIBA_HUMAN	574,2948	573,2875	573,2871	0,7	EAGGGVR	
FIBA_HUMAN	574,2969	573,2896	573,2871	4,4	EAGGGVR	
FIBA_HUMAN	632,2994	1262,5842	1262,5891	-3,9	GEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	632,3044	1262,5943	1262,5891	4,1	GEGDFLAEGGGVR	
FIBA_HUMAN	445,25	444,2427	444,2445	-4,1	GGGVR	
FIBA_HUMAN	445,2518	444,2445	444,2445	0,0	GGGVR	
FIBA_HUMAN	445,2525	444,2452	444,2445	1,6	GGGVR	
FIBA_HUMAN	715,803	1429,5915	1429,5875	2,8	SGEGDFLAEGGGVR	Phospho (ST)
FIBB_HUMAN	586,2526	1170,4907	1170,4942	-3,0	DNEEGFFSAR	
FIBB_HUMAN	586,2537	1170,4929	1170,4942	-1,1	DNEEGFFSAR	

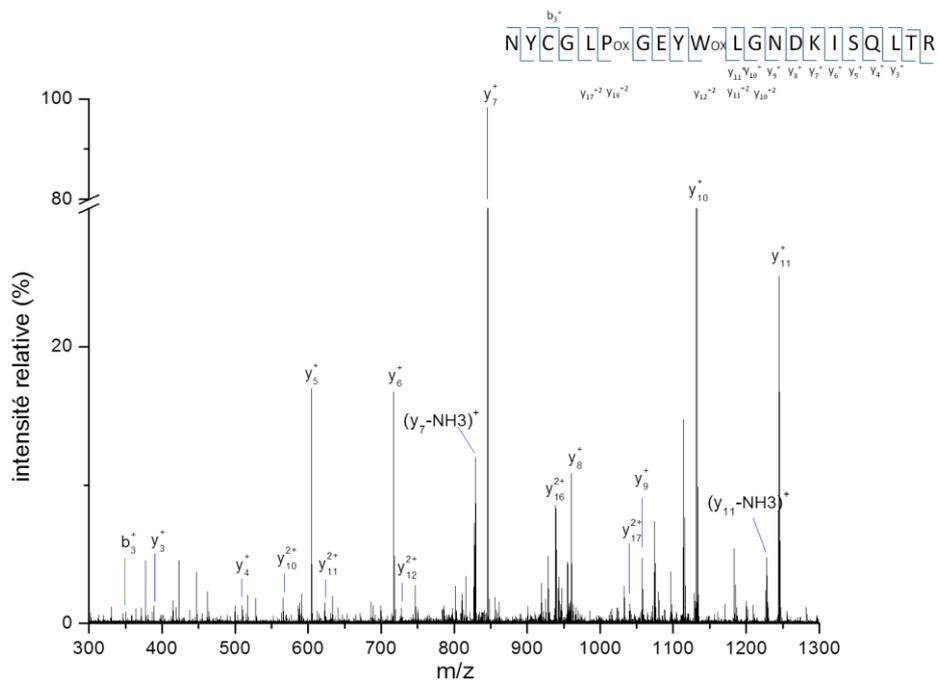
Annexe 3.23 : Spectre MS/MS du peptide VELERDWN^{DEAM}GR^{b₁₆⁺}TSTADYAMFK présentant une déamidation sur un résidu Asp.



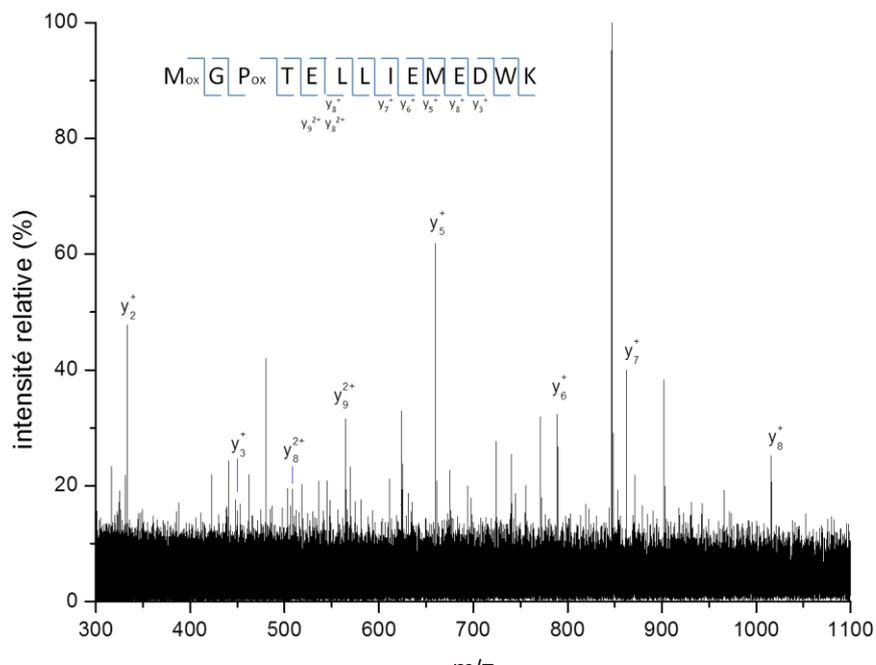
Annexe 3.24 : Spectre MS/MS du peptide KM^{ox}LEEIRMKYEASILTHDSSIR présentant une oxydation sur un résidu Met.



Annexe 3.25 : Spectre MS/MS du peptide NYCGLPGEYWLGN⁺DKISQLTR (sous-unité bêta) présentant une oxydation sur un résidu Pro et Trp



Annexe 3.26 : Spectre MS/MS du peptide NYCGLPGEYWLGN⁺DKISQLTR (sous-unité bêta) présentant une oxydation sur un résidu Met et Pro.



Chapitre 4

Etude d'un marqueur de dégradation plasmatique

Sommaire

1	Contexte de l'étude	224
1.1	Marqueur technique de dégradation	224
1.1.1	La « Retinol Binding Protein 4 »	225
1.1.2	La transthyréline.....	226
1.1.3	Le complexe	227
1.1.4	Protéomique et quantification absolue	228
1.1.5	Les stratégies de quantification absolue.....	231
2	Mise en place de la stratégie de quantification AQUA	233
2.1	Démarche générale	234
2.2	La stratégie de quantification AQUA.....	235
2.2.1	Caractérisation de la RBP4 par MS et MS/MS	235
2.2.2	Les peptides AQUA	238
2.2.3	Quantification.....	242
3	Purification de la RBP4	246
3.1	Point bibliographique	247
3.1.1	Exclusion stérique	248
3.1.2	Précipitation séquentielle	254
3.1.3	Immuno-chromatographie	256
4	Suivi de dégradation plasmatique	261
5	Conclusion	262

Bibliographie - Annexes

Tables des figures

Figure 4.1 : Structure 3D de la RBP4 [3]. En rouge = hélice alpha, en jaune = feuillet B, en vert = boucle variable, gris = le rétinol 226

Figure 4.2 : Structure 3D de la transthyréline tétramérique. Chaque monomère consiste de deux feuillets comprenant quatre bandes antiparallèles (chaque monomère est représenté par une couleur différente) 227

Figure 4.3 : Structure 3B de la RBP complexée dans la transthyréline. Deux molécules de RBP (représentées en rose) avec le rétinol (en bleu) forment un complexe homotétramérique de transthyréline. 228

Figure 4.4 : méthodologie MS pour la quantification absolue de protéines [20]. (A) quantification absolue par analyse LC-MS utilise des peptides marqués qui possèdent les mêmes propriétés chromatographiques que le peptide natif, seule leur différence de masse permet de les distinguer. (B) quantification par LC-SRM où l'on suit les transitions les plus intenses et caractéristiques entre les paires de précurseurs/ions fragments d'un peptide protéotypique..... 230

Figure 4.5 : Les trois stratégies de quantification absolue existantes, et leur intégration dans une démarche « Bottom-Up »[20]..... 233

Figure 4.6 : Démarche expérimentale de la quantification AQUA..... 235

Figure 4.7 : PMF de la RBP4 obtenue par MALDI-TOF/TOF..... 236

Figure 4.8 : Chromatogramme du TIC correspondant à l'analyse nanoLC nanoESI-Qq-TOF d'un digest de RBP4 dessalé sur Ziptip® au méthanol (quantité injectée : 1 pmole) 237

Figure 4.9 : Chromatogramme du TIC correspondant à l'analyse nanoLC nanoESI-Qq-TOF d'un digest de RBP4 dessalé sur Ziptip® au méthanol (quantité injectée : 1 pmole) 237

Figure 4.10 : Position des 3 peptides sélectionnés pour la synthèse des peptides AQUA..... 239

Figure 4.11 : spectre de fragmentation du peptide 2 (peptide108-117, ion dichargé m/z 599,6) obtenu avec une énergie de collision de 20 eV 240

Figure 4.12 : Spectre de fragmentation du peptide 2 (peptide108-117, ion dichargé m/z 599,6) obtenu avec une énergie de collision de 30 eV 240

Figure 4.13 : (a) EIC de chaque peptide (endogène et marqué) présentant une coélution pour chaque paire de peptides. 242

Figure 4.14 : A gauche, Chromatogramme du TIC d'un digest de plasma (1 pmol injecté) par nanoLC-nanoESI-Qq-TOF MS. A droite, les EIC des ions m/z 581,1 et 599,6..... 243

Chapitre 4

- Figure 4.15 : A gauche, le chromatogramme du TIC d'un digest de plasma (1 pmol injecté) par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS. A droite, les EIC des ions m/z 581,28 et 583,27..... 243
- Figure 4.16 : A gauche, chromatogramme du TIC d'un digest de plasma déplété (1 pmol injecté) par nanoLC-nanoESI-Qq-TOF MS. A droite, le EIC des ions m/z 599,80. 244
- Figure 4.17 : Différents dispositifs d'ultrafiltration utilisés. Les systèmes Amicon® et Vivaspin® qui utilisent des membranes tangentielles, et le système Centriscart® qui utilise une membrane perpendiculaire. 249
- Figure 4.18 : Gel 1D SDS-PAGE (12%T) des fractions recueillies après ultrafiltration sur Amicon® 30 kDa. 249
- Figure 4.19 : Gel 1D SDS-PAGE (14%T) des fractions recueillies après ultrafiltration sur Centriscart® 20 kDa pour vérifier l'efficacité de la membrane 250
- Figure 4.20 : Chromatogramme d'un échantillon de plasma sur Sephadex G50 (colonne préparée au laboratoire)..... 252
- Figure 4.21 : à gauche, le chromatogramme d'un échantillon de plasma obtenu sur colonne Hitrap (Sephadex G50) ; à droite, gel 1D SDS-PAGE (12%T) correspondant à la séparation des fractions recueillies (maxima d'intensité)..... 252
- Figure 4.22 : à gauche, le chromatogramme d'un échantillon de plasma obtenu sur colonne analytique Superdex PC 200 3.2/100 ; à droite, gel 1D SDS-PAGE (12%T) correspondant à la séparation des fractions recueillies..... 253
- Figure 4.23 : La série d'Hofmeister 254
- Figure 4.24 : Suivi de la précipitation séquentielle au sulfate d'ammonium d'un échantillon de plasma. A gauche, gel 1D SDS-PAGE avec les quatre taux de saturation testés (entre 30% et 60%). A droite, le spectre MS/MS de l'ion 581,1 correspondant au peptide 38-47 de la RBP4, obtenu après excision et digestion en gel de la dernière bande de la piste 60%. 255
- Figure 4.25 : Profils électrophorétiques en conditions non-dénaturantes d'un plasma brut (à gauche) et d'un plasma déplété par immunochromatographie (à droite). Le cercle bleu correspond à la zone des masses moléculaires de 75 kDa, et le cercle rouge aux masses moléculaires de 20 kDa. 256
- Figure 4.26 : Spectre MS/MS de l'ion 581,1 correspondant au peptide 38-47 de la RBP4, issu de la bande protéique située autour de 20 kDa (cercle bleu)..... 257
- Figure 4.27 : A gauche, le gel 14% réalisé en conditions non-dénaturantes après purification sur colonne spécifique RBP4 (Piste 1 : fraction purifiée, Piste 2 : marqueurs de masse

moléculaire); A droite, les résultats MASCOT après excision, digestion et analyses LC-MS/MS	259
Figure 4.28 : gel (14%T) réalisé en conditions SDS-PAGE, après purification sur colonne spécifique-RBP4.....	259
Figure 4.29 : PMF de la bande C obtenue par MALDI-TOF MS	260
Figure 4.30 : Suivi de dégradation plasmatique après purification de la RBP4 entre t +1,5h et t +72h (gel 1D réalisé en conditions non-dénaturantes (14%T))	262

Tables des annexes

Annexe 4.1 : gel 1D SDS-PAGE de la RBP4 commerciale.....	270
Annexe 4.2 : courbe d'étalonnage $f(\text{concentrationAQUA}) = \text{aire sous le pic EIC de chaque AQUA}$	271
Annexe 4.3 : courbe d'étalonnage $f(\text{concentrationAQUA}) = \text{intensité du signal MS de chaque AQUA}$	271
Annexe 4.4 : Données LC-MS relatives à un digest de plasma déplété pour la quantification absolue de la RBP4 totale à partir de l'aire du EIC de chaque peptide (contenant $50 \mu\text{mol/mol}$ AQUA).	272
Annexe 4.5 : Données LC-MS relatives d'un digest de plasma brut pour la quantification absolue de la RBP4 totale, à partir des intensités des signaux MS de chaque peptide (contenant $50 \mu\text{mol/mol}$ AQUA).	272

Chapitre 4

Etude d'un marqueur de dégradation plasmatique

L'étude abordée dans ce chapitre fait suite à une étude antérieure qui avait permis d'identifier un marqueur de dégradation plasmatique. Très simplement, un échantillon de plasma issu de collecte a été conservé à température ambiante. Des prélèvements ont été effectués à différents temps. Un suivi par électrophorèse bidimensionnelle sur gel est ensuite effectué, après déplétion de l'albumine. Un spot en particulier dans la zone des basses masses moléculaires présentait une intensité croissante au cours du temps de dégradation. Après excision et digestion, l'analyse MALDI-TOF de ce spot a permis de mettre en évidence une protéine de 21 kDa : la « Retinol Binding Protein 4 » (RBP4) en faisant ainsi un marqueur de dégradation plasmatique. En effet, cette protéine circule dans le plasma sous la forme d'un complexe avec une autre protéine de 14 kDa, la transthyréline (TTHY). La dégradation thermique conduit donc à la dissociation de cet édifice protéique, libérant ainsi la RPB4 en faisant de cette protéine un marqueur de dégradation plasmatique. Ainsi l'objectif de ce chapitre est de parvenir à quantifier la dissociation de ce complexe en développant une méthodologie à la fois simple et robuste qui pourrait être ensuite transférable à l'EFS en tant que méthode de routine.

Les progrès de la spectrométrie de masse, dans le domaine de la biologie, ont permis le développement de nombreuses stratégies de quantification du taux d'expression des protéines dans les cellules ou dans les fluides biologiques. Les mesures de ces taux

d'expression sont le plus communément effectuées par l'incorporation d'isotopes stables dans l'échantillon protéique étudié. La majorité de ces méthodes se limite à établir uniquement une quantification relative des protéines exprimées. Pour l'étude d'une protéine ciblée comme la RBP4, la quantification absolue peut s'avérer particulièrement intéressante. C'est pourquoi, le choix de cette stratégie de quantification a été mise en place pour étudier plus en détails la dissociation du complexe du RBP4-TTR au cours de la dégradation thermique du plasma.

La démarche générale analytique développée pour cette étude s'articule selon trois axes principaux :

- la mise en place de la stratégie AQUA et la validation par quantification absolue de la RBP4 totale
- la mise en place d'une méthode d'isolement/purification de la RBP4, avec plusieurs voies envisagées
- le suivi de dégradation plasmatique

Ainsi, au cours de ce chapitre, la première partie sera dédiée à un tour d'horizon de l'état des connaissances de l'impact des modes de conservation et de stockage du plasma transfusionnel. On s'attachera également à décrire la protéine RBP4, son rôle, ses différentes formes afin de bien cerner les enjeux de cette étude. La protéomique envisagée comme outil de quantification absolue sera également présentée aux travers des ses enjeux, son principe et les stratégies existantes. La deuxième partie développera la mise en place de la quantification absolue appliquée à la RBP4 puis appliquée à un échantillon de plasma La troisième partie sera consacrée à la purification de la RPB4 où plusieurs approches ont été envisagées. Enfin, dans une quatrième partie, on appliquera la méthode de purification dans le cadre d'un suivi de dégradation de plasma à température ambiante et quantification.

1 Contexte de l'étude

1.1 Marqueur technique de dégradation

Une étude, réalisée au sein de l'équipe effectuée à partir d'échantillon de plasma dégradé analysé par 2DE, a permis de mettre en avant un marqueur protéique de dégradation plasmatique. En effet, au cours de la dégradation thermique, le complexe formé par la RBP4 et la TTHY se dissocie, libérant ainsi la RBP4. Afin de bien cerner les enjeux de cette étude,

cette section a pour but de présenter les deux partenaires de ce complexe, ainsi que le complexe lui-même.

La structure tridimensionnelle de la RBP humaine a été déjà largement décrite dans la littérature, ainsi que celles d'autres espèces. Plusieurs formes de la TTHY ainsi que les dérivés pharmacologiques de la TTHY ont été le sujet de nombreuses études structurales approfondies. De fait, les deux partenaires du complexe étudiés ici ont été pleinement caractérisés.

1.1.1 La « Retinol Binding Protein 4 »

L'organisme maintient un niveau homéostatique du rétinol (forme physiologique de la vitamine A) afin de conserver une source constante de précurseurs actifs des rétinoïdes comme l'acide rétinoïque ou le *11-cis*-rétinal. Les rétinoïdes sont une classe de composés chimiques dérivés du rétinol. Ils sont essentiels à de nombreux processus biologiques : vision, croissance du tissu osseux, immunité etc. Il s'agit de petits composés hydrophobes qui sont associés *in vivo* à des protéines solubles présentes dans diverses cellules et compartiments extra-cellulaires avec une grande sélectivité et affinité [1].

La « retinol binding protein » est une protéine de 21 kDa d'origine hépatocytaire. Elle transporte le rétinol de manière spécifique, et le délivre aux organes périphériques. Elle appartient à la famille des lipocalines car elle possède des similarités structurales avec les « lipid binding proteins » [2]. Il existe plusieurs formes de RBP : cellulaire (notées RBP1, RBP2, RBP5, RBP7), interstitielle (RBP3) et plasmatique (RBP4). Par ailleurs, on distingue la structure « apo » de la RBP4, c'est-à-dire qu'elle se trouve sous sa forme macromoléculaire non-associée au rétinol ; et la structure « holo », celle qui est sous sa forme associée au rétinol. Elle permet également de protéger le rétinol contre les oxydations pouvant avoir lieu dans le milieu plasmatique.

D'un point de vue structural, la RBP4 possède une unique chaîne polypeptidique d'environ 21 kDa. Des études cristallographiques ont révélé une forme de calice constituée de huit feuilletts β antiparallèles (ou brins) suivis par une courte hélice α qui se termine par une extrémité C-terminale. Les brins antiparallèles, caractéristiques des lipocalines, forment un tonneau dans lequel vient se fixer le rétinol du fait de sa cavité hydrophobe.

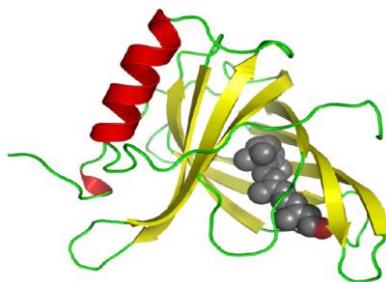


Figure 4.1 : Structure 3D de la RBP4 [3]. En rouge = hélice alpha, en jaune = feuillet B, en vert = boucle variable, gris = le rétinol

Bien que la vitamine A soit utilisée en tant qu'acide rétinoïde, que *11-cis*-rétinal ou autres rétinoïdes, la RBP ne délivre que les formes « *tout-trans*-retinol », et uniquement le rétinol peut déclencher la sécrétion de RBP [4]. En effet, le foie (organe de stockage du rétinol) joue un rôle dans la régulation positive de la libération du rétinol, en déclenchant la synthèse de la RBP. Il a été démontré que la forme apo-RBP s'accumule dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes depuis lesquelles elle sera rapidement libérée quand le taux cellulaire de vitamine A augmente [5].

1.1.2 La transthyréine

La transthyréine (TTHY), également appelée pré-albumine [6], est une protéine de transport, d'origine hépatique, impliquée dans le transport de la thyroxine, hormone thyroïdique. Première protéine du plasma dont la structure a été déterminée par diffraction de rayons X (RX), la TTHY se présente sous la forme d'un homotétramère de sous-unités identiques, composées chacune de 127 acides aminés. Au sein de ce tétramère, les quatre monomères n'occupent pas des positions équivalentes, et sont plutôt organisés selon un dimère de dimères. Chaque sous-unité présente deux importants feuillets β , eux-mêmes constitués de quatre bandes antiparallèles. Les deux monomères forment ainsi un édifice extrêmement stable renforcé par une liaison hydrogène entre leur feuillet β respectif. Les deux dimères de ce tétramère sont séparés par une chaîne, et sont en contact avec boucles. La chaîne, d'une dizaine d'angströms de diamètre, a été identifiée comme étant le site de liaison pour un ligand.



Figure 4.2 : Structure 3D de la transthyréline tétramérique. Chaque monomère consiste de deux feuillets comprenant quatre bandes antiparallèles (chaque monomère est représenté par une couleur différente)

1.1.3 Le complexe

La RPB4 circule donc dans le plasma en formant un complexe macromoléculaire stable avec la TTHY [7]. Les deux formes apo- et holo de la RBP peuvent former le complexe avec la TTHY. Toutefois, la constante de dissociation de la forme *holo* est significativement supérieure, ce qui est cohérent avec le mécanisme de distribution du rétinol dans l'organisme avec un complexe stable [8], tandis que la forme apo-RBP de faible masse moléculaire est éliminée par le glomérule rénal [9]. En effet, la complexation avec la TTHY (tétramère de masse totale = 54 kDa) prévient la perte de la RBP (21 kDa), sous forme *holo*, par filtration à travers le glomérule rénal [10, 11], en augmentant sa taille apparente.

La concentration normale de RBP dans le plasma humain est de l'ordre de $2\mu\text{M}$ [9], tandis que celle de la TTHY est d'environ $4.5\mu\text{M}$ [6]. La stœchiométrie *in vivo* supposée de ce complexe est d'une molécule de RBP pour une TTHY tétramérique. Cependant, lorsque la formation du complexe est effectuée *in vitro*, d'autres stœchiométries peuvent être avancées. Toutefois, des études cristallographiques ont fait la preuve de façon univoque que le nombre maximal de RPB susceptible de se complexer à la TTHY ne pouvait être supérieur à deux [7]. Le complexe se trouve sous la forme d'un hexamère $\text{TTHY}_4\text{RBP}_2$, comme le montre la figure 4.2. Le tétramère de TTHY se trouve dans le plan xy , tandis que les deux molécules de RBP s'alignent le long de l'axe z , à l'extérieur du tétramère [12], interagissant préférentiellement avec les dimères de TTHY opposés. Les acides aminés de la RBP4 reconnus impliqués dans la formation du complexe sont les résidus 33-36, 60-70, 63-64, 92-98, 176-183 [1, 12]. Le côté ouvert du tonneau s'accroche au niveau du double axe de symétrie du dimère. En ce qui concerne la TTHY, les résidus Ile 84 Val 20 et Arg 21 participent à l'interaction avec la

RBP4, au niveau de chaque dimère [7, 12]. Enfin, une interaction supplémentaire de la TTHY avec le coté C-terminal de la RBP4 a également été soulignée [1]. Enfin, il a été démontré que la reconnaissance entre les partenaires de ce complexe était corrélée à la nature du rétinol lié à la RBP4 [13]. L'interaction avec le rétinol induit un changement de conformation qui diminue l'implication des acides aminés 35 et 36 dans le complexe [14].

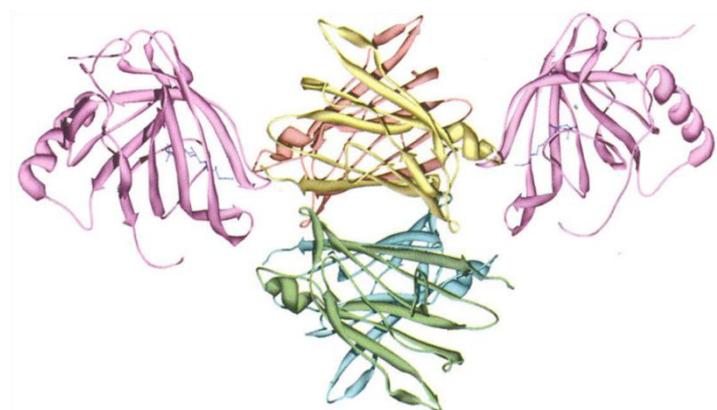


Figure 4.3 : Structure 3B de la RBP complexée dans la transthyréine. Deux molécules de RBP (représentées en rose) avec le rétinol (en bleu) forment un complexe homotétramérique de transthyréine.

1.1.4 Protéomique et quantification absolue

La spectrométrie de masse s'est imposée comme technique de référence en analyse protéomique, mais les données générées restent principalement qualitatives. Rendre les données de spectrométrie de masse quantitatives constitue donc un enjeu majeur [15].

1.1.4.1 Quantification différentielle vs quantification absolue

La quantification absolue s'adresse à des études protéomiques ciblées, contrairement à la quantification relative qui s'inscrit dans le cadre d'analyses différentielles exploratoires. En effet, la première concerne l'analyse d'un petit nombre de protéines ciblées dont on veut déterminer avec précision la quantité. La seconde, quant à elle, s'adresse à l'analyse de protéomes entiers et permet de mettre en avant des ratios d'abondances de protéines entre différents échantillons. Alors que la quantification relative ne peut s'effectuer que sur quelques échantillons, la quantification absolue est applicable à des campagnes d'analyses à grande échelle, et permet la comparaison de données inter-laboratoire (voir partie 1.3.2). Enfin, la quantification différentielle est relative à une démarche de découverte de biomarqueurs, alors que la quantification absolue cherche à évaluer et à valider ces biomarqueurs candidats.

Par ailleurs, les tests ELISA sont couramment utilisés pour quantifier des protéines ciblées [16]. Toutefois, le coût de développement de ce type de stratégie est incompatible avec des phases de découverte de biomarqueurs. De plus, ces tests restent tributaires de la disponibilité des anticorps mais surtout de leur spécificité. Enfin, de tels tests ne tiennent pas compte des interférences (effet de matrice) dans les échantillons biologiques très complexes comme le plasma.

C'est pourquoi, l'apport de la spectrométrie de masse (MS) apparaît comme déterminant en tant que technique de quantification [15, 17]. En effet, elle est d'autant plus intéressante qu'elle s'affranchit de l'utilisation d'anticorps, ne posant plus ainsi la question de disponibilité ou non de ce dernier. De plus, elle permet des analyses multiplexes [18, 19] tout en présentant un niveau de grande spécificité [20] (voir partie 1.3.2) avec le développement d'outils dédiés à la quantification [21].

1.1.4.2 Principe

La combinaison des séparations chromatographiques et de la spectrométrie de masse a rendu possible la détection sensible de protéines dans des échantillons biologiques complexes. De plus, la spectrométrie de masse en tandem offre des informations de séquences sur les protéines et leurs isoformes grâce à une détection spécifique (SRM ou MRM). Des méthodes de quantification de type SILAC, ICAT, iTRAQ ou encore « label-free » [15, 22, 23] ont été développées pour explorer la dynamique de protéomes entiers et permettent une comparaison d'abondances protéiques entre un petit nombre d'échantillons.

A l'inverse, les stratégies de quantification absolue ont pour but de déterminer des concentrations de protéines dans un échantillon biologique, permettant de comparer les données issues de plusieurs laboratoires [17]. Cela nécessite une validation de méthodes à la fois précise et juste qui doit démontrer que la concentration estimée de la protéine ciblée soit la plus proche de la concentration réelle [24]. Ainsi, le concept de dilution isotopique, utilisé depuis des dizaines d'années comme approche de référence pour la quantification par spectrométrie de masse des petite molécules (médicaments, hormones) [24], a été récemment transféré à la quantification absolue des protéines dans des échantillons biologiques. Ces méthodes reposent sur l'addition de quantité connue de standards marqués par des isotopes stables. Ils possèdent les mêmes propriétés chromatographiques (sauf ceux marqués au deuterium) et d'ionisation que leurs équivalents natifs mais se distinguent par leur différence de masse et parfois par leur signature isotopique [15]. Dans une stratégie « Bottom-Up », la

quantification absolue s'appuie sur l'identification de « peptides-signature » pour chaque protéine ciblée. Ces signatures, ou peptides protéotypiques, sont caractérisées par l'unicité de la protéine étudiée et par leur détection en LC-MS [25].

La quantification peut être effectuée en mode MS en comparant les signaux des ions extraits (hauteur de pic ou aire de pic) des formes natives et marquées d'un peptide protéotypique donné (figure 4.4A). En mode MS/MS, une comparaison sur la base des signaux des ions fragments entre les peptides marqués et endogènes peut être effectuée [26]. Enfin, le mode SRM permet d'exploiter les capacités d'instruments comme le triple quadripole (fig 4.4B). Ce mode consiste à suivre une (ou plusieurs) transition au cours de la fragmentation d'un précurseur, ce qui contribue à améliorer le rapport signal-sur-bruit et à augmenter la sensibilité de l'analyse [27].

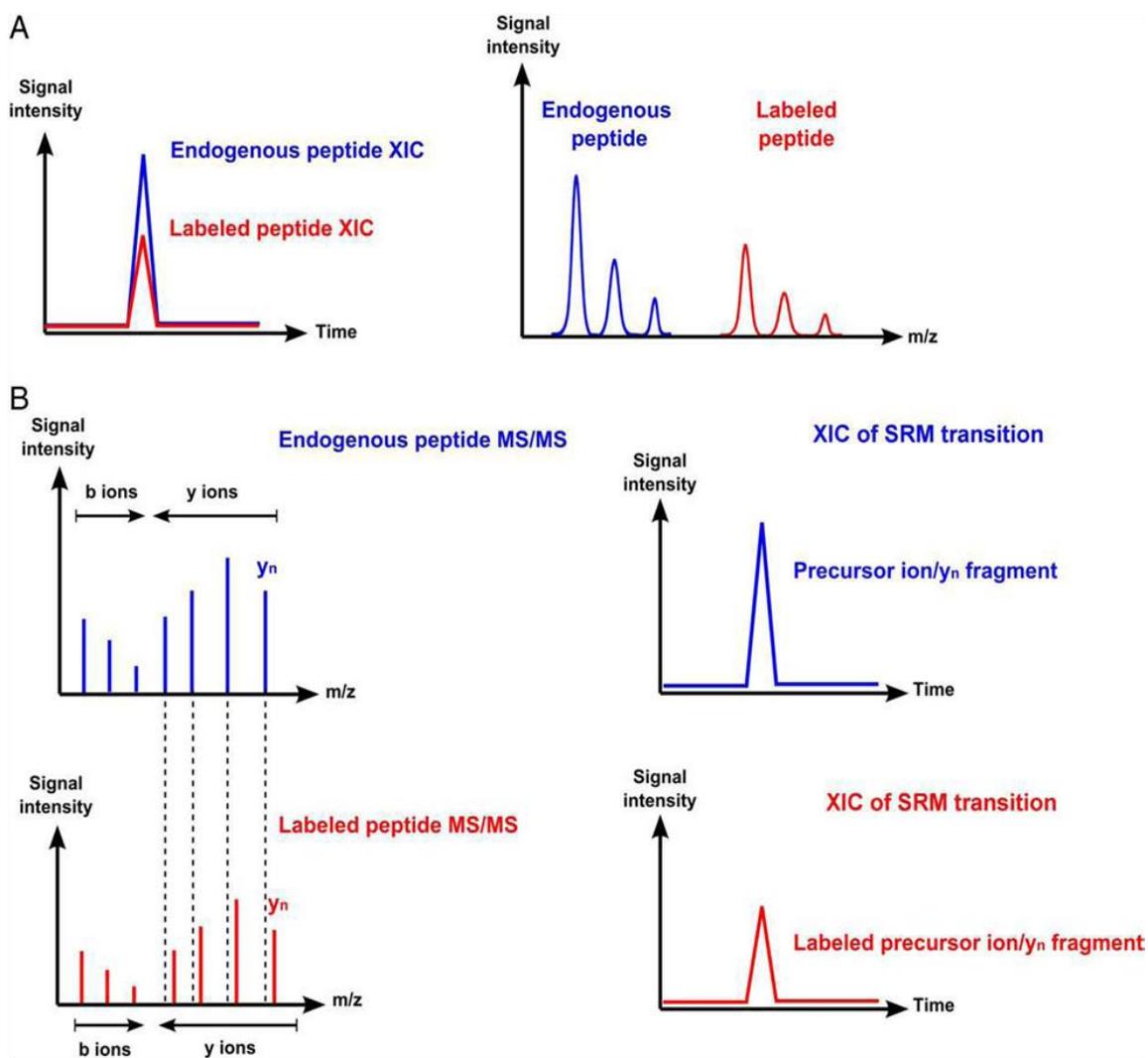


Figure 4.4 : méthodologie MS pour la quantification absolue de protéines [20]. (A) quantification absolue par analyse LC-MS utilise des peptides marqués qui possèdent les mêmes propriétés chromatographiques que le peptide natif, seule leur différence de masse permet de les distinguer. (B) quantification par LC-SRM où l'on suit les transitions les plus intenses et caractéristiques entre les paires de précurseurs/ions fragments d'un peptide protéotypique.

1.1.5 Les stratégies de quantification absolue

En règle générale, la dilution isotopique permet des méthodes de quantification avec de bonnes linéarités et d'excellentes précisions en comparaison avec les méthodes de quantification traditionnelle [28]. Cependant la justesse de la mesure de ces méthodes, c'est-à-dire leur capacité à déterminer la réelle abondance d'une protéine ciblée, peut dépendre du choix du standard ainsi que de la méthode globale d'analyse. Il existe trois grandes méthodes de quantification absolue qui utilisent des standards marqués par des isotopes stables. La figure 4.5 les décrit, et les situe dans un contexte de protéomique « Bottom-Up » : (i) les standards AQUA qui correspondent à des peptides de synthèse qui peuvent être ajoutés après l'étape de digestion [29], (ii) les concatamères QconCAT qui sont des protéines chimériques constituées de différents peptides protéotypiques de plusieurs protéines ciblées [30], et enfin (iii) les standards PSAQ qui sont des protéines recombinantes entières biochimiquement identiques aux protéines à doser.

1.1.5.1 Peptides AQUA

En 1996, Barr et al. a été le premier à appliquer le principe de la dilution isotopique en spectrométrie de masse (FAB-MS) pour mesurer la concentration absolue de l'apolipoprotéine A-I [31]. En 2001, Stemman et al. est parti de cette approche pour quantifier une endopeptide régulant le cycle mitotique, la séparase, à partir de peptides non-phosphorylés et de phosphopeptides marqués [32]. Mais ce n'est qu'en 2003 que Gerber a utilisé l'acronyme « AQUA » [29], acronyme désormais largement utilisée par la communauté protéomique. Plus de détails sont présentés dans la partie 3.2.

La stratégie SISCAPA (*Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies*) est une variante de la méthodologie AQUA. Elle intègre une étape d'immuno-affinité contre le peptide protéotypique natif et analogue marqué entre l'étape de digestion et l'analyse LC-MS [33]. La sensibilité de l'analyse est considérablement augmentée. La stratégie SISCAPA s'adresse particulièrement à la quantification de protéines de très faibles abondances contenues dans des échantillons complexes comme le plasma [19].

1.1.5.2 Concatamères QconCAT

En 2005, Beynon et al. a introduit le concept de quantification absolue de protéines à grande-échelle [30] en s'appuyant sur la synthèse et le marquage métabolique de peptides protéotypiques à partir de concatamères artificiels (QconCAT pour Quantification conCATamer) [18]. Un concatamère est en général une succession de sous-unités correspondantes à l'information génétique sous forme linéaire. Ici, un QconCAT est envisagé comme une protéine chimérique composée de plusieurs peptides marqués correspondant à une ou plusieurs protéines à quantifier isotopiquement. Il est donc possible de construire un QconCAT *sur mesure* selon les protéines à quantifier. Contrairement aux peptides AQUA, les QconCAT synthétisent donc biologiquement les peptides et donnent accès à une large gamme de peptides protéotypiques. Les QconCAT sont ensuite introduits dans l'échantillon avant l'étape de protéolyse. Les peptides marqués ainsi générés servent ensuite de standards internes. De tels concatamères peuvent générer jusqu'à 50 peptides spécifiques [34]. Cette possibilité d'inclure plusieurs peptides protéotypiques augmente la robustesse de la quantification [28].

1.1.5.3 Protéines PSAQ

Même si les stratégies précédentes permettent une quantification absolue de la quantité du peptide ciblé dans l'hydrolysate trypsique de l'échantillon, elles ne prennent pas en compte les rendements de toutes les étapes biochimiques nécessaires à la préparation de l'échantillon. C'est la raison pour laquelle la méthode de quantification PSAQ a été développée [28]. En effet, elle utilise comme étalons internes des protéines recombinantes entières biochimiquement identiques aux protéines naturelles à doser. Ces étalons PSAQ sont alourdis par incorporation de [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$]L-lysine et [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$]L-arginine lors de leur biosynthèse. Les étalons internes PSAQ, se comportant comme leurs homologues endogènes, peuvent être ajoutés préalablement à tout traitement de l'échantillon, afin d'éviter toute variabilité au cours du processus analytique (préfractionnement, digestion etc.).

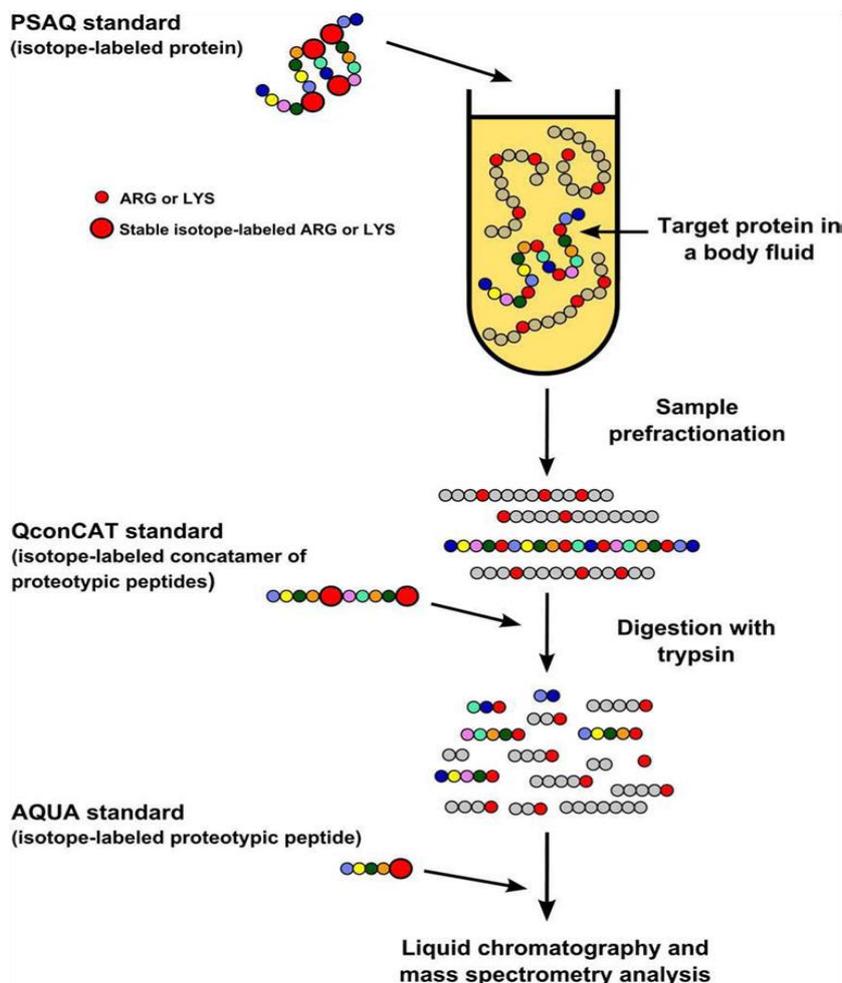


Figure 4.5 : Les trois stratégies de quantification absolue existantes et leur intégration dans une démarche « Bottom-Up »[20]

2 Mise en place de la stratégie de quantification AQUA

Les progrès de la spectrométrie de masse dans le domaine de la biologie ont permis le développement de nombreuses stratégies de quantification du taux d'expression de protéines dans des cellules ou dans des fluides biologiques. Les mesures de ces taux d'expression sont le plus communément effectuées par l'incorporation d'isotopes stables dans l'échantillon protéique.

Pour l'étude d'une protéine ciblée comme la RBP4, la quantification absolue est appropriée et particulièrement intéressante.

Par cette approche, il est possible de quantifier des protéines de faible abondance présentes dans des échantillons aussi complexes que le plasma. De plus, l'objectif de cette étude est de fournir un outil diagnostique à l'EFS pour évaluer le niveau de dégradation de plasma. Ainsi, il est impératif de mettre en place une méthode analytique qui soit applicable

sur un grand nombre d'échantillons à partir d'analyses sur des plasmas de différentes provenances (contrôle de routine, validation de traitements plasmatiques).

C'est pourquoi, le choix de cette stratégie de quantification absolue a été mise en place pour étudier la dissociation du complexe du RBP4-TTHY au cours de la dégradation thermique du plasma. Cette stratégie de quantification absolue est reconnue pour sa simplicité et sa sensibilité, la rendant applicable au plasma notamment dans l'étude et la validation des biomarqueurs [16, 21, 35-37].

2.1 Démarche générale

Le développement de la méthode AQUA ainsi que sa mise en place se déroulent selon deux étapes principales. La première partie consiste à étudier la séquence d'acides aminés de la protéine étudiée, et de sélectionner un peptide (issu d'une digestion à la trypsine, par exemple). Le choix de ce peptide repose essentiellement sur des analyses LC-MS, en considérant son élution, sa fragmentation etc. Un peptide AQUA est ensuite synthétisé avec la même séquence d'acides aminés qui simule ainsi le peptide natif produit lors de la protéolyse. Des isotopes stables (^{13}C et/ou ^{15}N) sont incorporés à un seul résidu (K, L, I, A, R, F, P, V) afin de différencier l'analyte et le standard interne marqué par spectrométrie de masse. En effet, ces deux peptides possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques (co-élution chromatographique, ionisation, répartition des ions fragments) mais présente une différence de 8,0 Da (quand la lysine est utilisée pour le marquage) rendant possible leur différenciation par spectrométrie de masse.

La seconde partie consiste à appliquer une méthode LC-MS ou LC-MS/MS développée et optimisée sur le peptide natif, et ainsi procéder à la quantification. Il est bien évidemment possible d'introduire une étape de séparation avant la protéolyse afin de simplifier l'échantillon et ainsi augmenter la gamme dynamique de l'étude. La quantification s'effectue à partir d'une courbe d'étalonnage établie à partir de l'analyse MS des peptides marqués. On utilise ainsi les aires ou les intensités de pics chromatographiques d'ions extraits aux concentrations de ces peptides. Ces derniers sont ensuite ajoutés en concentrations connues au mélange peptidique contenant le peptide à doser pour quantification. La figure 4.6 récapitule la démarche de la stratégie AQUA.

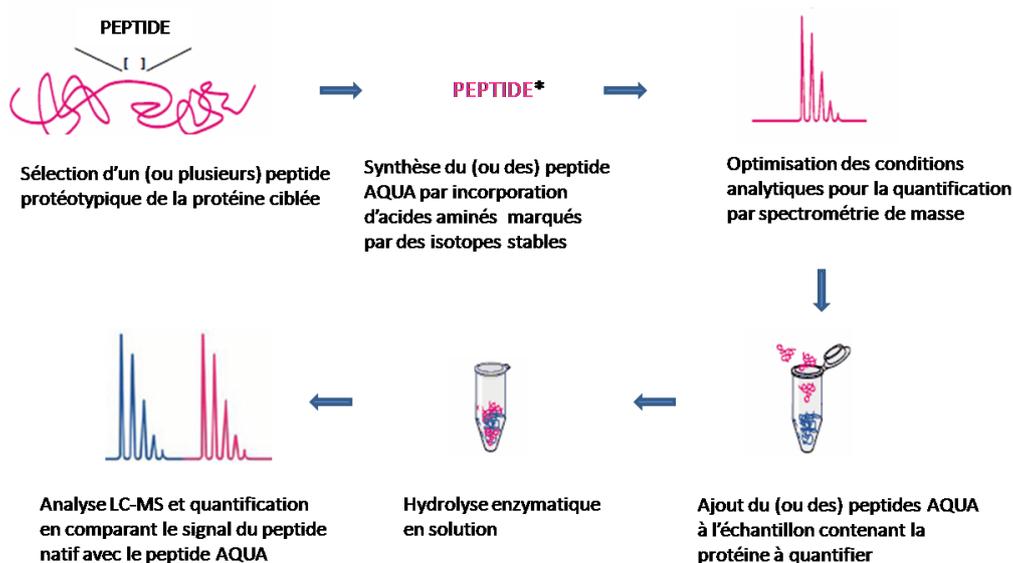


Figure 4.6 : Démarche expérimentale de la quantification AQUA

2.2 La stratégie de quantification AQUA

Le développement méthodologique de la quantification absolue de la RBP4 se décompose en plusieurs étapes :

- Caractérisation de la RBP4 par MS et MS/MS
- Choix des peptides AQUA
- Quantification

Parmi les spectromètres de masse disponibles au laboratoire, nous avons décidé d'évaluer deux instruments hybrides, tous deux couplée avec une chaîne de nanoLC (Dionex) et avec une source nanoESI. Il s'agit d'un instrument de type Qq-TOF et de type Qh-FT-ICR. Ces deux instruments offrent des sensibilités proches, mais supérieures à un QqQ. L'association de l'analyseur quadripolaire et d'un temps de vol permet d'analyser une grande gamme de m/z , tandis que l'analyseur FT-ICR permet une grande résolution et précision de masse. L'utilisation de ces deux instruments apparait donc complémentaire.

2.2.1 Caractérisation de la RBP4 par MS et MS/MS

La protéine RBP4 (humaine) commerciale a été soumise à une hydrolyse enzymatique, par la trypsine ; la concentration finale du mélange analysé est de 1 pmol/ μ L. Le digest a été analysé par MALDI-TOF/TOF. L'empreinte peptidique de la RBP4 est représentée dans la figure 4.7.

17 peptides ont été détectés permettant un recouvrement de séquence de 80% (le pro-peptide en position 1-18 n'est pas comptabilisé dans le recouvrement de séquence).

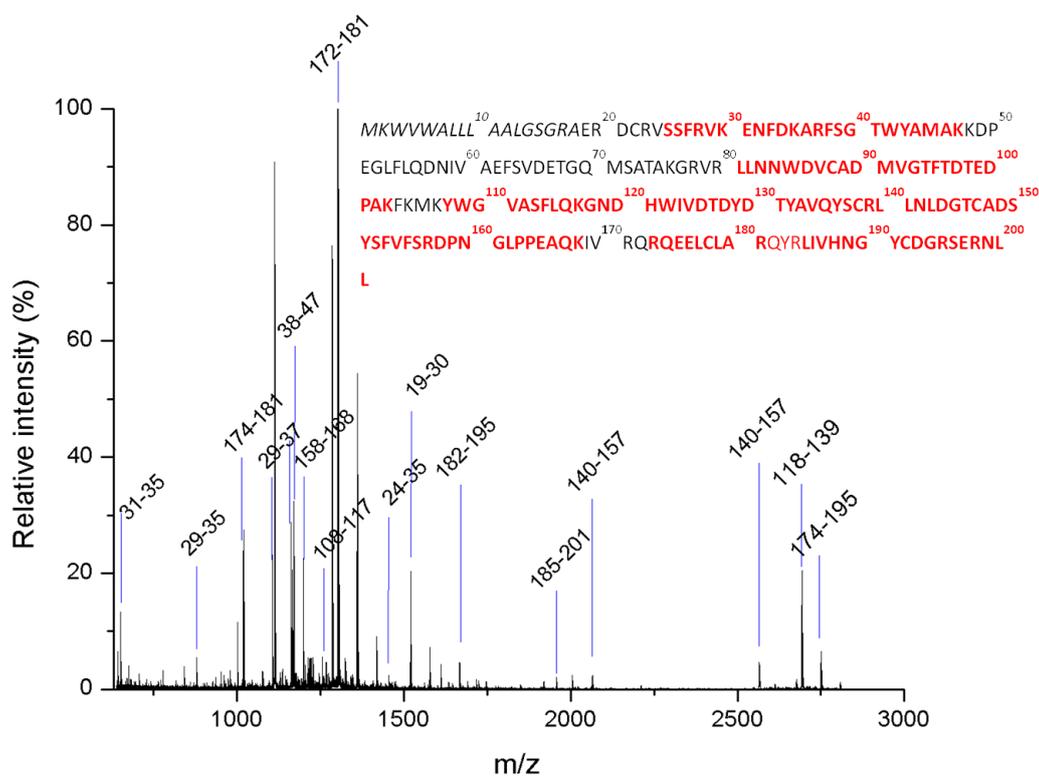


Figure 4.7 : PMF de la RBP4 obtenue par MALDI-TOF/TOF

La source ESI étant sensible à la présence de sels, une étape préalable de dessalage de l'échantillon précédent est envisagée pour permettre une meilleure ionisation des peptides du digest. Pour ce faire, un dispositif SPE contenant une phase C18 (ZipTip C18, Millipore) a été utilisé. Afin d'optimiser les conditions de dessalage, deux solvants pour l'élution sont testés : l'acétonitrile et le méthanol. En effet, les conditions LC-MS utilisent des phases mobiles contenant de l'acétonitrile comme solvant organique. Par ailleurs, le méthanol est également employé comme solvant pour l'élution des analytes en chromatographie liquide sur phase inversée. De plus, ce dernier est connu pour augmenter les limites de détection [38].

Une fois dessalé, le digest de RBP4 a été analysé par nanoLC-nanoESI-Qq-TOF MS/MS. Le courant ionique total (TIC, représenté ici en « base peak ») de l'échantillon dessalé en présence d'acétonitrile et de méthanol sont présentés respectivement dans la figure 4.8 et 4.9. L'étape de dessalage permet ainsi une élimination des sels efficace qui se traduit par un meilleur rapport signal/bruit de l'analyse LC-MS. Ce paramètre est très important pour notre étude dans la mesure où la quantification AQUA se base en partie sur des critères chromatographiques pour le choix des peptides AQUA. Une autre conséquence directe d'un

meilleur signa/bruit est des scores d'identifications significativement plus élevés, augmentant ainsi la confiance dans l'identification.

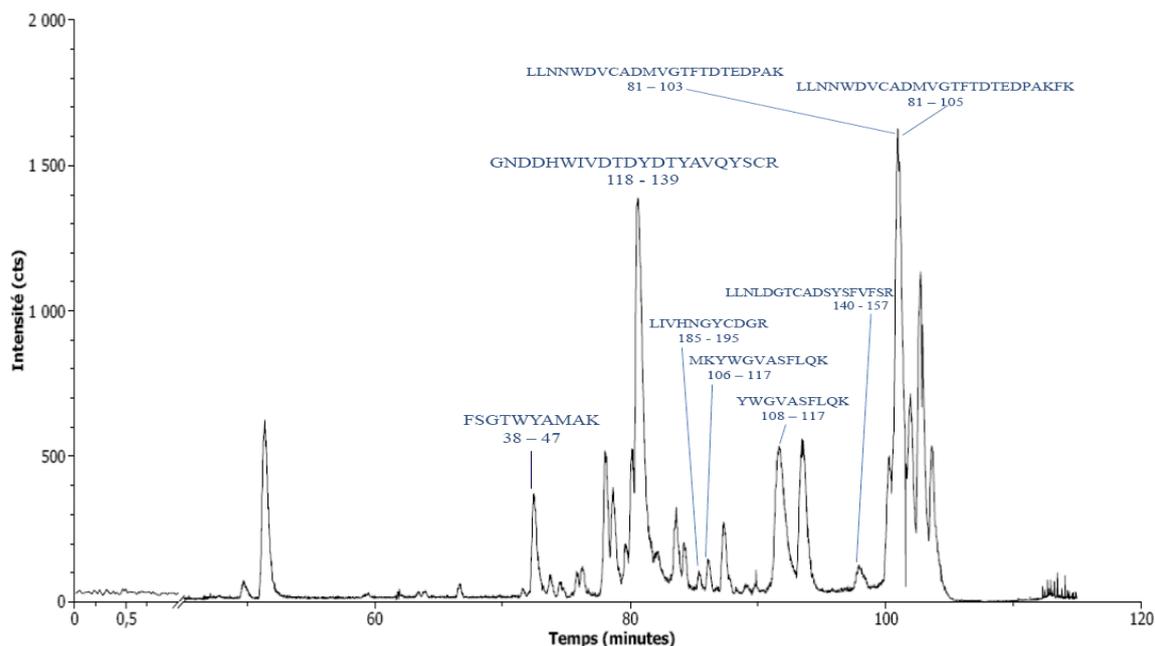


Figure 4.8 : Chromatogramme du TIC correspondant à l'analyse nanoLC nanoESI-Qq-TOF d'un digest de RBP4 dessalé sur Ziptip® au méthanol (quantité injectée : 1 pmole)

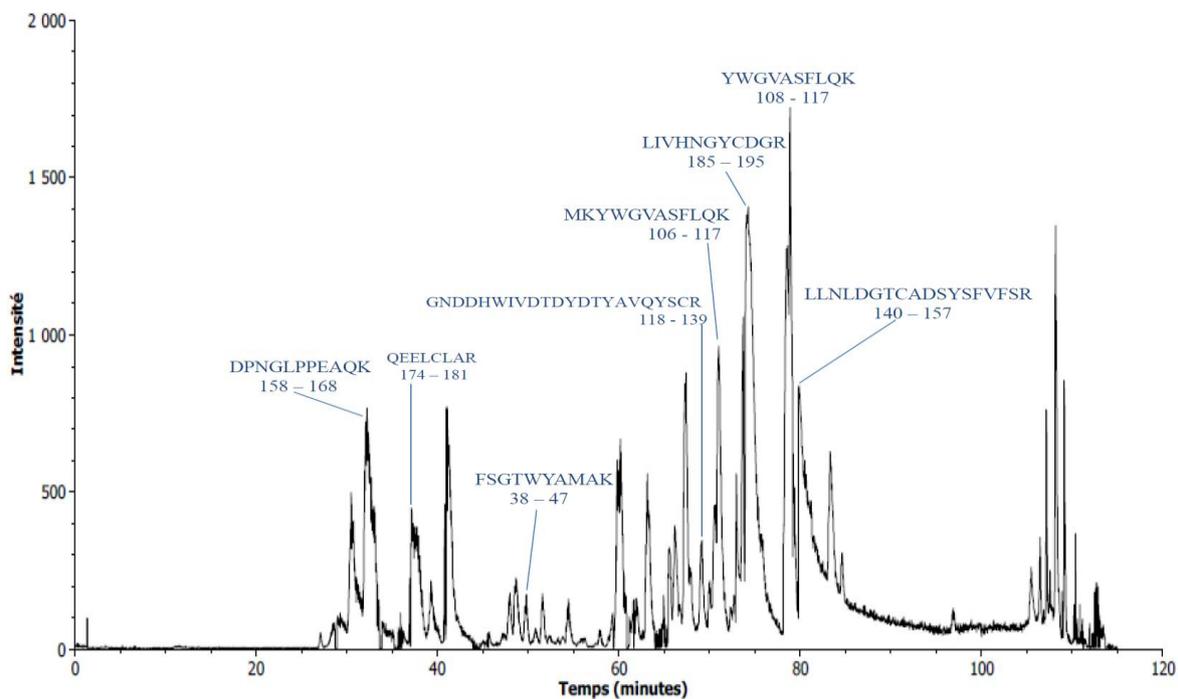


Figure 4.9 : Chromatogramme du TIC correspondant à l'analyse nanoLC nanoESI-Qq-TOF d'un digest de RBP4 dessalé sur Ziptip® au méthanol (quantité injectée : 1 pmole)

En présence de méthanol, le TIC présente un nombre plus important de pics, donc plus d'information sur l'échantillon, ce qui se caractérise par un score d'identification de la RBP4 plus élevé (score Méthanol : 2338, score ACN : 1037). Le méthanol a été choisi pour toutes les étapes de dessalages de cette étude.

Toutefois, une perte de recouvrement de séquence de la RBP4 est constatée entre l'analyse MALDI-TOF (80%) et l'analyse nanoLC-nanoESI-Qq-TOF (45% après dessalage), et ce malgré l'étape de séparation chromatographique. Nous attribuons cette diminution à l'étape de dessalage. La littérature fait état d'exemples relatant une perte de certains peptides hydrophiles [39]. En effet, ces peptides sont présents dans les phases de lavage et possèdent un caractère hydrophile, caractère évalué à partir de leur indice GRAVY [40].

Enfin, certains pics présents sur les TICs sont intenses mais n'appartiennent pas à la RBP4. Il s'agit majoritairement d'albumine (66 kDa) et d' α -1-microglobuline (40 kDa). La RBP4 commerciale est purifiée à partir d'urine, leur présence n'est pas anormale (Annexe 4.1).

2.2.2 Les peptides AQUA

2.2.2.1 Sélection des peptides AQUA

A partir d'une étude bibliographique approfondie, nous avons pu établir les critères que doivent remplir les peptides pour être choisis dans le cadre d'une quantification absolue comme la nôtre. Plusieurs précautions doivent être prises en compte pour le choix des peptides AQUA. Il faut ainsi :

- Choisir au moins deux peptides issus de la protéine à quantifier afin de s'assurer de la robustesse de la quantification.
- Vérifier la protéotypie des peptides candidats, c'est-à-dire vérifier qu'ils sont spécifiques de la protéine à quantifier.
- Veiller à la bonne détection LC-MS des peptides candidats, et ce même à de faibles concentrations.
- Eviter des peptides trop longs ; la séquence en acides aminés ne doit pas excéder une quinzaine de résidus.
- Privilégier un marquage soit en interne, soit aux extrémités de la séquence peptidique ainsi qu'un marquage du type ^{13}C et ^{15}N .

Le choix des peptides AQUA s'appuie sur la digestion de RBP4 commerciale et l'analyse répétée cinq fois sur ce digest par nanoLC-nanoESI-Qq-TOF MS. Ainsi, huit peptides récurrents ont été mis en avant, dont quatre qui ne présentaient aucune modification (type oxydations ou carbamidométhylations pouvant être induites par la digestion).

L'unicité des peptides pour la RBP4 a été vérifiée grâce à l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), logiciel développé par le National Center for Biotechnology Information (NCBI). Ce dernier permet de souligner des homologues de séquences à partir d'une séquence peptidique donnée. Il utilise la banque de données informatique UniprotKB, qui combine les données de Swissprot, TrEMBL et PIR, et qui est hébergée par le serveur suisse ExPASy.

Ainsi, trois peptides répondent aux critères précédemment décrits. Il s'agit des peptides FSGTWYAMAK (position 38-47), YWGVASFLQK (position 108-117) et DPNGLPPEAQK (position 158-168) (figure 4.10). Ils sont systématiquement détectés avec un état de charge $z = 2$. Ils se composent d'une dizaine d'acides aminés. Ils sont respectivement nommés peptide 1, peptide 2, et peptide 3 dans la suite de l'étude. Le choix de ces trois peptides est également motivé par leur position au sein de la séquence de la RBP4. En effet, ils sont localisés aux extrémités et en milieu de séquence. Ainsi, observer ces peptides au cours de la quantification de plasmas dégradés nous assure le maintien de l'intégrité de la RBP4 au cours de la dégradation plasmatique (pas d'action protéolytique par exemple).

```

1   MKWVWALLLL AALGSGRAER DCRVSSFRVK ENFDKARFSG TWYAMAKKDP
                                     peptide 1
51  EGLFLQDNIV AEFVDETGG MSATAKGRVR LLNNWDVCAD MVGTFDTED
101 PAKFKMKYWG VASFLQKGNL DHWIVDTDYD TYAVQYSCRL LNLGTCADS
                                     peptide 2
151 YSFVFSRDPN GLPPEAQKIVR QRQEELCLA RQYRLIVHNG YCDGRSERNL
                                     peptide 3
201 L
    
```

Figure 4.10 : Position des 3 peptides sélectionnés pour la synthèse des peptides AQUA

Leur spectre MS/MS met en évidence une bonne fragmentation. Le recouvrement de séquence en acides aminés de chaque peptide est total, nous garantissant une identification sans ambiguïté. La figure 4.11 donne l'exemple de la fragmentation de l'ion dichargé de rapport m/z 599,6 correspondant au peptide 2. La fragmentation présentée ici s'est déroulée avec une énergie de collision de 20 eV, on constate la forte présence de l'ion précurseur. La

figure 4.12 représente la fragmentation de ce même ion, après optimisation de l'énergie de collision : en appliquant 30 eV dans la cellule de collision, l'intensité de l'ion précurseur est significativement diminuée et permet une meilleure détection des ions fragments.

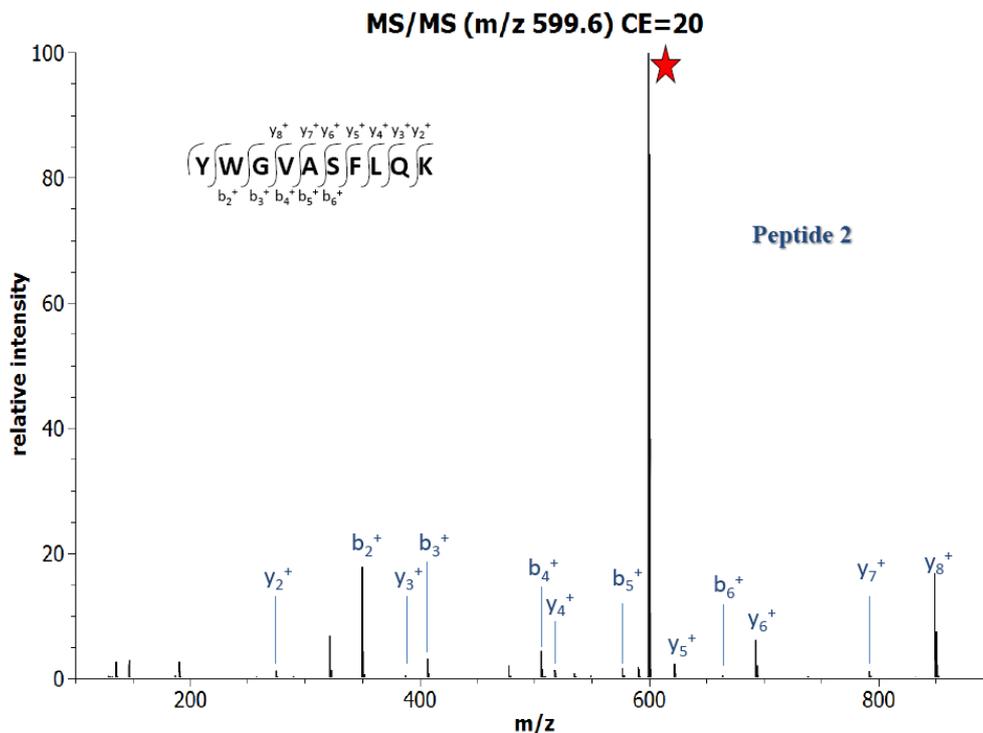


Figure 4.11: spectre de fragmentation du peptide 2 (peptide108-117, ion dichargé m/z 599,6) obtenu avec une énergie de collision de 20 eV

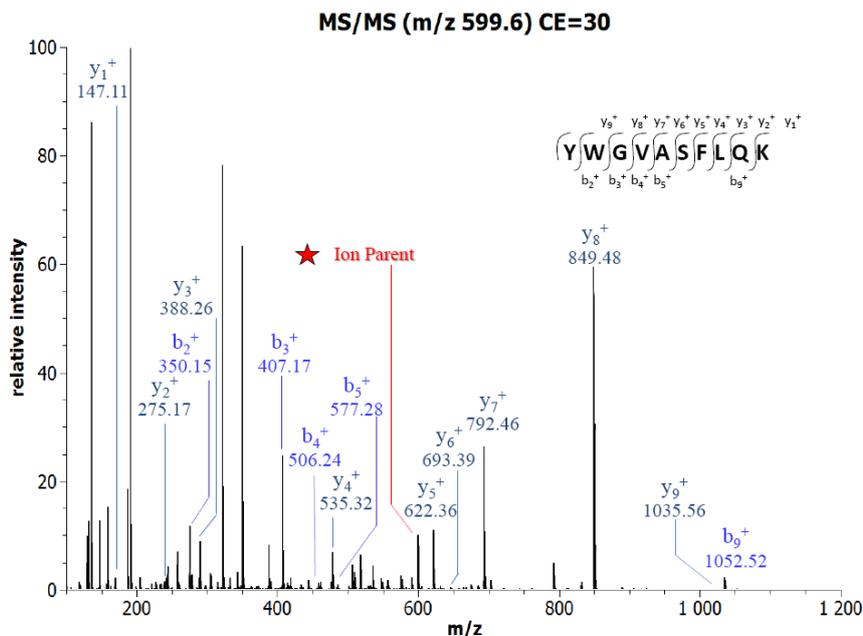


Figure 4.12: Spectre de fragmentation du peptide 2 (peptide108-117, ion dichargé m/z 599,6) obtenu avec une énergie de collision de 30 eV

En outre, une étude de sensibilité a été également conduite sur ces trois peptides. Le seuil de détection est de 15 fmol/ μ L en focalisant le quadripôle sur la masse de l'ion dichargé correspondant. Ce seuil nous assure la détection de la RBP4 car sa concentration plasmatique est comprise en 0,9 et 1,9 pmol/ μ L [9]. On observe malgré tout des différences d'ionisation entre ces trois peptides [41], cela n'est pas une contrainte à notre développement méthodologique dans la mesure où la quantification repose exclusivement sur la comparaison des couples ions natifs/ions marqués.

2.2.2.2 Marquage des peptides AQUA

Les peptides FSGTWYAMAK (38-47), YWGVASFLQK (108-117) et DPNGLPPEAQK (158-168) ont été synthétisés par la société ThermoFischer™. Le marquage a été réalisé en Lysine (K) terminale pour les trois peptides sélectionnés. L'isotope employé est l'U- $^{13}\text{C}_6$; $^{15}\text{N}_2$ entraînant ainsi un incrément d'unité de masse atomique de 8,0 avec le peptide natif, soit 8,0 Da. Il faut veiller à ce que la différence de masse engendrée par le marquage soit supérieure à 6 unités de masse atomique afin d'éviter que les pics isotopiques ne soient confondus, dans le cas d'ions précurseurs multichargés ($z > 3$) [42].

La synthèse peptidique repose sur la croissance d'une chaîne peptidique à partir de son côté C-terminal sur une résine polymérique. Le support est généralement un copolymère faiblement réticulé fonctionnalisé, de type Styrene-DVB. De façon schématique, la synthèse de peptide se déroule selon cinq étapes :

- a. La fixation du premier acide aminé, du côté C-terminal, sur la résine. La fonction NH_2 et les groupements réactifs de la chaîne latérale sont préalablement protégés.
- b. La dé-protection de la fonction NH_2 .
- c. Le couplage avec le second (ou le n -ième acide aminé) protégé sur le premier (ou le $n-1$) acide aminé fixé.
- d. La dé-protection des chaînes latérales du peptide suivi de la libération du peptide du support solide.
- e. La purification du peptide par chromatographie liquide.

Le procédé mis en œuvre ici pour la synthèse de ces peptides marqués utilise la méthode « Fmoc ». Elle fait référence au groupement utilisé pour la protection des fonctions NH_2 . En effet, la protection du groupe amino doit être facilement enlevée mais doit être suffisamment stable pour subir les conditions de couplage et les autres réactions. Les

groupements le plus utilisés pour cette étape sont le Fmoc (9-Fluorenylméthoxycarbonyl) et le Boc (t-Butoxycarbonyl). La méthode Fmoc est souvent préférée à la méthode Boc, dans la mesure où elle évite notamment l'utilisation de réactifs comme l'acide fluorohydrique. Elle permet également des synthèses peptidiques rapides et entièrement automatisables.

Dès lors, on nommera respectivement AQUA 1, AQUA 2 et AQUA 3 les peptides 1, 2 et 3 marqués par la Lysine marquée U- $^{13}\text{C}_6$; $^{15}\text{N}_2$. L'analyse LC-MS/MS d'un digest de RBP4 commerciale en présence de ces peptides marqués nous a permis de vérifier les propriétés physico-chimiques de ces peptides : coélution et différence de masse de 8,0. La figure 4.13 représente la coélution de chaque paire de peptides (endogène et marqué) ainsi que le spectre MS correspondant du peptide 2 et AQUA 2 (m/z 599,1 $z = 2$). On constate bien une différence de 4,0 m/z entre les deux massifs isotopiques, correspondant au marquage de la lysine.

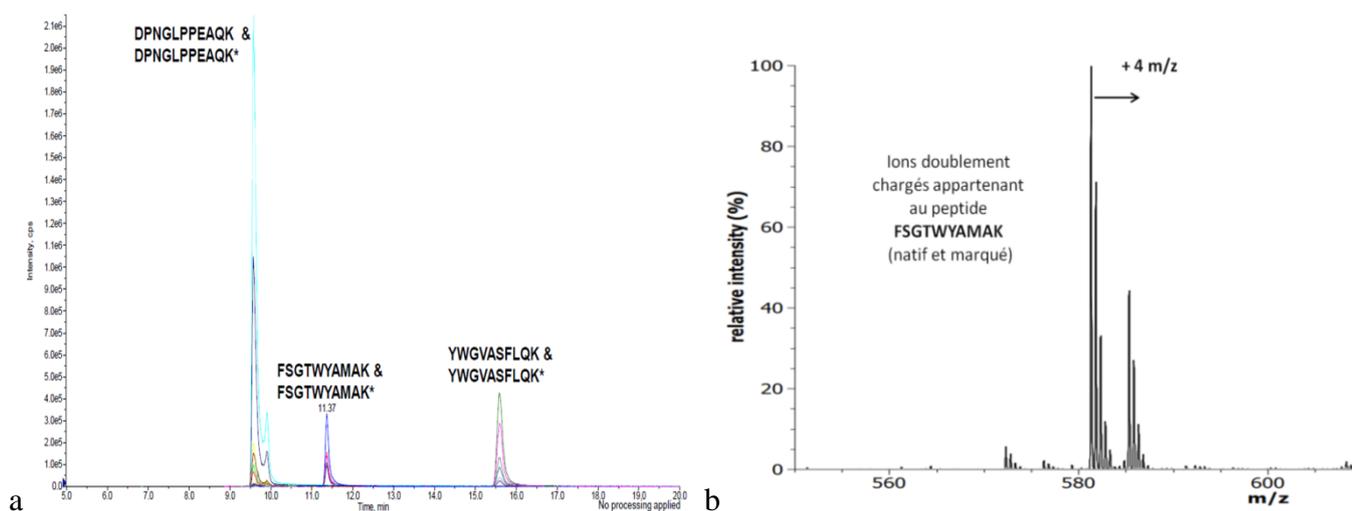


Figure 4.13 : (a) EIC de chaque peptide (endogène et marqué) présentant une coélution pour chaque paire de peptides. (b) Spectre MS des ions dichargés m/z 599,6 et 603,6 correspondant à la coélution du peptide 2 et son analogue AQUA présentant un décalage de 4 m/z caractéristique du marquage isotopique des lysines au ^{13}C et ^{15}N .

2.2.3 Quantification

2.2.3.1 Caractérisation LC-MS/MS de plasma

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser un digest de plasma brut par nanoLC-nanoESI-Qq-TOF MS/MS. La figure 4.14 représente le chromatogramme du TIC obtenu : il révèle la complexité de l'échantillon. Dans ces conditions la RBP4 n'a pu être identifiée. Les peptides 1 (FSGTWYAMAK) et 2 (YWGVASFLQK) et 3 (DPNGLPPEAQK) n'ont pu être identifiés qu'à partir des appels d'ions. Ainsi, les chromatogrammes du courant

ionique extrait (EIC) correspondant aux ions dichargés de ces deux peptides sont présentés dans la figure 4.15. La résolution et l'intensité des signaux peuvent être encore améliorées.

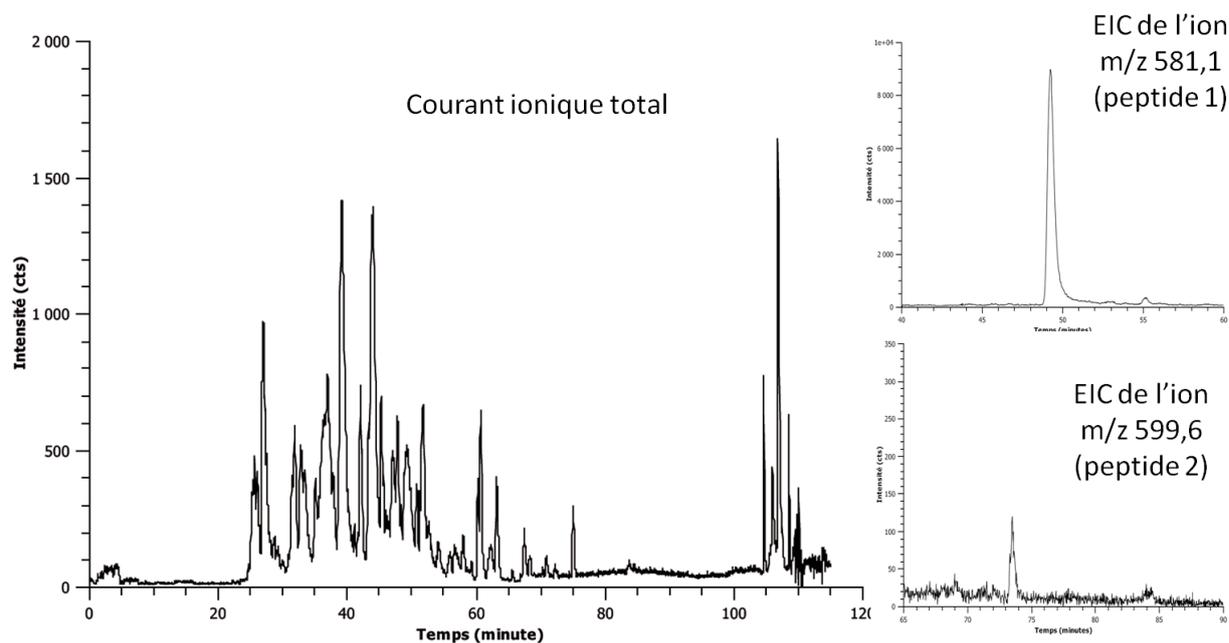


Figure 4.14 : A gauche, Chromatogramme du TIC d'un digest de plasma (1 pmol injecté) par nanoLC-nanoESI-Qq-TOF MS. A droite, les EIC des ions m/z 581,1 et 599,6.

C'est pourquoi le même échantillon a été analysé par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS/MS. Le chromatogramme du TIC correspondant à cette analyse est représenté dans la figure 4.15. Là encore, les peptides 1 et 3 n'ont pu être identifiés qu'à partir d'une interprétation manuelle (par appel d'ions).

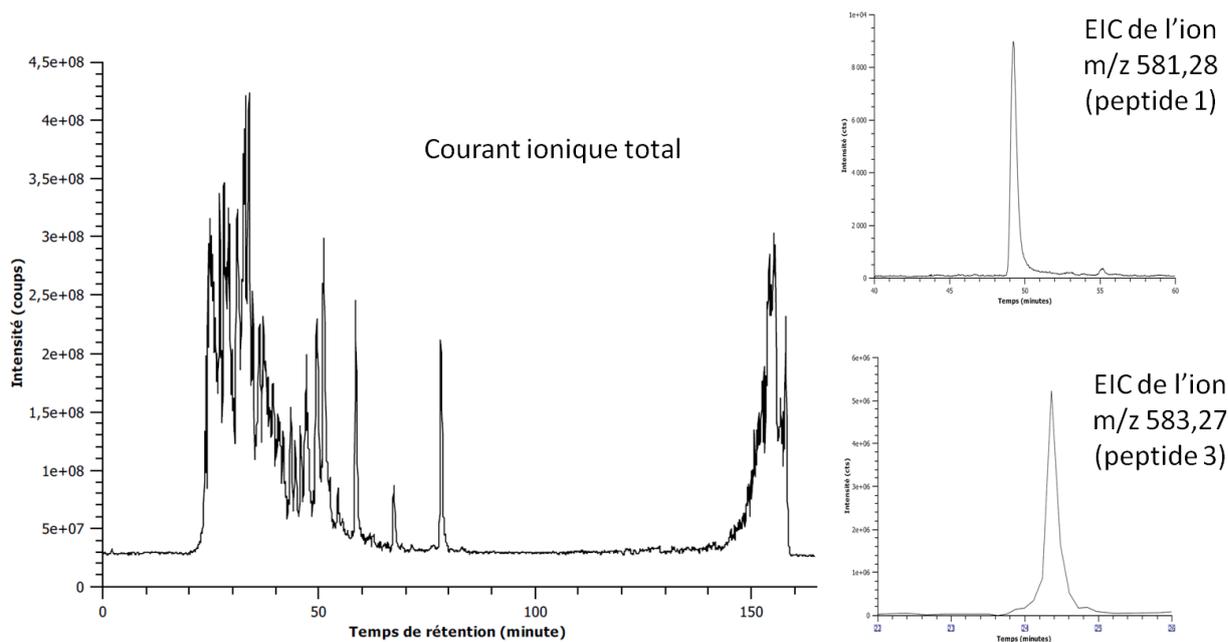


Figure 4.15 : A gauche, le chromatogramme du TIC d'un digest de plasma (1 pmol injecté) par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS. A droite, les EIC des ions m/z 581,28 et 583,27.

L'ensemble de ces résultats tend à laisser penser que la grande gamme dynamique des protéines présentes dans l'échantillon de plasma brut rend difficile l'interprétation. De fait, nous avons décidé de travailler à partir d'échantillons de plasma ayant subi une étape de déplétion afin de s'affranchir des protéines majoritaires. Toutefois, on constate une augmentation de la résolution et de l'intensité des pics chromatographiques lorsque l'on utilise l'analyseur Qh-FTICR. De fait, un digest de plasma déplété a été analysé par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS/MS afin d'optimiser encore nos conditions d'analyse MS et MS/MS. Le TIC obtenu (figure 4.16) n'apparaît que légèrement simplifié par rapport à celui obtenu à partir du digest de plasma brut.

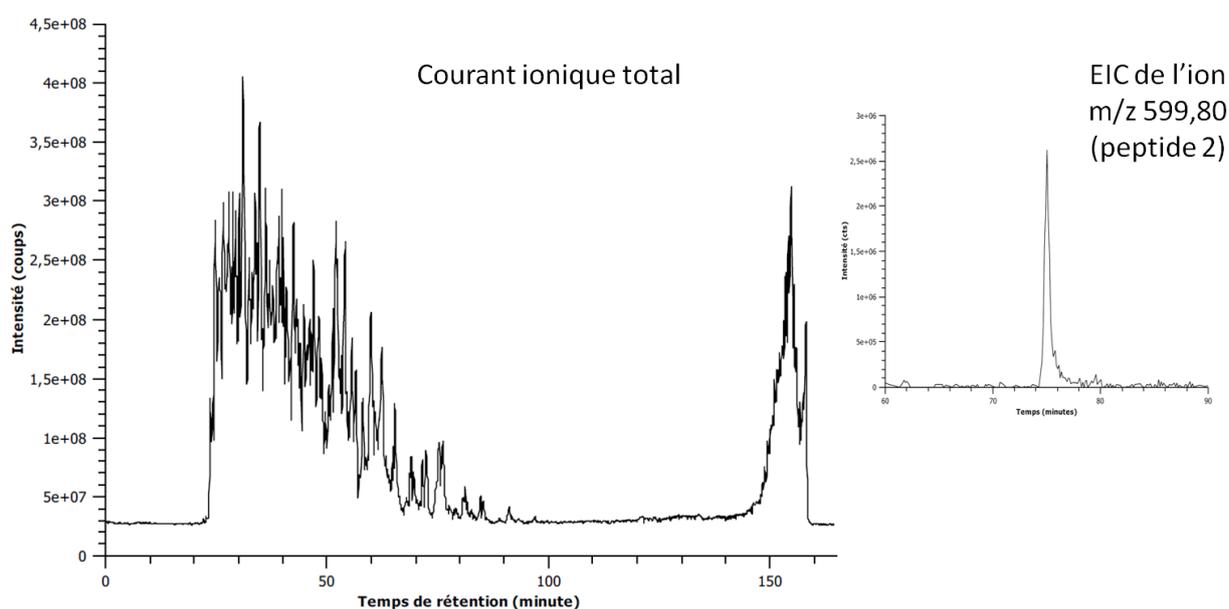


Figure 4.16: A gauche, chromatogramme du TIC d'un digest de plasma déplété (1 pmol injecté) par nanoLC-nanoESI-Qq-TOF MS. A droite, le EIC des ions m/z 599,80.

En revanche, on remarque que le chromatogramme du EIC correspondant au peptide 2 est intense alors qu'il ne l'était pas dans le cadre précédent. Les peptides 1, 2 et 3 sont identifiés à partir de l'interrogation de banque de données (SwissProt), garantissant l'identification de la RBP4 dans l'échantillon déplété.

Ainsi, la suite de la mise en place de la quantification se poursuivra par l'analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS/MS des échantillons à doser puisqu'on obtient de meilleures résolutions et une meilleure sensibilité. Par ailleurs, la précision de masse de cet analyseur haute-résolution permet de s'affranchir du suivi de transition, qu'impose le mode MRM, pour s'assurer du (ou des) peptide que l'on suit pour la quantification.

2.2.3.2 Etalonnage

La méthodologie AQUA utilise des peptides marqués ajoutés en quantité connue dans un échantillon avant l'étape d'hydrolyse enzymatique [43]. La dernière étape de la mise en place de cette quantification absolue consiste ainsi à établir des droites d'étalonnage pour chaque peptide AQUA. La concentration plasmatique de la RBP4 a été prise en compte pour déterminer la gamme d'étalonnage ainsi que les étapes de dilutions lors de la préparation d'échantillon. Par ailleurs, la gamme d'étalonnage a été déterminée à partir de l'analyse LC-MS/MS en triplicat de mélanges équimolaires des peptides AQUA 1, 2 et 3 dont les concentrations s'échelonnent de 31,5 à 500 fmol/ μ L. Une droite de calibration est réalisée pour chaque peptide AQUA.

Deux types de droites d'étalonnage ont été établis: l'une qui utilise la moyenne des aires sous-tendues par les pics du EIC pour chaque peptide AQUA (annexe 4.2) calculées par le logiciel MascotDistiller (MatrixScience), et l'autre basée sur la moyenne des intensités des pics monoisotopique de l'ion précurseur de chaque peptide AQUA (annexe 4.3) recueillis à partir du logiciel DataAnalysis (Bruker). Les coefficients de variation (CV) des masses des ions précurseurs sont inférieurs à 0,001%, ce qui confirme la précision de mesure de l'analyseur FT-ICR. De plus, le CV de la mesure de temps de rétention est inférieur à 10% mettant en avant la reproductibilité de la séparation chromatographique.

Enfin, les coefficients de corrélation (R^2) obtenus pour chaque droite sont supérieurs à 0,99 ce qui confirme le caractère linéaire de l'évolution du signal (aire sous-tendue par pic chromatographique, intensité du pic MS) avec la concentration des peptides. Il est intéressant de noter que ces coefficients de corrélation sont liés à la préparation de l'échantillon [43, 44]

2.2.3.3 Quantification de la RBP4 totale

La validation de cette quantification s'est effectuée à partir d'échantillons de plasma brut et de plasma déplété ; tous deux digérés en présence de 50 fmol/ μ L de peptides AQUA. Nous avons, par ailleurs, cherché à comparer les résultats de la quantification obtenus à partir soit des aires soit des intensités. Les analyses sont effectuées en triplicat par échantillon. Les annexes 4.4 et 4.5 récapitulent les données moyennées pour la quantification de la RBP4. La RBP4 contenue dans l'échantillon déplété a été quantifiée à partir des aires des pics de l'EIC de chaque peptide ; tandis que la RBP4 contenue dans le plasma brut a été calculée à partir des intensités des signaux MS de chaque peptide.

Ainsi, dans le premier cas, nous avons pu déterminer la concentration en RBP4 totale dans le plasma déplété à 1,0 pmol/ μ L (avec les concentrations de 1,1 pmol/ μ L pour le peptide 1 ; 1,1 pmol/ μ L pour le peptide 2 et 0.9 pmol/ μ L pour le peptide 3). Dans le deuxième cas, la concentration de RBP4 dans le plasma brut a été estimée à 1,2 pmol/ μ L (avec les concentrations de 1,2 pmol/ μ L pour le peptide 1 ; 1,3 pmol/ μ L pour le peptide 2 et 1.2 pmol/ μ L pour le peptide 3). Ces deux valeurs sont cohérentes avec celles trouvées dans la littérature (0,9 - 1,9 pmol/ μ L)(Berni 1985 ;Raghu 2003). La différence de concentration observée peut être expliquée par l'étape de déplétion, connue pour entraîner des protéines minoritaires associées à l'albumine notamment (Zhou 2004). En effet, la TTHY, également appelée pré-albumine, fait partie de la famille des albumines. On peut donc supposer qu'elle possède des propriétés semblables à l'albumine sérique, et par conséquent avoir été entraînée dans la fraction majoritaire lors de la déplétion entraînant ainsi de la RBP4 qui lui est associée.

On retiendra...

A partir d'un travail bibliographique, nous avons pu définir les critères que doivent respecter le choix des peptides AQUA, et les appliquer à notre étude. Ainsi les peptides FSGTWYAMAK, YWGVASFLQK et DPNGLPPEAQK ont été choisis pour le marquage isotopique.

Nous avons pu mettre en place la quantification absolue de la RBP4 en établissant des courbes d'étalonnage à partir (i) des aires sous-tendues par les courants ioniques extraits de chaque peptide AQUA et (ii) de l'intensité des signaux MS de ces derniers.

Enfin cette méthodologie a été validée à partir de la quantification de RBP4 totale issus d'échantillon de plasmas digérés en solution. Les concentrations de RBP4 déterminées sont en accord avec les données physiologiques sur cette protéine.

3 Purification de la RBP4

L'objectif ici est de parvenir à mettre en place une méthode de purification de la RBP4 sous sa forme libre à partir d'un échantillon de plasma afin de permettre sa quantification absolue dans le cadre d'une dégradation plasmatique. La stratégie de purification devra prendre en compte les critères suivants :

- Simplicité de mise en œuvre, c'est-à-dire comporter un minimum d'étapes afin de (i) limiter le temps de préparation de l'échantillon, (ii) limiter la perte de matériel protéique.
- Compatibilité directe avec la spectrométrie de masse, c'est-à-dire veiller à la compatibilité des conditions expérimentales (solvants, sels) de la purification avec une analyse par LC-MS/MS.

3.1 Point bibliographique

La littérature fait état de différentes stratégies de purification pour la RBP4 et la TTHY à partir de plasma. La plupart d'entre elles décrivent une purification du complexe RBP4-TTHY dans un premier temps, suivi ensuite de sa dissociation [45-47]. De façon générale, une étape de chromatographie d'échange ionique ou/et de gel filtration parvient à purifier le complexe qui est suivi par des électrophorèses sur gel préparatives [46], de gel filtration à faible force ionique [45] or par dénaturation en présence d'urée [47, 48].

La RBP4 seule peut être purifiée à partir de chromatographie d'affinité à partir de colonne de Sepharose greffée avec de l'acide rétinoïque [49] ou de la TTHY [50]. La chromatographie d'interaction hydrophobe a également été utilisée, et s'inscrit comme la méthode de référence pour la purification de la RBP [51]. Enfin, des méthodes pour purifier la TTHY existent : une précipitation au sulfate d'ammonium accompagnée d'une chromatographie échange d'anion [52] ou encore le jaune Remazol, colorant qui se fixe spécifiquement à la TTHY en présence d'albumine [53, 54]. Enfin, il existe des stratégies de purification du complexe RBP4-TTHY qui combinent tous ces principes de séparation et qui atteignent de très bons rendements.[55].

Par ailleurs, le choix de la méthode de purification devant être mise en place doit respecter certaines conditions liées à la finalité même de notre étude. Tout d'abord, au-delà de la quantification de la RBP4 dans le plasma, l'objectif est de proposer à l'EFS une méthode simple et robuste de suivi de dégradation de plasma qui soit facilement transférable au sein de ses unités comme outil de contrôle. C'est pourquoi la stratégie de purification doit comporter un minimum d'étapes afin de limiter la manipulation d'échantillon et le temps de préparation. Par ailleurs, cette étude s'inscrit dans le cadre d'un suivi de dégradation. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser un procédé long susceptible d'altérer l'échantillon. Ainsi, la purification historique de la RBP4 proposée par Kanai doit être écartée. En effet, elle ne

nécessite pas moins de six étapes principales (une précipitation protéique, trois gels filtration, une chromatographie échangeuse anionique, électrophorèse sur gel préparative).

Enfin, il est impératif que les solutions et autres solvants utilisés permettent l'analyse en spectrométrie de masse. C'est pourquoi l'approche de Peterson qui utilise du PBS pour la gel filtration ne peut pas être appliquée dans notre cas.

Néanmoins, notre démarche de purification se base sur les techniques évoquées dans la littérature. Plusieurs approches ont été envisagées et testées. La masse moléculaire de forme complexée de la RBP4 s'élève à 75 kDa tandis que la forme libre se trouve à 21 kDa, la première approche envisagée a consisté à utiliser des méthodes basées sur l'exclusion stérique afin de séparer ces deux formes. Ensuite, des méthodes d'isolation plus sélectives comme la précipitation différentielle des protéines voire spécifique, comme l'immuno-chromatographie, ont également été mises en place. Un suivi par électrophorèse monodimensionnelle sera effectué pour caractériser la purification, et pourra être complété par une analyse MALDI-TOF MS après excision des bandes d'intérêt.

3.1.1 Exclusion stérique

3.1.1.1 Ultrafiltration centrifuge

De façon intuitive, des dispositifs d'ultrafiltration centrifuge ont été utilisés. Ce type de dispositif se compose de deux compartiments séparés par une membrane semi-perméable, caractérisée par son matériau et son seuil de coupure. La filtration s'effectue par centrifugation : les protéines de masses moléculaires supérieures au seuil de coupure de la membrane se situent dans la partie haute du dispositif, tandis que les protéines de masse moléculaire inférieure au seuil de coupure se retrouvent dans la partie inférieure. En utilisant des seuils de coupures adaptés (typiquement 30 ou 50 kDa), il apparaît donc possible de discriminer les deux formes de la RBP4 : la forme libre dans l'ultrafiltrat et la forme complexée dans le concentrat. Trois types de membranes ont été utilisées : polyethersulfone (non hydrophile, non-hydrophobe faible taux d'interaction, bonne résistance), tri-acétate de cellulose (très hydrophile, faible taux d'interaction, résistance chimique) et Hydrosart® (dérivé de cellulose régénérée, extrêmement hydrophile, peu absorbante).

Ces dispositifs se distinguent non seulement par le type de membrane employé mais aussi par des géométries différentes (figure 4.17) : pour les modèles Amicon® (Millipore) et Vivaspin® (Sartorius), les membranes sont placées le long des parois du dispositif, tandis que

le modèle Centrisart® (Sartorius) propose une membrane perpendiculaire. Les échantillons de plasma ont été préalablement dilués afin de prévenir le colmatage de la membrane.

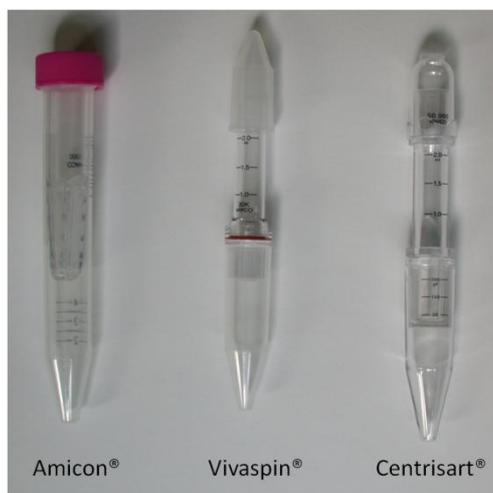


Figure 4.17 : Différents dispositifs d'ultrafiltration utilisés. Les systèmes Amicon® et Vivaspin® qui utilisent des membranes tangentielles, et le système Centrisart® qui utilise une membrane perpendiculaire.

Tout d'abord, on constate qu'aucune séparation ne semble s'opérer avec le système AMICON® avec un seuil de coupure de 30 kDa comme le montre la figure 4.18. En effet, le profil électrophorétique d'un échantillon de plasma brut et de la fraction concentrée sont identiques tandis que la piste correspondant à la fraction de l'ultrafiltrat ne présente aucune bande protéique ; ce qui laisse penser à un colmatage de la membrane malgré la dilution.

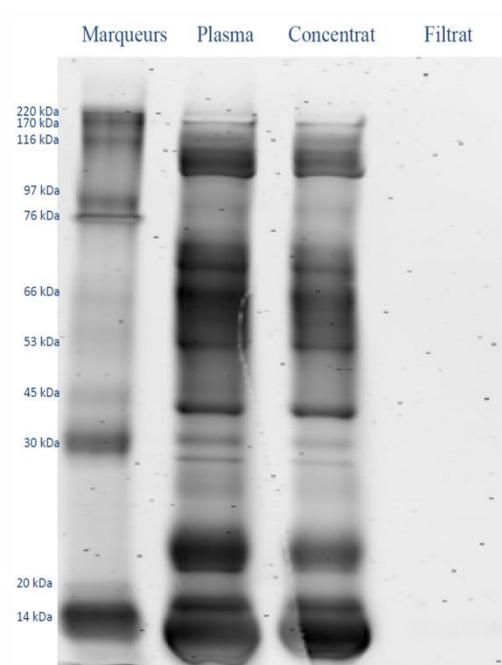


Figure 4.18 : Gel 1D SDS-PAGE (12%T) des fractions recueillies après ultrafiltration sur Amicon® 30 kDa.

Par ailleurs, les résultats sont similaires avec le système Vivaspin® 30 kDa et 50 kDa à base de membrane PES/Hydrosart®) ainsi que le système Amicon® 30kDa et 50 kDa à base de membrane PES ou cellulose. Là encore, aucune protéine n'a pu être observée dans les fractions d'ultrafiltrats.

Pour confirmer l'hypothèse de colmatage des protéines majoritaires (l'albumine notamment), la même expérience a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant des membranes de même nature mais avec des seuils de coupures volontairement supérieurs. Par exemple, un seuil de coupure de 100 kDa a été utilisé sur un dispositif Vivaspin® (*non montré*). Le profil électrophorétique de chaque fraction est identique dans le cadre d'un seuil de coupure de 30 ou 50 kDa confirmant ainsi l'hypothèse du colmatage de la membrane.

Afin de parvenir à solutionner notre problème de colmatage, un autre dispositif, le modèle Centrisart® a été testé. Il intègre une membrane à base de tri-acétate de cellulose possédant un seuil de séparation de 20 kDa ainsi qu'une géométrie différente. Ce seuil a été choisi à titre d'essai afin de rendre compte de l'efficacité de la séparation des protéines plasmatiques sur ce type de membrane. La figure 4.19 présente le profil électrophorétique de chaque fraction. On remarque alors que les profils protéiques de chaque piste sont identiques. De nombreuses protéines se retrouvent dans l'ultrafiltrat alors que leur masse moléculaire est supérieure à 20 kDa.

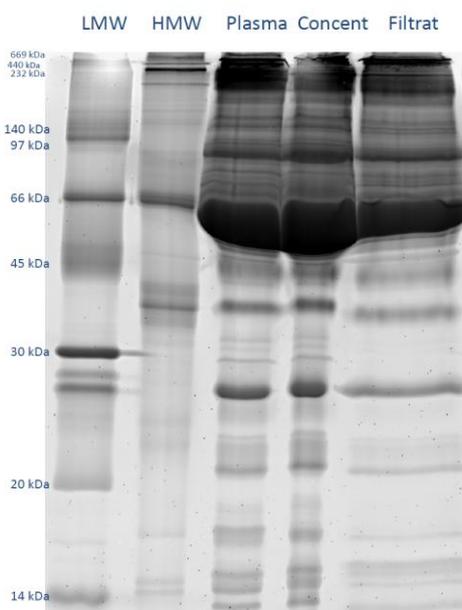


Figure 4.19: Gel 1D SDS-PAGE (14%T) des fractions recueillies après ultrafiltration sur Centrisart® 20 kDa pour vérifier l'efficacité de la membrane

Ainsi, aussi séduisante que cette méthode pouvait paraître de part sa simplicité de mise en œuvre, nous n'avons pas pu séparer un échantillon de plasma en deux fractions permettant

de discriminer les deux formes de la RBP4 (libre et complexée). Plusieurs études ont utilisé une stratégie d'ultrafiltration afin d'isoler des protéines plasmatiques de masse moléculaire inférieure à 25 kDa [56-58]. Elles confirment la difficulté à appliquer ces dispositifs pour séparer les protéines plasmatiques, notamment car la plupart d'entre eux ne retiennent pas les protéines de haute masse moléculaire [58]. Cela met en avant une nouvelle fois la difficulté d'appliquer de tels dispositifs sur des échantillons plasmatiques, du fait de leur grande complexité.

3.1.1.2 Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (ou gel filtration) base sa séparation sur l'aptitude des protéines à pénétrer des pores de la phase stationnaire. La taille des pores détermine le domaine de séparation. Le choix de la phase stationnaire est donc fait en fonction des molécules à séparer. En général, la phase stationnaire pour ce mode de chromatographie est un gel hydrophile (type dextran, agarose, polyacrylamide) dépourvu de capacités d'adsorption. Il se présente sous forme de billes poreuses hydrophiles, dont la porosité dépend du degré de réticulation. Il en existe différents types en fonction de la taille des billes et de leur porosité. Le tableau 4.1 récapitule les caractéristiques des différentes phases testées.

Les phases mobiles utilisées doivent uniquement servir à solubiliser les analytes, et être compatibles avec le système de détection. Il est préférable de travailler en milieu tamponné afin de contrôler à la fois le pH et la force ionique.

Tableau 4.1 : Phases de gel filtration testées et leurs principales caractéristiques

Nom	Type de phase	Volume de colonne	Taille de particule	Gamme de masse (Da)
Sephadex G50	Dextran	1,6 mL	20 – 80 µm	1500 - 30000
Hitrap	Dextran	1 mL	20 -80 µm	1500 - 30000
SuperdexPC 200 PC 3.2/30	Mélange de dextran et d'agarose réticulé	2.4 mL	13 µm	10 000 – 600 000 (protéines globulaires)

Une solution de bicarbonate d'ammonium (50 mM, pH 8,0) a été choisie comme phase mobile pour sa compatibilité avec la spectrométrie de masse. La colonne contenant la phase Sephadex G50 a été remplie au laboratoire (4,6 mm id, 100 mm). Cette phase est prévue pour séparer des protéines entre 1500 et 30000 Da. On s'attend ainsi à recueillir la forme complexée dans le volume d'exclusion, alors que la forme libre devrait être séparée.

La figure 4.20 illustre le profil chromatographique obtenu avec la phase G50. On constate qu'aucune séparation ne s'effectue sur cette phase.

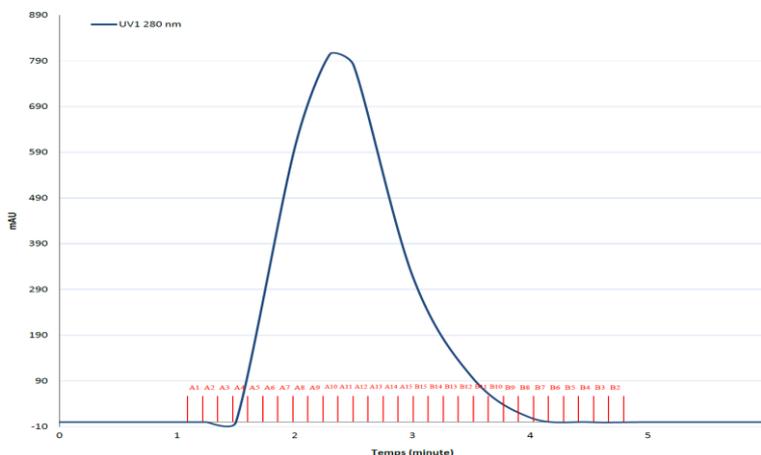


Figure 4.20 : Chromatogramme d'un échantillon de plasma sur Sephadex G50 (colonne préparée au laboratoire)

Afin de s'affranchir des problèmes de remplissage, nous avons décidé d'utiliser des colonnes commerciales. Ainsi, dans un premier temps, un essai de séparation a été réalisé sur une colonne de type Hitrap, couramment utilisée dans les étapes de dessalage. Elle contient également de la phase Sephadex G50 Superfine. Le profil chromatographique obtenu, représenté dans la figure 4.21, est caractéristique des protéines plasmatiques sur cette colonne. Un suivi par gel SDS-PAGE a été effectué sur les fractions d'intérêt correspondant aux maxima des pics chromatographiques. La première fraction majoritaire contient les lipoprotéines de hautes densités ainsi que l'albumine. Dans les fractions suivantes, l'albumine est toujours présente. La RBP4 n'a pas pu être identifiée dans les bandes situées à 20 kDa.

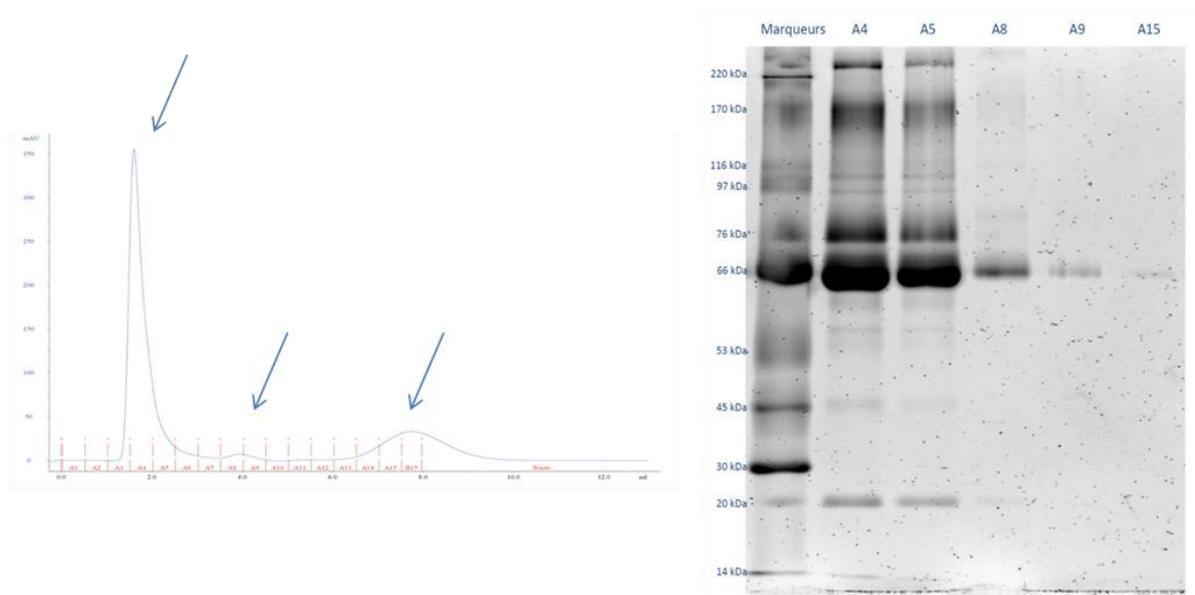


Figure 4.21: à gauche, le chromatogramme d'un échantillon de plasma obtenu sur colonne Hitrap (Sephadex G50) ; à droite, gel 1D SDS-PAGE (12%T) correspondant à la séparation des fractions recueillies (maxima d'intensité).

Nous avons ensuite utilisé une colonne analytique, Superdex200 PC 3,2/30 (4.6 mm i.d, 300 mm, GE Lifescience). La gamme dynamique de séparation annoncée s'étend de 10 à 600 kDa. Le profil chromatographique obtenu est représenté dans la figure 4.22. On observe 5 pics chromatographiques distincts; on peut également noter deux épaulements après le second et le troisième pic. Un suivi par gel SDS-PAGE a été effectué sur les fractions collectées A2 à A11 afin de contrôler la composition de chaque fraction. Ainsi, malgré une séparation apparente, l'étude des fractions par SDS-PAGE montre qu'aucune réelle discrimination par la taille n'est faite. En effet, plusieurs bandes se retrouvent dans toutes les fractions, en particulier l'albumine.

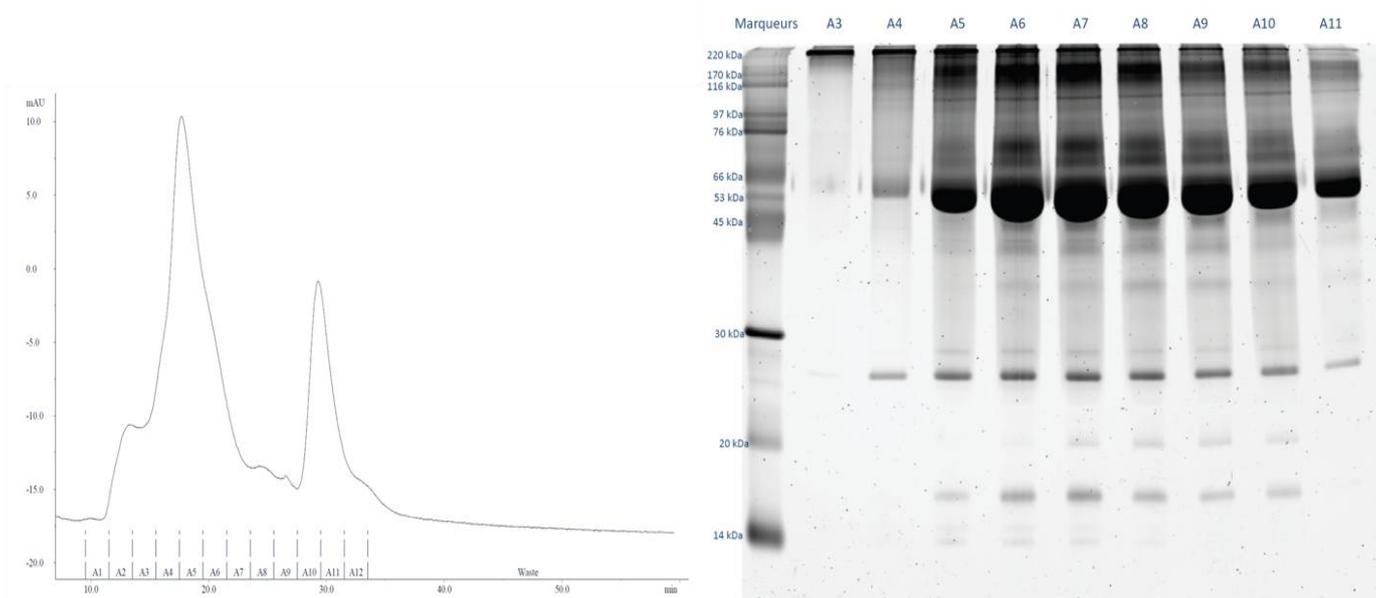


Figure 4.22 : à gauche, le chromatogramme d'un échantillon de plasma obtenu sur colonne analytique Superdex PC 200 3.2/100 ; à droite, gel 1D SDS-PAGE (12%T) correspondant à la séparation des fractions recueillies.

Ainsi, en se basant sur les caractéristiques de chaque phase de gel filtration, nous avons envisagé pouvoir séparer la forme complexée de la RBP4 avec la TTHY de masse moléculaire estimée à 75 kDa, de la forme libre de RBP4 dont la masse moléculaire avoisine 21 kDa. En effet, toutes les chromatographies d'exclusion stérique effectuées n'ont pu répondre à nos attentes en posant dans chaque cas des problèmes de résolution. Cependant, des études font état d'approches similaires pour séparer la RBP4 libre du complexe. Toutefois, les colonnes chromatographiques décrites possèdent des diamètres internes plus grands permettant un volume de lit chromatographique plus important [59]. Nous avons également envisagé d'augmenter la dilution de l'échantillon de plasma avant la séparation ;

mais compte tenue de la faible concentration de RBP4 (entre 0,9 et 1,9 pmol/ μ L [7, 55]), il n'aurait pas été possible de la détecter sur gel.

3.1.2 Précipitation séquentielle

L'approche par exclusion stérique s'étant révélée infructueuse, nous avons envisagé une précipitation séquentielle [60], plus sélective. Les protéines sont sensibles aux conditions ioniques ou de pH pouvant les rendre insolubles. Il est donc possible d'ajuster les concentrations en électrolyte ou de pH du milieu pour isoler la protéine désirée. Toutefois, il faut veiller à ne pas utiliser des pH trop acides qui pourraient provoquer l'hydrolyse des protéines en solution. C'est pourquoi, nous avons fait le choix de ne faire varier que les proportions en électrolytes.

Une force ionique élevée peut avoir deux effets sur la solubilité : (i) neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité des protéines, (ii) entrer en compétition avec elles pour les molécules d'eau disponibles en solution. Quand la concentration en sel est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci précipite. C'est ce qu'on appelle le phénomène de « *salting-out* ». Cette différence de solubilité est à l'origine de cette méthode.

La série de Hofmeister représentée dans la figure 4.23 décrit les effets relatifs de différents ions sur la précipitation des protéines ou la promotion de leurs interactions hydrophobiques. L'anion phosphate et le cation ammonium apparaissent des plus efficaces pour précipiter les protéines tandis que l'anion chlorate et le cation Ca^{2+} sont, au contraire, les plus efficaces pour les remettre en solution.

Précipitation (salting out)

Solubilisation (salting in)

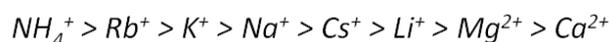
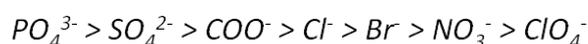


Figure 4.23 : La série d'Hofmesiter

Le sulfate d'ammonium (NH_4SO_4) est très soluble en solution aqueuse et permet d'atteindre des forces ioniques très élevées. Il est extrêmement hydrophile et entre en compétition efficacement avec les protéines pour l'eau causant leur déshydratation. Les ions sulfates et ammoniums sont relativement petits et peuvent facilement s'approcher des résidus

Chapitre 4

chargés des protéines pour les neutraliser. Ce sel a aussi l'avantage de peu dénaturer les protéines et permet ainsi de préserver l'activité biologique des protéines isolées.

C'est ainsi que plusieurs saturations en NH_4SO_4 ont été testées, entre 30 et 60% sur des prises d'échantillon de 1 mL de plasma. Les différentes étapes de précipitation se déroulent à 4°C pendant plusieurs heures. Les précipitâts sont recueillis ensuite après centrifugation puis séparés par 1D-SDS PAGE. La figure 4.24 présente le suivi de purification par SDS-PAGE pour chaque niveau de saturation. Pour chaque piste, on observe une bande dans la zone des masses moléculaires de 20 kDa. Les bandes de la zone contrastée ont été excisées, digérées puis analysées par nanoLC-nanoESI-Qq-TOF MS/MS. Après interrogation des banques de données, la RBP4 n'a pu être identifiée. Toutefois, en étudiant manuellement les spectres MS/MS, on parvient à retrouver des traces de peptides de la RBP4 présents dans la fraction correspondant à une saturation de 60% en sulfate d'ammonium. La figure 4.24 représente la fragmentation de l'ion de m/z 581,1 correspondant au peptide FSGTWYAMAK (38-47) de la RBP4. Même s'il est possible de déterminer la séquence de ce peptide, on notera que l'intensité du spectre MS/MS est particulièrement faible.

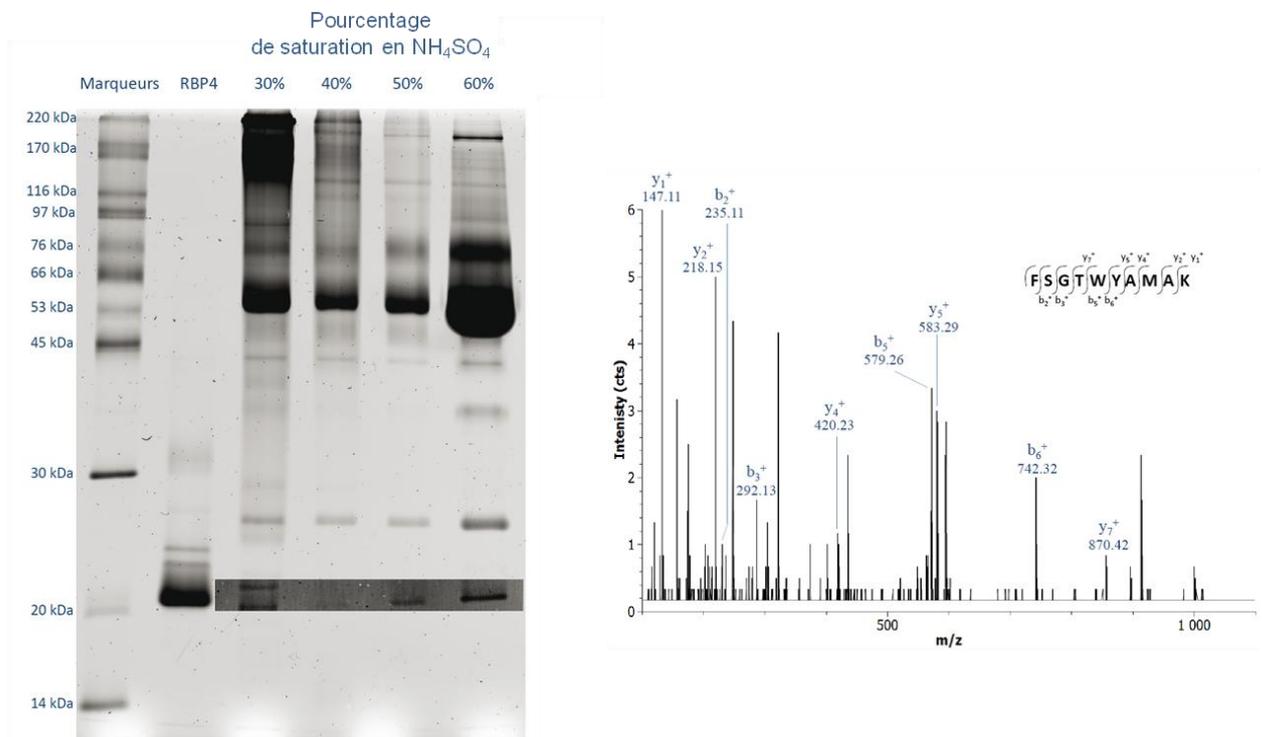


Figure 4.24 : Suivi de la précipitation séquentielle au sulfate d'ammonium d'un échantillon de plasma. A gauche, gel 1D SDS-PAGE avec les quatre taux de saturation testés (entre 30% et 60%). A droite, le spectre MS/MS de l'ion 581,1 correspondant au peptide 38-47 de la RBP4, obtenu après excision et digestion en gel de la dernière bande de la piste 60%.

Ainsi, on montre qu'un pourcentage de saturation de 60% en sulfate d'ammonium permet de récupérer de façon sélective la RBP4. Toutefois, l'albumine demeure présente en grande quantité dans cette fraction, d'après l'intensité des bandes ce qui limite la détectabilité des protéines de plus faible abondance. Par ailleurs, on retrouve le taux de saturation proposé par Raghu à partir du gel SDS-PAGE où la bande de la TTHY est absente. Or dans les conditions SDS-PAGE, on suppose la dissociation de tous les édifices protéiques. On a donc décidé de se tourner vers des méthodes encore plus sélectives, comme la chromatographie d'immuno-affinité.

3.1.3 Immuno-chromatographie

3.1.3.1 Déplétion des protéines les plus abondantes

Au cours des approches de purification précédentes, on a montré que l'albumine était présente dans toutes les fractions. C'est pourquoi nous avons envisagé d'utiliser une méthode de déplétion qui utilise l'immuno-chromatographie à partir de la colonne commerciale MARS Hu-6 (Agilent Technologies) dans le but de simplifier la composition de l'échantillon de plasma. On rappelle que la déplétion permet d'isoler les protéines majoritaires du plasma, soit 80%. Or, la RBP4 ne représente qu'1% de la fraction minoritaire. Nous avons ainsi comparé les profils électrophorétiques en conditions non dénaturantes afin de préserver la structure des édifices protéiques à partir de plasma brut et de plasma déplété (figure 4.25).

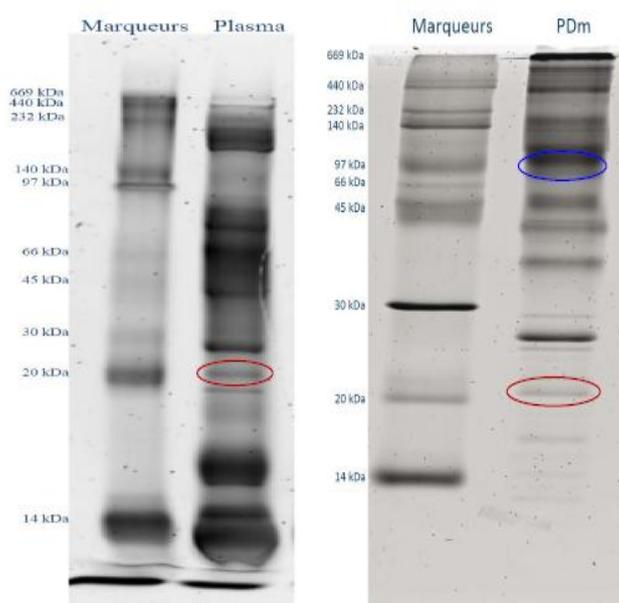


Figure 4.25 : Profils électrophorétiques en conditions non-dénaturantes d'un plasma brut (à gauche) et d'un plasma déplété par immunochromatographie (à droite). Le cercle bleu correspond à la zone des masses moléculaires de 75 kDa, et le cercle rouge aux masses moléculaires de 20 kDa.

Il apparaît clairement que la résolution du profil électrophorétique est meilleure dans le cas du plasma déplété. On s'intéresse aux bandes respectivement situées dans les zones de 75 kDa (cercle bleu) et 20 kDa (cercle rouge). Après excision et digestion « in-gel » de ces bandes d'intérêt, ces dernières ont été analysées par nanoLC-nanoESI-Qq-TOF. Ainsi, à partir de l'interrogation de banques de données, l'apolipoprotéine A1 a été identifiée dans le cas du plasma brut (non-déplété) alors que la forme libre de la RBP4 a pu être mise en évidence après déplétion et électrophorèse monodimensionnelle. La figure 4.26 représente le spectre MS/MS du peptide FSGTWYAMAK de la RBP4. On constate par ailleurs que l'intensité du signal MS/MS est nettement supérieure à celle observée à partir de la purification avec le sulfate d'ammonium saturé à 60% (après excision et digestion de la bande d'intérêt). En revanche, ni la RBP4 ni la TTHY n'ont pu être identifiées dans la zone de plus hautes masses moléculaires.

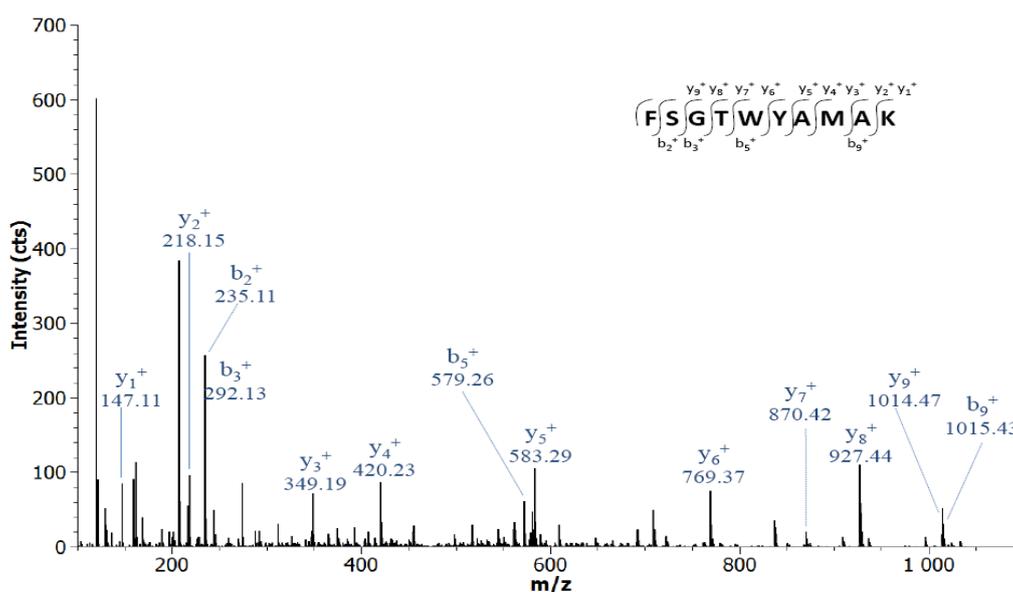


Figure 4.26 : Spectre MS/MS de l'ion 581,1 correspondant au peptide 38-47 de la RBP4, issu de la bande protéique située autour de 20 kDa (cercle bleu)

Ce résultat laisse à penser que l'immuno-déplétion associée à une séparation électrophorétique est un premier pas vers l'isolement de la forme libre de RBP4. En effet, il n'est possible pas de travailler directement avec la fraction de plasma déplété car au cours de la digestion en solution, les étapes de dénaturation et d'alkylation sont incontournables. De fait, il ne serait pas possible de quantifier la forme libre de la RBP4, mais uniquement sa concentration totale. En revanche, l'étape d'excision de bandes protéiques n'est pas toujours une étape quantitative, et dans notre cas d'étude pourrait être un point discutable.

3.1.3.2 Immuno-chromatographie sur colonne spécifique anti-RBP4

Enfin, la dernière méthode utilisée est la purification par chromatographie d'affinité à partir d'une colonne spécifique anti-RBP4. Il s'agit de l'approche la plus sélective, mais aussi l'une des plus coûteuses et des plus délicates à préparer, c'est pour cette raison qu'elle a été envisagée en dernier ressort. Il a donc fallu choisir un anticorps capable de reconnaître uniquement la forme libre. Les anticorps ont été achetés auprès de la société Hytest. Il s'agit d'anticorps produits par des cellules hépatiques de souris immunisées contre de la RBP4 humaine recombinante. Nous avons ensuite procédé au greffage de cet anticorps sur une phase Sepharose activée au N- hydroxysuccinimide. La chimie mise en jeu ici utilise le NHS comme meilleur groupe partant pour faciliter la réaction des amines primaires du ligand à greffer (ici l'anticorps). En effet, l'estérification des fonctions carboxyliques de la Sepharose avec le NHS conduit à la formation d'esters activés qui réagissent rapidement et efficacement avec le ligand conduisant à la formation de liaisons amides stables. Avant utilisation, la phase est conditionnée dans l'isopropanol afin de protéger les groupements actifs. Brièvement, le greffage s'effectue selon trois étapes : (i) le couplage après rinçage de la phase avec 1 mM HCl, (ii) la désactivation des groupements non-couplés à l'éthanolamine et (iii) le lavage de la phase en milieu acétate. 1mg d'anticorps est ainsi greffé sur la Sepharose. Cette quantité est suffisante pour fixer la RBP4 de façon quantitative.

L'échantillon de plasma a été dilué au 1/5^e ; cette dilution possède deux avantages : (i) éviter la surcharge de la colonne (ii) mais également de rendre les protéines de RBP4 plus accessibles. L'élution est réalisée par diminution de la force ionique de la phase mobile. Après fractionnement de l'éluât et concentration des fractions d'intérêt, un gel d'électrophorèse en conditions non dénaturantes est réalisé comme suivi de purification, et est représenté sur la figure 4.27. La concentration totale en polymère (%T) est de 14% afin de pouvoir observer les protéines de bases masses moléculaires. On constate la présence de deux bandes protéiques qui sont excisées, digérées et caractérisées par MS/MS.

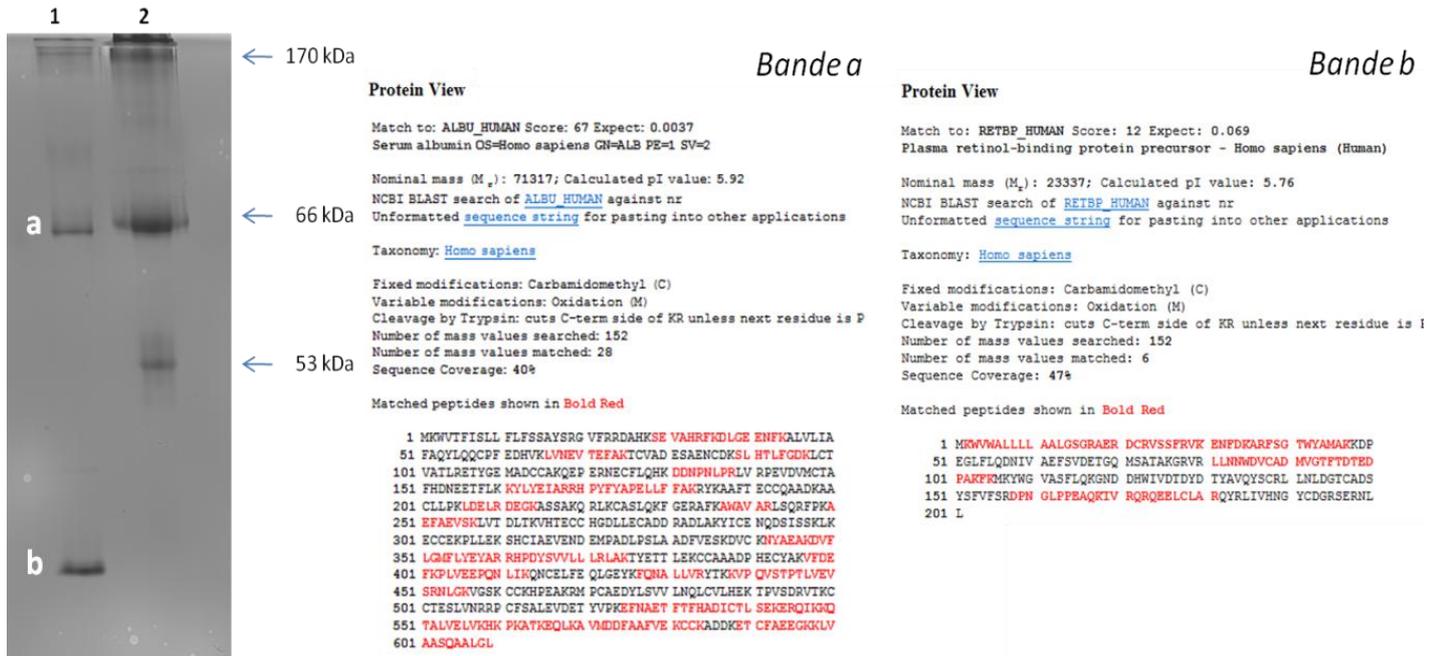


Figure 4.27 : A gauche, le gel 14% réalisé en conditions non-dénaturantes après purification sur colonne spécifique RBP4 (Piste 1 : fraction purifiée, Piste 2 : marqueurs de masse); A droite, les résultats MASCOT après excision, digestion et analyses LC-MS/MS

La figure 4.28 représente un second gel (14 %T) en conditions SDS-PAGE réalisé cette fois pour contrôler la spécificité réelle de l'anticorps greffé à partir de la fraction protéique retenue. On n'observe aucune bande protéique en dessous de 20 kDa, ce qui indique l'absence de TTHY dans la fraction protéique éluée. En effet, en conditions SDS-PAGE, on suppose la disruption de tous les édifices protéiques présents dans l'échantillon.

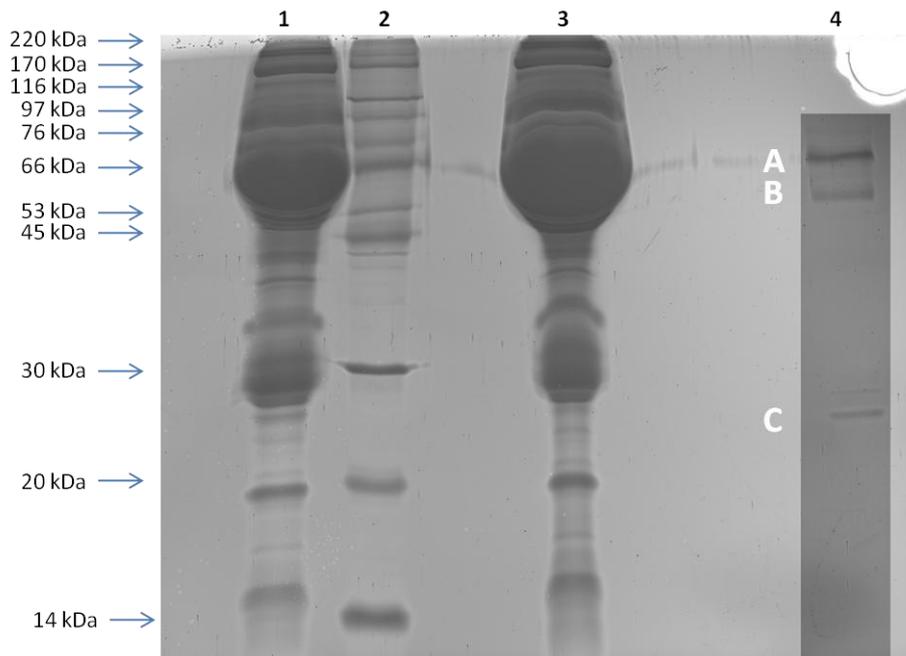


Figure 4.28 : gel (14%T) réalisé en conditions SDS-PAGE, après purification sur colonne spécifique-RBP4. Piste 1 : plasma avant purification, Piste 2 : marqueurs de masse, Piste 3 : protéines non retenues, Piste 4 : protéines éluées

Les bandes les plus intenses de la piste 4 ont été excisées, digérées puis caractérisées par MALDI-TOF/TOF. L'analyse MALDI-TOF/TOF identifie la présence d'albumine dans la bande A, et de RBP4 dans la bande C dont la PMF est représenté dans la figure 4.29.

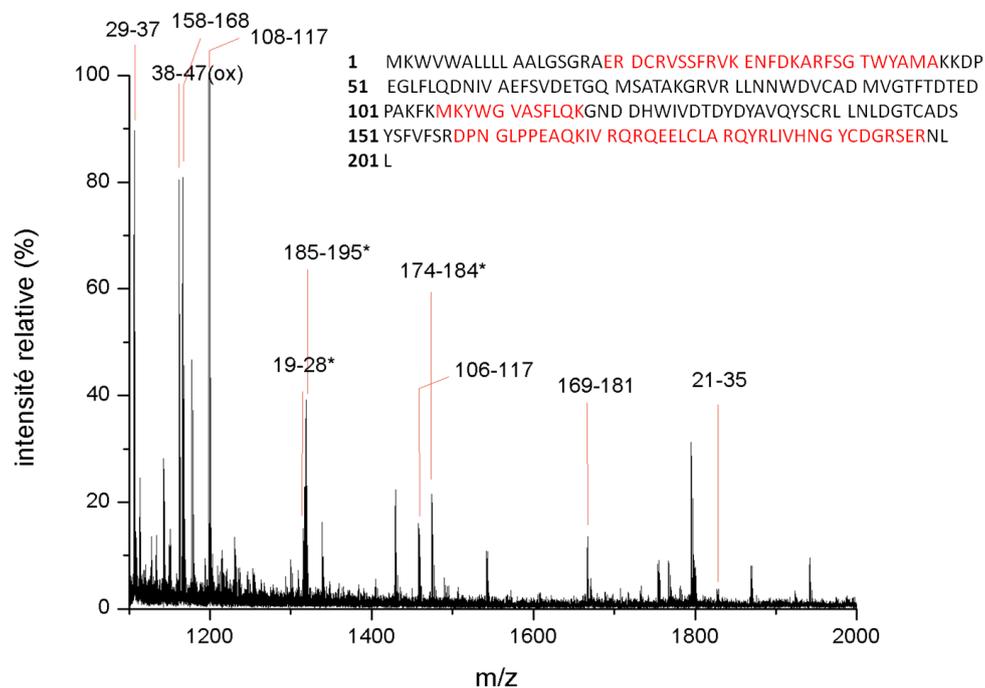


Figure 4.29 : PMF de la bande C obtenue par MALDI-TOF MS

A partir de ces différents résultats, on peut conclure que l'anticorps greffé est finalement spécifique de la forme libre de la RBP4.

On retiendra...

Plusieurs approches de purification ont été envisagées. Nous avons donc écarté successivement :

- l'exclusion stérique à partir de (i) dispositifs d'ultrafiltration centrifuges où plusieurs types de géométrie et de membranes ont été testés et (ii) de gel filtration à cause de problèmes essentiellement liés aux dimensions des colonnes.

- la précipitation séquentielle nous a permis d'identifier la RBP4 pour une saturation de 60% en sulfate d'ammonium mais la présence d'albumine demeure trop importante. De même, l'immuno-déplétion d'une électrophorèse sur gel nous a permis d'identifier de la RBP4. Ces deux approches nécessitent une étape supplémentaire de séparation par électrophorèse sur gel et poserait la question du rendement de la découpe du gel et de la digestion « in-gel ». En effet, la digestion en solution des fractions enrichies en RBP4 ne

permet pas de distinguer ses deux formes, libre et complexée, au cours de l'analyse LC-MS/MS.

Seule la dernière méthode nous permet de purifier la forme libre de la RPB4 à partir d'une colonne d'immuno-chromatographie en greffant un anticorps dirigée contre la RBP4. De plus, cette approche répond à nos critères de purification :

- simple: deux étapes de préparation sont nécessaires (chromatographie et concentration) qui minimisent la perte de matériel.

- rapide : comparée aux méthodes décrites dans la littérature (élution réalisée en 20 min, la centrifugation : 1h45).

- compatible avec la MS : l'étape de concentration permet également un dessalage de la fraction de RPB4 purifiée. Il est possible d'effectuer une digestion liquide suivie d'une analyse par LC-MS/MS pour effectuer la quantification.

4 Suivi de dégradation plasmatique

A partir des résultats présentés précédemment, il apparaît désormais possible de purifier la forme libre de la RBP4 à partir d'un simple échantillon de plasma dilué. Ainsi, la purification mise en place a été ensuite appliquée à la purification de la RBP4 dans le cadre d'un suivi de dégradation d'un plasma frais, obtenu juste après prélèvement.

Les conditions expérimentales ont été définies par l'EFS Nord-de-France : la dégradation s'effectue dans un environnement à 20°C, et le suivi est effectué par des prélèvements sur l'échantillon de plasma frais aux temps $t + 1.5h$ (t1), $t + 6h$ (t2), $t + 12h$ (t3), $t + 24h$ (t4) et $t + 72h$ (t5), avec t correspondant à l'heure du prélèvement. En effet, il faut que les poches de plasma soient déleucocytées dans les 6h qui suivent le prélèvement, viro-atténuées dans les 12 heures; au-delà de cette période, les poches sont redirigées vers les établissements de fractionnement. Le suivi des fractions de RBP4 purifiées est réalisé par gel d'électrophorèse monodimensionnelle en conditions non-dénaturantes, comme le montre la figure 4.30. On constate que la bande correspondant à la RBP4 n'apparaît qu'à partir de 24h après le prélèvement. De plus l'intensité de cette bande est la même jusqu'à 72h, ce qui laisse à penser qu'après 24h la dissociation du complexe RBP4-TTHY est totale.

Les fractions t1 à t5 ont été ensuite digérées en solution. L'analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS/MS confirme le profil électrophorétique observé sur le gel. En effet, dans les

fractions t1 et t2, seule l'albumine est identifiée. En revanche, à partir de la fraction t3, la RBP4 est également identifiée avec une moyenne de 10 peptides séquencés en MS/MS.

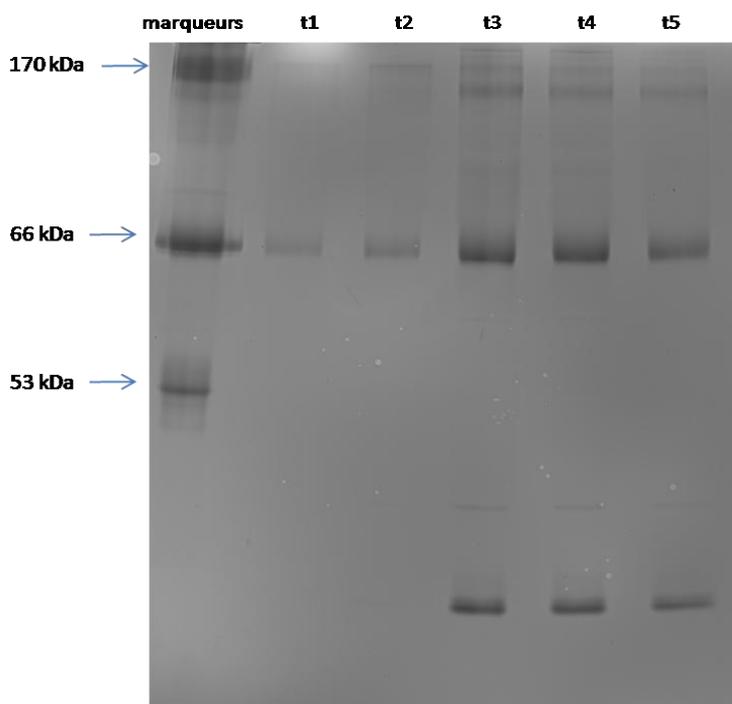


Figure 4.30 : Suivi de dégradation plasmatique après purification de la RBP4 entre t +1,5h et t +72h (gel 1D réalisé en conditions non-dénaturantes (14%T))

5 Conclusion

Une étude antérieure avait permis d'identifier la RBP4 comme marqueur potentiel de dégradation du plasma. L'un des objectifs était de mettre en place une stratégie de quantification absolue de la RBP4. Trois peptides FSGTWYAMAK (38-47), YWGVASFLQK (108-117) et DPNGLPPEAQK (158-168) de cette protéine ont ainsi été sélectionnés pour leur protéotypie, leur comportement chromatographique ainsi que leur fragmentation en MS/MS. La méthode analytique développée a été appliquée à la quantification absolue de la RBP4 totale, à partir d'un échantillon de plasma. Les concentrations calculées correspondent aux concentrations physiologiques, validant ainsi notre méthode d'analyse.

Par ailleurs, un important travail de purification de la RBP4 a été effectué. Après avoir considéré plusieurs voies de purification, nous sommes parvenus à purifier spécifiquement la forme libre de la RBP4 par immunochromatographie.

Enfin, cette purification a été appliquée dans le cadre d'un suivi de dégradation d'un échantillon de plasma. Par ce biais, nous avons, d'une part, validé l'utilisation de la RBP4 en

Chapitre 4

tant que marqueur de dégradation. D'autre part, nous avons pu constater que la dissociation du complexe RBP4-TTHY intervenait 12h après la plasmaphèrese lorsque le plasma est conservé à température ambiante.

A l'heure actuelle, le facteur VIII (ou facteur anti-hémophilique A) est dosé par l'EFS pour contrôler la stabilité du plasma transfusionnel. Nous proposons donc un nouveau marqueur qui est indépendant du sexe et de l'âge du donneur, contrairement au facteur VIII.

Bibliographie

1. Newcomer ME, Ong DE: Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochim Biophys Acta, Protein Struct Mol Enzymol* 2000; **1482**:57-64.
2. Raghu P, Sivakumar B: Interactions amongst plasma retinol-binding protein, transthyretin and their ligands: implications in vitamin A homeostasis and transthyretin amyloidosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 2004; **1703**:1-9.
3. Heller J, Horwitz J: Conformational Changes following Interaction between Retinol Isomers and Human Retinol-binding Protein and between the Retinol-binding Protein and Prealbumin. *Journal of Biological Chemistry* 1973; **248**:6308-16.
4. Ronne H, Ocklind C, Wiman K, Rask L, Obrink B, Peterson PA: Ligand-dependent regulation of intracellular protein transport: effect of vitamin a on the secretion of the retinol-binding protein. *The Journal of Cell Biology* 1983; **96**:907-10.
5. Navab M, Smith J, Goodman D: Rat plasma prealbumin: metabolic studies on effects of vitamin A status and on tissue distribution. *Journal of Biological Chemistry* 1977; **252**:5107-14.
6. Ingenbleek Y, Young V: Transthyretin (Prealbumin) in Health and Disease: Nutritional Implications. *Annual Review of Nutrition* 1994; **14**:495-533.
7. Monaco HL: The transthyretin-retinol-binding protein complex. *Biochimica et biophysica acta* 2000; **1482**:65-72.
8. Fex G, Albertsson P-Å, Hansson B: Interaction between Prealbumin and Retinol-Binding Protein Studied by Affinity Chromatography, Gel Filtration and Two-Phase Partition. *European Journal of Biochemistry* 1979; **99**:353-60.
9. Goodman D. The Retinoids : Biology, Chemistry and Medicine. 2nd ed. ed. New York: Raven Press; 1994.
10. Noy N: Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* 2000; **348**:481-95.
11. Noy N, Slosberg E, Scarlata S: Interactions of retinol with binding proteins: Studies with retinol-binding protein and with transthyretin. *Biochemistry* 1992; **31**:11118-24.
12. Naylor HM, Newcomer ME: The Structure of Human Retinol-Binding Protein (RBP) with Its Carrier Protein Transthyretin Reveals an Interaction with the Carboxy Terminus of RBP^{†,‡}. *Biochemistry* 1999; **38**:2647-53.
13. Malpeli G, Folli C, Berni R: Retinoid binding to retinol-binding protein and the interference with the interaction with transthyretin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1996; **1294**:48-54.
14. Zanotti G, Berni R, Monaco HL: Crystal structure of liganded and unliganded forms of bovine plasma retinol-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 1993; **268**:10728-38.
15. Ong S-E, Mann M: Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature Chemical Biology* 2005; **1**:252-62.
16. Anderson NL, Anderson NG, Pearson TW, et al.: A Human Proteome Detection and Quantitation Project. *Molecular & Cellular Proteomics* 2009; **8**:883-6.

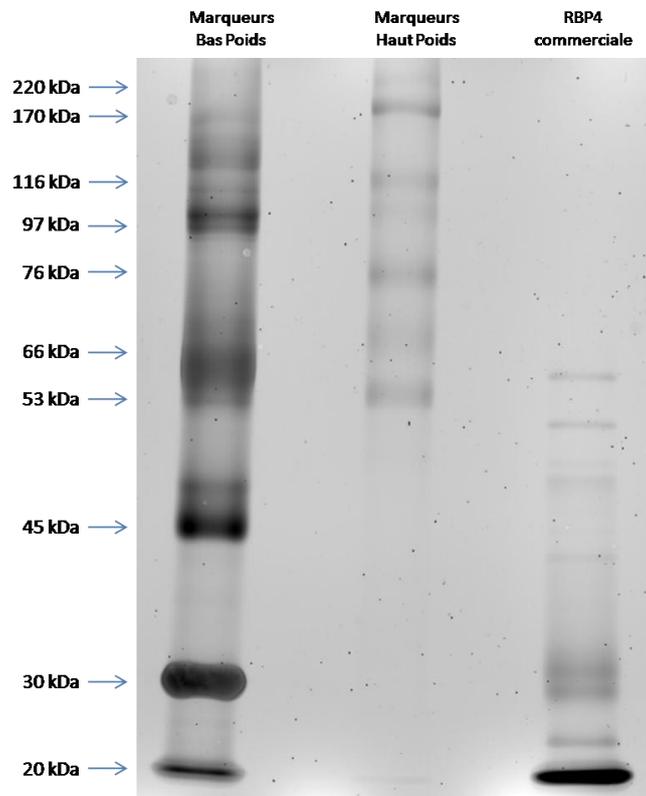
17. Pan S, Aebersold R, Chen R, et al.: Mass Spectrometry Based Targeted Protein Quantification: Methods and Applications. *Journal of Proteome Research* 2008; **8**:787-97.
18. Pratt JM, Simpson DM, Doherty MK, Rivers J, Gaskell SJ, Beynon RJ: Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes. *Nat Protoc* 2006; **1**:1029-43.
19. Whiteaker JR, Zhao L, Anderson L, Paulovich AG: An Automated and Multiplexed Method for High Throughput Peptide Immunoaffinity Enrichment and Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry-based Quantification of Protein Biomarkers. *Molecular & Cellular Proteomics* 2010; **9**:184-96.
20. Brun V, Masselon C, Garin J, Dupuis A: Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics. *J Proteomics* 2009; **72**:740-9.
21. Latterich M, Abramovitz M, Leyland-Jones B: Proteomics: New technologies and clinical applications. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2008; **44**:2737-41.
22. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B: Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007; **389**:1017-31.
23. Iliuk A, Galan J, Tao W: Playing tag with quantitative proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009; **393**:503-13.
24. Viswanathan C, Bansal S, Booth B, et al.: Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays. *Pharmaceutical Research* 2007; **24**:1962-73.
25. Mallick P, Schirle M, Chen SS, et al.: Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat Biotech* 2007; **25**:125-31.
26. Zhang G, Neubert TA: Automated Comparative Proteomics Based on Multiplex Tandem Mass Spectrometry and Stable Isotope Labeling. *Molecular & Cellular Proteomics* 2006; **5**:401-11.
27. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R: Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 2008; **4**.
28. Brun V, Dupuis A, Adrait A, et al.: Isotope-labeled Protein Standards. *Molecular & Cellular Proteomics* 2007; **6**:2139-49.
29. Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW, Gygi SP: Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; **100**:6940-5.
30. Beynon RJ, Doherty MK, Pratt JM, Gaskell SJ: Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nature Methods* 2005; **2**:587-9.
31. Barr J, Maggio V, Patterson D, Jr, et al.: Isotope dilution--mass spectrometric quantification of specific proteins: model application with apolipoprotein A-I. *Clin Chem* 1996; **42**:1676-82.
32. Stemmann O, Zou H, Gerber SA, Gygi SP, Kirschner MW: Dual Inhibition of Sister Chromatid Separation at Metaphase. *Cell* 2001; **107**:715-26.
33. Anderson NL, Anderson NG, Haines LR, Hardie DB, Olafson RW, Pearson TW: Mass Spectrometric Quantitation of Peptides and Proteins Using Stable Isotope Standards and

- Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). *Journal of Proteome Research* 2004; **3**:235-44.
34. Rivers J, Simpson DM, Robertson DHL, Gaskell SJ, Beynon RJ: Absolute Multiplexed Quantitative Analysis of Protein Expression during Muscle Development Using QconCAT. *Molecular & Cellular Proteomics* 2007; **6**:1416-27.
35. Kuhn E, Wu J, Karl J, Liao H, Zolg W, Guild B: Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ¹³C-labeled peptide standards. *Proteomics* 2004; **4**:1175-86.
36. Schiess R, Wollscheid B, Aebersold R: Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Molecular oncology* 2009; **3**:33-44.
37. Carr SA, Anderson L: Protein Quantitation through Targeted Mass Spectrometry: The Way Out of Biomarker Purgatory? *Clin Chem* 2008; **54**:1749-52.
38. Giorgianni F, Cappiello A, Beranova-Giorgianni S, Palma P, Trufelli H, Desiderio DM: LC-MS/MS Analysis of Peptides with Methanol as Organic Modifier: Improved Limits of Detection. *Analytical Chemistry* 2004; **76**:7028-38.
39. Gilar M, Belenky A, Wang BH: High-throughput biopolymer desalting by solid-phase extraction prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A* 2001; **921**:3-13.
40. Kyte J, Doolittle RF: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 1982; **157**:105-32.
41. Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K: The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1999; **13**:1175-85.
42. Silva JC, Gorenstein MV, Li G-Z, Vissers JPC, Geromanos SJ: Absolute Quantification of Proteins by LCMSE. *Molecular & Cellular Proteomics* 2006; **5**:144-56.
43. Kirkpatrick D, Gerber S, Gygi S: The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods* 2005; **35**:265-73.
44. Smith RD, Shen Y, Tang K: Ultrasensitive and Quantitative Analyses from Combined Separations-Mass Spectrometry for the Characterization of Proteomes. *Accounts of Chemical Research* 2004; **37**:269-78.
45. Peterson PA: Characteristics of a Vitamin A-transporting Protein Complex Occurring in Human Serum. *Journal of Biological Chemistry* 1971; **246**:34-43.
46. Kanai M, Raz A, Goodman DS: Retinol-binding protein; the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 1968; **47**:2025-44.
47. Haupt H, Heide K: Isolierung und Kristallisation des Retinol-bindenden Proteins aus Humanserum. *Annals of Hematology* 1972; **24**:94-101.
48. McGuire BW, Chytil F: Three-step purification of retinol-binding protein from rat serum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 1980; **621**:324-31.
49. Fex G, Hansson B: Purification of retinol-binding protein from serum and urine by affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 1978; **537**:358-65.

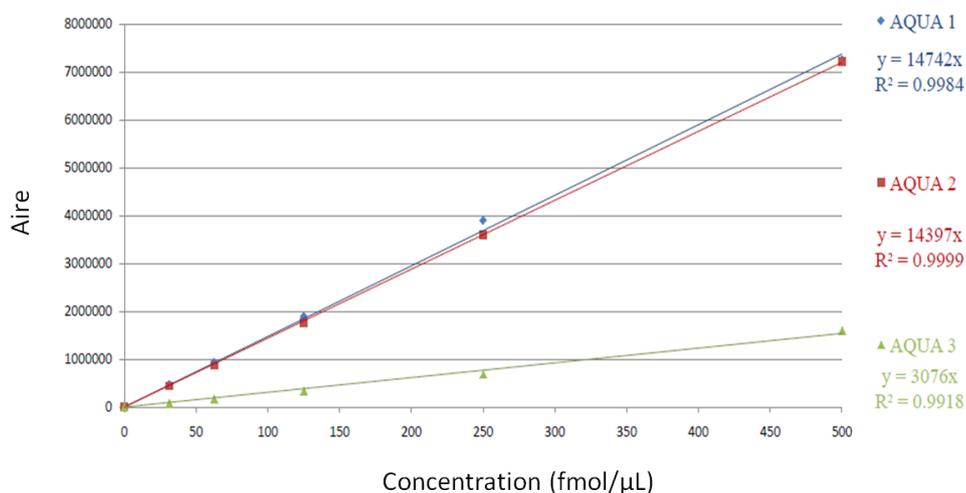
50. Vahlquist A, Nilsson SF, Peterson PA: Isolation of the Human Retinol Binding Protein by Affinity Chromatography. *European Journal of Biochemistry* 1971; **20**:160-8.
51. Berni R, Ottonello S, Monaco HL: Purification of human plasma retinol-binding protein by hydrophobic interaction chromatography. *Anal Biochem* 1985; **150**:273-7.
52. Colon W, Kelly JW: Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry* 1992; **31**:8654-60.
53. Birkenmeier G, Tschechonien B, Kopperschläger G: Affinity chromatography and affinity partition of human serum pre-albumin using immobilized remazol yellow GGL: Evidence that albumin increases binding of pre-albumin to the dye. *FEBS Letters* 1984; **174**:162-6.
54. Regnault V, Rivat C, Vallar L, Geschier C, stoltz JF: Purification of biologically active human plasma transthyretin by dye-affinity chromatography: studies on dye leakage and possibility of heat treatment for virus inactivation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1992; **584**:93-9.
55. Raghu P, Ravinder P, Sivakumar B: A new method for purification of human plasma retinol-binding protein and transthyretin. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2003; **38**:19-24.
56. Harper RG, Workman SR, Schuetzner S, Timperman AT, Sutton JN: Low-molecular-weight human serum proteome using ultrafiltration, isoelectric focusing, and mass spectrometry. *Electrophoresis* 2004; **25**:1299-306.
57. Greening DW, Simpson RJ: A centrifugal ultrafiltration strategy for isolating the low-molecular weight (≤ 25 K) component of human plasma proteome. *J Proteomics* 2010; **73**:637-48.
58. Georgiou HM, Rice GE, Baker MS: Proteomic analysis of human plasma: Failure of centrifugal ultrafiltration to remove albumin and other high molecular weight proteins. *Proteomics* 2001; **1**:1503-6.
59. Mody N, Graham Timothy E, Tsuji Y, Yang Q, Kahn Barbara B: Decreased clearance of serum retinol-binding protein and elevated levels of transthyretin in insulin-resistant ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; **294**:E785-93.
60. Jiang L, He L, Fountoulakis M: Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A* 2004; **1023**:317-20.

Annexes

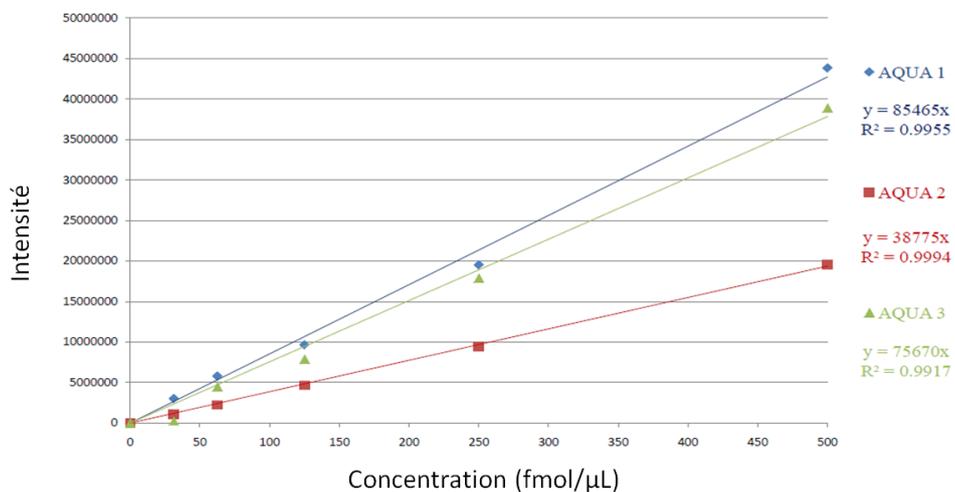
Annexe 4.1 : gel 1D SDS-PAGE de la RBP4 commerciale



Annexe 4.2 : courbe d'étalonnage f(concentrationAQUA)= aire sous le pic EIC de chaque AQUA.



Annexe 4.3 : courbe d'étalonnage f(concentrationAQUA)= intensité du singal MS de chaque AQUA.



Chapitre 4

Annexe 4.4 : Données LC-MS relatives à un digest de plasma déplété pour la quantification absolue de la RBP4 totale à partir de l'aire du EIC de chaque peptide (contenant 50 µmol/mol AQUA).

		Masse du précurseur (m/z)	Temps de rétention (minute)	Aire du pic du EIC (unité d'aire)
Peptide 1	Natif 1	581,2828	44,7	93250
	AQUA 1	585,2758	44,7	750698
Peptide 2	Natif 2	599,8262	83,3	88456
	AQUA 2	603,8328	83,3	702814
Peptide 3	Natif 3	583,2983	26,2	18250
	AQUA 3	587,3115	26,2	126190

Annexe 4.5 : Données LC-MS relatives d'un digest de plasma brut pour la quantification absolue de la RBP4 totale, à partir des intensités des signaux MS de chaque peptide (contenant 50 µmol/mol AQUA).

		Masse du précurseur (m/z)	Temps de rétention (minute)	Intensité du pic monoisotopique d l'ion précurseur (counts)
Peptide 1	Natif 1	581,2858	46,6	$6,26 \cdot 10^5$
	AQUA 1	585,2890	46,6	$4,83 \cdot 10^5$
Peptide 2	Natif 2	599,8256	78,5	$3,12 \cdot 10^5$
	AQUA 2	603,8319	78,5	$1,76 \cdot 10^5$
Peptide 3	Natif 3	583,3167	24,1	$5,89 \cdot 10^5$
	AQUA 3	587,3116	24,1	$3,8 \cdot 10^5$

Chapitre 5

Nouvelles matrices pour électrophorèse sur gel & Application à la séparation d'échantillon plasma

Sommaire

1. L'électrophorèse sur gel et l'analyse protéomique	280
1.1 Les supports pour l'électrophorèse.....	280
1.2 La 2DE : forces et limites de la technique.....	283
2. Optimisation de la matrice d'acrylamide traditionnelle.....	285
2.1 Contexte de l'étude.....	285
2.2 Optimisation de la formulation.....	286
2.2.1 Evaluation des différentes masses moléculaires de dextran.....	287
2.2.2 Evaluation des gels acrylamide/dextran.....	292
2.3 Compatibilité avec les techniques de coloration post-électrophorétiques.....	295
2.4 Application à la séparation d'un échantillon de plasma.....	296
3. Evaluation d'une nouvelle matrice pour l'analyse protéomique.....	298
3.1 Contexte de l'étude.....	298
3.2 Caractéristiques du N-acryloyl-tris(hydroxyméthyl) aminométhane (NAT).....	299
3.3 Evaluation des propriétés électrophorétiques.....	300
3.3.1 1D SDS-PAGE.....	300
3.3.2 Extraction protéine/peptide.....	303
3.4 2D SDS-PAGE.....	305
3.5 Applications.....	308
3.5.1 Etude de protéines minoritaires plasmatiques.....	308
3.5.2 Comparaison des profils électrophorétiques.....	311
4. Conclusion	312

Bibliographie - Annexes

Tables des figures

Figure 5.1 : Structure de l'agarose.....	281
Figure 5.2 : Structure du dextran.....	286
Figure 5.3 : Séparation 1D SDS-PAGE d'un mélange de marqueurs de masse moléculaire sur différentes matrices :	288
Figure 5.4 : Courbes de calibration $\text{Log}_{10}(\text{MW}) = f(R_f)$ pour évaluer l'influence de la masse moléculaire du dextran incorporé. La matrice de ces gels est composée de 10 % T, 2,6 % C, additionnée de 0,67 % de dextran, de masse moléculaire variable (entre 6000 à 2 000 000 g/mol).	289
Figure 5.5 : Etude turbidimétrique lors de la polymérisation de matrice additionnée de Dextran (0.67 % w/v), de masse moléculaire variable (détection : 300 nm)	290
Figure 5.6 : Courbes de calibration $\text{Log}_{10}(\text{MW}_{\text{prot}}) = f(R_f)$ pour évaluer l'influence de la proportion de dextran 500 000 sur le profil électrophorétique.....	291
Figure 5.7 : Etude turbidimétrique lors de la polymérisation de matrice additionnée de Dextran 500 000 pour évaluer l'influence de la proportion de polymère incorporée (détection : 300 nm)	292
Figure 5.8 : Profil électrophorétiques obtenus pour les différents %T à partir d'une formulation acrylamide/Bis/dextran 500 000 (0,33 % w/v). a = 5 % T ; b = 7,5 % T ; c = 10 % T, d = 12,5 % T.	293
Figure 5.9 : « Ferguson plots » $\text{log}_{10}(R_f) = (\% T)$ pour la comparaison de migration à différents %T, Comparaison avec la matrice commerciale Duracryl™.	293
Figure 5.10 : Comparaison des performances de la nouvelle formulation d'acrylamide avec la matrice Duracryl. a = profil électrophorétique obtenu à partir de la matrice Duracryl ; b = profil électrophorétique obtenu à partir de la matrice d'acrylamide traditionnelle additionnée de 0,33 % (w/v) de Dextran 500 000. c = comparaison des résolutions obtenues dans chaque cas.....	294
Figure 5.11 : Etude de compatibilité des méthodes de coloration post-électrophorétiques avec la nouvelle formulation acrylamide/Bis/Dextran 500 000 (0,33 % w/v) (a = coloration au Sypro Ruby, b= coloration au Bleu de Coomassie).	295
Figure 5.12 : Evolution de la densité optique sur des gels à base de dextran 500 000 et à base Duracryl™, après migration et coloration au bleu de Coomassie.....	296

Figure 5.13 : Gels 2D représentant la séparation d'un échantillon de plasma humain non-déplété sur un support à base d'acrylamide/bis/dextran 500 000 (0,33 %) (a), et à base de Duracryl™.....	297
Figure 5.14 : Structure chimique du NAT.....	299
Figure 5.15 : Séparation d'un mélange protéique (a), et le tracé de $\log_{10}(MW_{\text{prot}}) = f(R_f)$ correspondant.	301
Figure 5.16 : Evaluation de la focalisation et résolution des bandes pour chaque matrice (a) poly(NAT) [®] , (b) Dextran, (c) Duracryl.	302
Figure 5.17 : Etude de sensibilité pour chaque matrice (coloration au Ru(BPS) ₃).....	302
Figure 5.18 : Comparaison de la PMF de l'ovalbumine, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base de poly(NAT), de Dextran 500 000 et de Duracryl.	305
Figure 5.19 : Profil électrophorétique obtenu à partir d'un échantillon de plasma (gamme de pH : 4-7), obtenu à partir de la matrice poly(NAT) et coloration au Ru(BPS) ₃	306
Figure 5.20 : Comparaison de la résolution obtenue à partir des trois matrices évaluées (encadré vert : zone des hautes masses moléculaires ; encadré rouge : zone des basses masses moléculaires)	306
Figure 5.21 : Gel 2D obtenu à partir d'un échantillon de plasma déplété par immunochromatographie. Première dimension effectuée sur une gamme de pH comprise entre 4 et 7 (18 cm) ; deuxième dimension réalisée sur un gel à base de NAT à 12 % T.....	309
Figure 5.22 : Gamme dynamique des concentrations des protéines identifiées après 2DE et analyses nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS	311
Figure 5.23 : à gauche, le profil électrophorétique d'un échantillon de plasma non traité. A droite, le profil électrophorétique du même échantillon de plasma, après traitement au BM/UV-vis.....	312

Table des annexes

Annexe 5.1 : Principaux monomères synthétisés pour l'électrophorèse [2]..... 318

Annexe 5.2 : Evaluation de l'influence de la masse moléculaire de Dextran incorporé sur la séparation électrophorétique..... 319

Annexe 5.3 : Evaluation de l'influence de la proportion (% w/v) de Dextran 500 000 incorporée. Régression logarithmique $\text{Log}_{10}(\text{MW}_{\text{prot}}) = f(\text{Rf})$ 320

Annexe 5.4 : Représentation graphique de la distance parcourue en fonction du pourcentage % T 320

Annexe 5.5 : Travail sur l'équivalence de réticulation 321

Annexe 5.6 : Normalisation des DO 322

Annexe 5.7 : Comparaison de la PMF de l'alpha-1-antitrypsine, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base (a) de poly(NAT), (b) de Dextran 500 000 et de (c) Duracryl..... 323

Annexe 5.8 : Comparaison de la PMF de l'apolipoprotéine A-I, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base (a) de poly(NAT), (b) de Dextran 500 000 et de (c) Duracryl..... 324

Annexe 5.9 : Comparaison de la PMF de la sous-unité gamma du fibrinogène, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base (a) de poly(NAT), (b) de Dextran 500 000 et de (c) Duracryl..... 325

Annexe 5.10 : Comparaison de la PMF de l'haptoglobine, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base (a) de poly(NAT), (b) de Dextran 500 000 et de (c) Duracryl..... 326

Annexe 5.11 : Comparaison de la PMF de la sérotransferrine, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base (a) de poly(NAT), (b) de Dextran 500 000 et de (c) Duracryl..... 327

Annexe 5.12 : Comparaison de la PMF de l'albumine, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base (a) de poly(NAT), (b) de Dextran 500 000 et de (c) Duracryl..... 328

Annexe 5.13 : Plan de découpe du gel 2D obtenu à partir d'un échantillon de plasma déplété par immunochromatographie 329

Annexe 5.14 : Récapitulatif des protéines identifiées, après excision des spots et analyses nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS 330

Chapitre 5

Nouvelles matrices pour électrophorèse sur gel & application à la séparation d'échantillons plasmatiques

Il existe deux principales techniques pour la séparation des biomolécules : la chromatographie est le plus souvent utilisée pour des purifications préparatives alors que l'électrophorèse est particulièrement efficace pour l'analyse des biomolécules, du fait de son grand pouvoir résolutif.

L'électrophorèse sur gel occupe une importance considérable dans l'analyse protéomique, en particulier l'électrophorèse bidimensionnelle (2DE). La 2DE associée à la spectrométrie de masse (MS) est la figure de proue de l'analyse protéomique. Elle permet la séparation à haute résolution des protéines, de leurs variants géniques et de leurs formes modifiées. Elle convient parfaitement à l'étude d'échantillons biologiques complexes, tout en maintenant et en conservant un pouvoir résolutif élevé.

En s'intéressant plus en détails à la technique en elle-même, on se rend compte que des progrès considérables ont été accomplis pour l'étape de focalisation isoélectrique, avec l'apparition notamment des gradients de pH immobilisés [1]. En revanche, peu d'avancées

concernent la deuxième dimension alors qu'il s'agit d'une étape critique en termes de résolution de spots et d'extraction protéine/peptide pour leur identification par spectrométrie de masse. Aujourd'hui, alors que plusieurs centaines de supports existent pour la chromatographie, l'électrophorèse ne compte que trois types principaux de matrices : polyacrylamide, agarose et acétate de cellulose.

Quatre principaux critères doivent être respectés pour utiliser un support pour l'analyse protéomique: (i) le gel doit être compatible avec les méthodes de colorations post-électrophorétiques, (ii) le gel doit présenter des pores de petite taille pour accroître son pouvoir résolutif, (iii) le gel doit pouvoir conduire à une bonne extraction des protéines pour permettre une identification des protéines, après dégradation enzymatique in-situ, enfin (iv) le gel doit être peu turbide afin de minimiser le bruit de fond lié au gel lors de la détection des protéines. Il faut par ailleurs veiller à l'inertie chimique du support.

L'objectif dans ce chapitre est donc de proposer deux matrices innovantes pour la séparation par 2DE d'échantillons de plasma ; l'une qui incorpore un polymère préformé à une solution classique d'acrylamide/*N,N'*-méthylènebis(acrylamide) et l'autre qui utilise un monomère acrylique hydrophile. Afin de rendre compte des propriétés de séparation, l'évaluation de ces deux nouveaux supports repose sur la séparation de protéines de masses moléculaires connues, pour la séparation monodimensionnelle, et sur la séparation d'échantillon de plasma, pour la séparation bidimensionnelle. Des analyses MALDI-TOF complètent ces travaux afin d'évaluer les propriétés d'extraction protéine/peptide essentielles pour l'identification de protéines.

1. L'électrophorèse sur gel et l'analyse protéomique

1.1. Les supports pour l'électrophorèse

En 1997, Righetti a recensé les différents supports utilisés en électrophorèse sur gel [2]. Le premier support hydrophile a été proposé par Gordon en 1950 pour la séparation des protéines à partir de gels à base d'agar [3]. A la même période, l'électrophorèse sur gel d'amidon a été introduite par Smithies [4] permettant de découvrir le premier polymorphisme d'une protéine plasmatique, l'haptoglobine. En 1959, Raymond et Weintraub proposèrent la première matrice à base de polyacrylamide [5], qui fut ensuite largement optimisée par Davis et Hjerten (tampons, porosité etc.) offrant des possibilités de résolutions plus élevées [6-8].

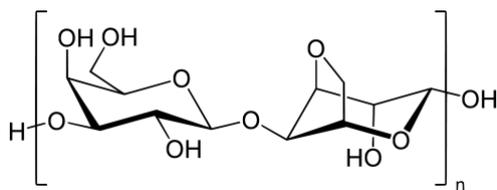


Figure 5.1 : Structure de l'agarose

L'agarose (figure 5.1) est principalement utilisé pour la séparation des fragments d'ADN, grâce à des fibres de rayon d'environ 20 à 30 nm permettant de générer des pores de taille > 200 nm [9]. A l'inverse, les gels de polyacrylamide présentent des pores plus petits allant de quelques nm à 15-20 nm, pour les solutions les plus diluées [10, 11], qui permettent la séparation électrophorétique des protéines.

Le réseau de polymères réticulés est responsable de l'effet de tamisage, qui est caractérisé par la taille des pores générés au cours de la polymérisation [12]. On définit T (exprimé en %) la concentration totale en monomères :

$$\%T = (a+b)*100/v$$

avec a masse d'acrylamide (en gramme), b masse de N,N'-méthylènebis(acrylamide) (en gramme) et v volume total de solution (en mL). De même, on appelle C (exprimé en %) la proportion d'agent réticulant :

$$\%C = b*100/a$$

La taille des pores est principalement liée à la quantité totale d'acrylamide utilisée par unité de volume ainsi que le degré de réticulation. La porosité diminue quand %T augmente. Jusqu'à la valeur limite $\%C = 5$ %, la porosité diminue quand %C augmente. Au delà de $\%C = 5$ %, le bisacrylamide polymérise lui même beaucoup, entraînant la formation de gels à porosité hétérogène.

Il existe plusieurs voies de polymérisation. La plus répandue est de loin la polymérisation radicalaire, qui utilise un initiateur, l'ammonium persulfate, et un propagateur, le N,N,N',N'-tétraméthyléthylène diamine. La polymérisation peut être aussi photochimiquement déclenchée en utilisant de la riboflavine ou encore du bleu de méthylène. Dans le cas de la riboflavine, Les radicaux libres générés en présence d'oxygène et d'UV visibles, sont à l'origine de l'initiation de la polymérisation. Le bleu de méthylène est associé à un système « redox » (le toluène sulfonate de sodium en tant que réducteur et chlorure de

diphényliodonium en tant qu'oxydant) qui permet d'atteindre des taux de conversion de polymères importants, et peut être utilisé sur une large gamme de pH (3-10) [13].

Au cours des années 1980 et 1990, un effort de recherche s'est porté sur le développement de gels de polyacrylamide poreux pour combler le fossé des gammes de séparations respectives des gels d'agarose et de polyacrylamide et pour améliorer les propriétés physico-chimiques des gels. De nouveaux monomères ont été proposés et synthétisés (Annexe 5.1). La majorité de ces avancées s'applique à la séparation d'ADN.

Dès 1984, on trouve la trace de gels obtenus à partir de la polymérisation d'acrylylmorpholine, monomère acrylique, avec du bis-acryloyl piperazine, comme agent réticulant. L'avantage de ces gels est leur caractère amphiphile qui permet une utilisation en présence de solvants polaires. L'année suivante, une matrice composée d'un dérivé N-substitués d'acrylamide extrêmement hydrophile, le Trisacryl (N-acryloyl-2-amino-2-hydromethyl-1,3 propane diol) a été proposée [14]. Cette matrice a ensuite été largement développée et optimisée par Kozulic pour la séparation d'ADN [15-18].

En 1989, des dérivés d'acrylamide N-mono et di-substitués ont été proposés comme support pour l'électrophorèse [19, 20] ; le monomère le plus utilisé pour leur formulation fut le N,N'-diméthylacrylamide co-polymérisé en présence de méthacrylate d'hydroxyéthyle. La particularité de cette matrice est son caractère amphiphile qui permet au gel de se réhydrater en présence de solvants organiques polaires. En revanche, on note un fort caractère hydrophobe qui limite l'utilisation de ces gels à l'électrophorèse d'ADN.

En 1994 sont apparus les monomères de type N-aminoacrylamide, comme le N-acryloyl, et leurs dérivés D-xylitols correspondants [18]. Ces monomères acryliques, porteurs de résidus monosaccharides, génèrent des polymères hydrophiles et très structurés. En effet, ce type de polymères possède un squelette au caractère hydrophobe (chaînes carbonées de type alcane), mais les motifs saccharides latéraux leur confèrent une surface hautement hydrophile, rendant leur utilisation possible pour la séparation de protéines. De plus, la masse moléculaire de tels monomères, largement supérieure à celle de l'acrylamide, permet l'obtention de gels de plus grande porosité.

L'acrylamide est globalement stable au cours de l'électrophorèse, vis-à-vis du pH du tampon électrolyte. De même, les monomères hydroxylés (trisacryl, acryloylamido-sucres) sont facilement hydrolysables en conditions basiques. Righetti proposa un nouveau monomère, le N-acryloylaminoethoxyéthanol (AAEE), qui réunit deux propriétés importantes : une grande hydrophilie et une forte stabilité dans les conditions alcalines [21].

Cependant, ce monomère a tendance à s'auto-polymériser. Ainsi, en 1996, le N-acryloylaminopropanol permet de s'affranchir de cet inconvénient tout en conservant les propriétés du AAEE [22].

Très récemment, une étude s'est intéressée aux monomères d'acrylamide N-alkylés ou N,N'-dialkylés afin d'augmenter l'hydrophobicité des gels de polyacrylamide. En effet, il apparaît que le monomère N,N'-diméthylacrylamide renforce les interactions hydrophobes entre le gel et les protéines membranaires et permet une très bonne séparation des protéines membranaires [23].

La notion d'extraction protéine/peptide est également essentielle pour l'identification des protéines par MS, après excision et digestion de la bande ou du spot d'intérêt. En 1996, Schevkenko a proposé le premier protocole de digestion en gel [24]: la digestion in-situ est une digestion hétérophasique qui est contrôlée par la diffusion de l'enzyme dans la matrice de polyacrylamide [25]. Idéalement, un gel doit pouvoir proposer des pores petits au cours de l'électrophorèse pour obtenir une séparation efficace, puis qui s'élargissent afin de faciliter la pénétration des protéases et l'expulsion de peptides. En 2010, Bornemann a proposé une formulation de gel en utilisant un agent réticulant supplémentaire, l'éthylglycol diacrylate, qui permet aux interconnexions de fibres d'acrylamide de s'hydrolyser en condition alcaline [26]. Cela a pour but de faciliter l'étape de digestion et de conduire à de meilleures identifications de protéines par MS.

1.2. La 2DE : forces et limites de la technique

L'analyse protéomique doit faire face à de nombreuses contraintes, imposées le plus souvent par des échantillons complexes dont le plasma est l'un des meilleurs exemples [27]. Contrairement à l'analyse de l'ADN, aucune amplification d'expression n'est possible sur les protéines et l'utilisation d'outils analytiques sensibles, comme la spectrométrie de masse (MS), est nécessaire pour parvenir à l'identification des protéines d'intérêt dans un échantillon complexe. Toutefois, la caractérisation par MS dépend fortement des techniques de séparation utilisées en amont qui doivent être aussi résolutes que possible.

La complexité des échantillons impose le recours à des séparations bidimensionnelles qui seront d'autant plus résolutes qu'elles utiliseront des techniques différentes, c'est-à-dire qu'elles concernent des paramètres physico-chimiques des protéines bien distincts. La 2DE repose ainsi sur les principes de la focalisation électrique (IEF) et sur l'électrophorèse de zone. L'IEF concerne un seul paramètre des protéines : leur point isoélectrique (pH pour lequel la protéine possède une charge nette neutre). Quant à l'électrophorèse sur zone, elle

prend en compte deux caractéristiques des protéines : leur taille et leur charge globale. Cependant, en se plaçant dans des conditions SDS-PAGE, la migration des protéines ne s'effectue que selon leur masse. Cette dernière technique d'électrophorèse est robuste et s'interface aisément avec la MS, c'est pourquoi elle est systématiquement utilisée pour la deuxième dimension de séparation. Le terme « 2DE » fait dans la majorité des cas référence à l'association de l'IEF (1^{ère} dimension) et la SDS-PAGE (2^{ème} dimension).

La technique 2DE est une technique robuste, facile à paralléliser et reproductible. Elle offre ainsi la possibilité d'étudier l'impact des conditions expérimentales sur des échantillons, à l'instar des traitements d'inactivation de pathogènes sur les protéines plasmatiques. La reproductibilité permet une confiance dans les résultats. Par ailleurs, cette technique donne direct accès aux protéines impactées par simple comparaison des profils électrophorétiques obtenus, qui peuvent être ensuite identifiées par MS. Au cours de la migration, les protéines sont concentrées ce qui simplifie l'analyse par MS et conduit à une identification protéique univoque grâce à des recouvrements de séquence élevés puisque le mélange peptidique analysé est largement simplifié.

Selon le gradient de pH et la réticulation en termes de taille des pores, la 2DE peut séparer plus de 5000 protéines simultanément et environ 2000 en routine, et peut détecter moins d'un ng de protéines par spot. Les gels 2DE fournissent une cartographie des protéines contenues dans l'échantillon, sous leur forme intacte ; ils permettent de visualiser leur niveau d'expression (abondance relative), leur isoformes ainsi qu'à leurs certaines modifications post-traductionnelles éventuellement présentes. La masse moléculaire et le pI sont directement accessibles à partir de l'image du gel, contrairement aux méthodes LC-MS/MS qui s'appuient sur l'analyse des peptides où ces deux informations sont perdues ; de plus, ces dernières nécessitent par ailleurs l'utilisation de marquage isotopique pour la quantification de protéines. De fait, il apparaît possible de mettre en avant une migration anormale d'une protéine qui peut être due à des modifications post-traductionnelles (phosphorylations, glycolysations, déamidations etc.) ou à une protéolyse partielle (protéine tronquée), et ainsi développer une stratégie analytique plus spécifique pour les mettre en évidence.

L'une des principales limites de cette technique de séparation est cependant liée à la dynamique d'expression des protéines dans l'échantillon étudié. En effet, on a montré que la concentration des protéines présentes dans le plasma s'étend sur une gamme dynamique de plus de 10 ordres de grandeurs [27]. Cette gamme d'expression extrêmement étendue rend illusoire la visualisation et la caractérisation des protéines minoritaires. De plus, les méthodes

de coloration offrent au mieux une gamme dynamique de détection de quatre ordres de grandeurs pour les plus efficaces. Ainsi, des méthodologies de fractionnement préliminaires (déplétion, purification) doivent être intégrées dans la démarche analytique protéomique dans le but de restreindre la gamme d'expression. Toutefois, cela ne solutionne pas le problème des protéines très faiblement exprimées.

De plus, certaines classes de protéines comme les protéines membranaires sont absentes des images de gels 2D. En effet, ce type de protéines présente une solubilité limitée. Lors de l'IEF, les protéines ont une forte tendance à précipiter à l'approche de leur pI, qui se caractérise par un minimum de solubilité, et échappent à la deuxième dimension de la séparation car elles ne sont pas re-solubilisées.

2. Optimisation de la matrice d'acrylamide traditionnelle

2.1. Contexte de l'étude

Les gels de polyacrylamide, issus de la polymérisation des monomères d'acrylamide et de N,N'-méthylène-bis-acrylamide (Bis), sont utilisés pour la séparation des protéines. En effet, ils offrent une large gamme de porosité s'échelonnant de quelques nanomètres jusqu'à 15-20 nm dans les formulations les plus diluées. Toutefois, les gels de polyacrylamide possèdent de faibles propriétés mécaniques, ce qui limite la taille des gels utilisée. En effet, la résolution des gels 2D est directement liée à la surface de gel selon le carré des dimensions : en doublant chaque dimension, la résolution est augmentée d'un facteur 4.

Plusieurs approches ont été envisagées pour contourner ce problème. L'une d'elles consiste à additionner un polymère préformé dans la matrice d'acrylamide/Bis. Cela favorise la production de chaînes latérales liées par des liaisons « hydrogène » conduisant à des gels de polyacrylamide possédant des porosités plus élevées ou avec des meilleures propriétés mécaniques. Par exemple, la solution commerciale Duracryl™, dont la formulation intègre un polymère linéaire (polyacrylamide non réticulé), est devenue un support très utilisé en analyse protéomique grâce à ses propriétés mécaniques renforcées. Toutefois, cette matrice possède plusieurs inconvénients. Ce support est turbide au cours et après la polymérisation ; ce qui induit un bruit de fond non-négligeable après coloration des gels, notamment par fluorescence. Par ailleurs, des problèmes de distorsion de bandes/spot ainsi que des artefacts ont été rencontrés avec ces supports. Schulenberg a proposé une nouvelle formulation, Rhinohide, mais sans en préciser la composition [28]. Enfin, la présence du polymère additionné semble troubler l'analyse par MS perturbant l'identification des protéines après

digestion. Pour ces raisons, cette solution commerciale est de moins en moins utilisée mais fait toujours figure de référence.

Nous proposons ici une nouvelle formulation qui intègre un polymère préformé à une matrice pour gel de polyacrylamide classique (acrylamide/Bis), le dextran (figure 5.2), pour la séparation de protéines. Il s'agit d'un polymère de glucose exopolysaccharide, composé de liaisons glycosidiques de type α_{1-6} . Ce polymère est largement utilisé dans les phases stationnaires de chromatographie d'exclusion stérique depuis de nombreuses années [29, 30], et dans les gels d'électrophorèse capillaire [31, 32].

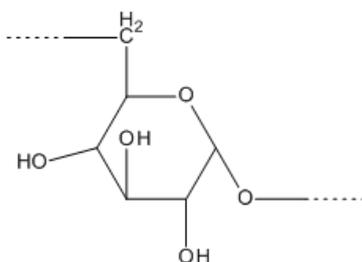


Figure 5.2 : Structure du dextran

Pour évaluer les propriétés de cette nouvelle formulation, nous avons cherché à évaluer les différentes compositions en dextran (masse moléculaire et pourcentage) permettant des séparations optimales. Nous avons ensuite poursuivi notre étude par une comparaison avec la matrice commerciale Duracryl™ pour évaluer ses performances en termes de résolution, de propriétés mécaniques et de compatibilité avec les techniques de coloration post-électrophorétique. Enfin, nous avons appliqué cette matrice innovante à la séparation d'échantillons de plasma par électrophorèse bidimensionnelle.

2.2. Optimisation de la formulation

Le polymère de dextran a été incorporé à une composition traditionnelle de gel composée de monomères d'acrylamide et Bis. Cette première partie repose sur l'optimisation de la formulation de cette matrice à partir de séparation électrophorétique monodimensionnelle en conditions SDS-PAGE. Elle s'appuie sur l'évaluation des quantités optimales de dextran à incorporer ainsi que sur la masse moléculaire du dextran à utiliser. Ce dernier s'étend sur une gamme comprise entre 6 000 à 2 000 000 g/mol.

De façon générale, l'évaluation des paramètres testés se base sur la séparation de protéines de masses moléculaires connues, dont les principales caractéristiques sont présentées dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Composition et masses moléculaires des marqueurs de masse moléculaire utilisés

	Protéines	Masse Moléculaire (kDa)	Quantité (µg)
LMW	Phosphorylase b	97	67
	Albumine	66	83
	Ovalbumine	45	147
	Anhydrase carbonique	30	83
	Inhibiteur de trypsine	20	80
	α-lactalbumine	14,4	116
HMW	Myosine	220	25
	α-2-macroglobuline	170	100
	β-galactosidase	116	16
	Transferrine	76	17
	Glutamate déshydrogénase	53	18

2.2.1. Evaluation des différentes masses moléculaires de dextran

L'incorporation de dextran à une solution traditionnelle pour la préparation de gel ne perturbe pas la polymérisation du gel. La migration des protéines est homogène pour chaque type de matrice, comme le montre la figure 5.3 : on compare ainsi un gel classique SDS-PAGE (a) et deux autres contenant 0,67% (w/v) de dextran à 100 000 g/mol, (b) et 500 000 g/mol (c).

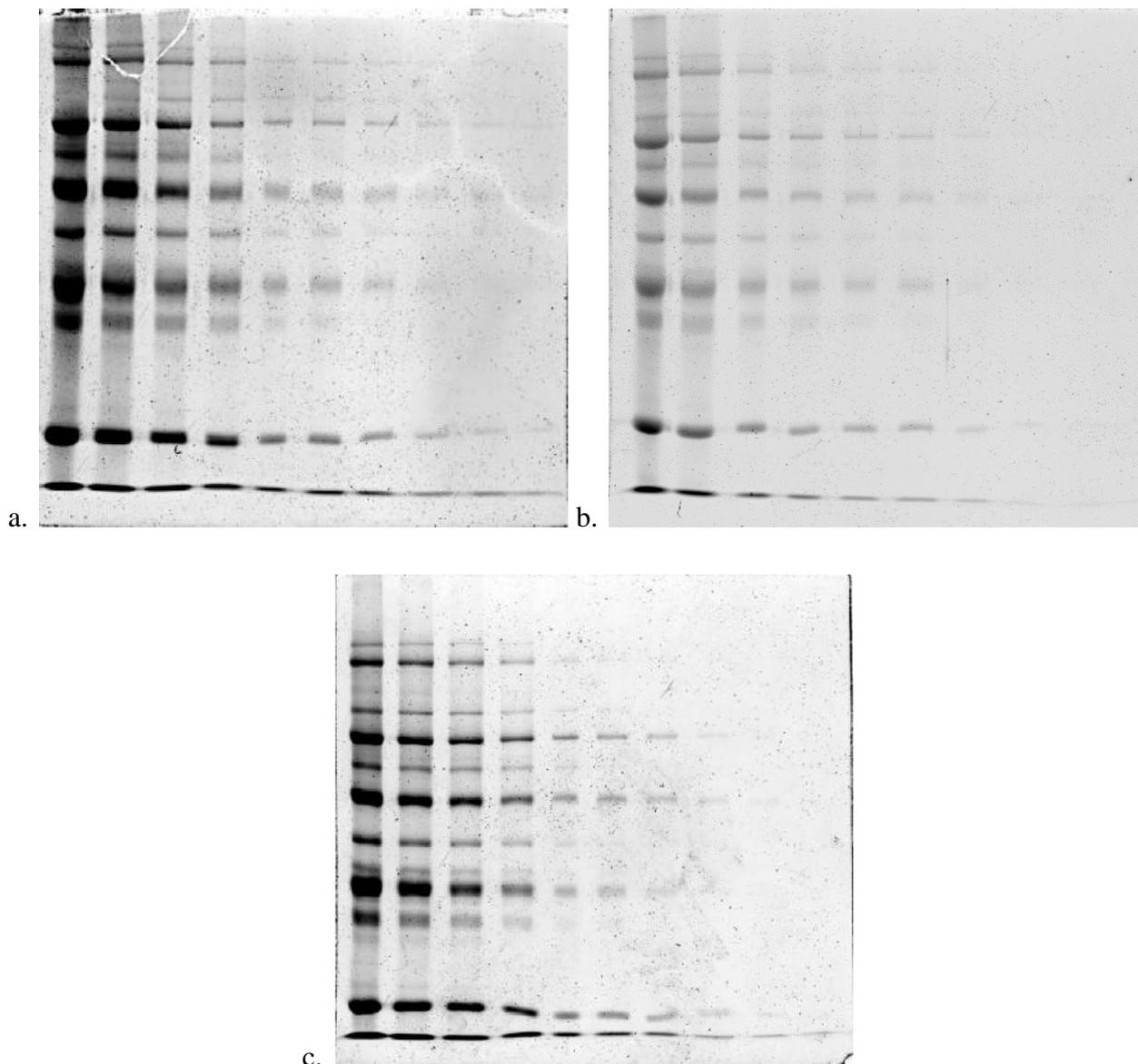


Figure 5.3 : Séparation 1D SDS-PAGE d'un mélange de marqueurs de masse moléculaire sur différentes matrices :

- a = matrice standard acrylamide/Bis ;
- b = acrylamide/Bis additionnée de 0,67 % de Dextran 100 000 ;
- c = acrylamide/Bis additionnée de 0,67 % de Dextran 500 000

Les courbes de calibration ont été établies pour chaque matrice à partir de la mobilité relative (R_f) de chaque protéine. Le R_f d'une protéine est déterminé par la relation suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la protéine}}{\text{Distance parcourue par le front de migration}}$$

La figure 5.4 présente les courbes de calibration obtenues pour chaque gel. Par souci de visibilité seulement 4 courbes y sont présentées. En conditions SDS-PAGE, le déplacement électrophorétique des protéines obéit à la loi qui vérifie $\log_{10}(MW_{\text{prot}}) = f(R_f)$ [27, 33-35]. Le comportement logarithmique est respecté pour chaque gel (le détail des calculs et des données expérimentales figurent dans l'annexe 5.2). Les pentes des courbes présentent des valeurs très

proches à l'exception de celle issue de la séparation réalisée sur la matrice sans dextran. Cette différence de migration se traduit par une valeur -0,3220 pour la matrice acrylamide/Bis contre -0,3684 et -0,4478 correspondant respectivement aux dextrans 500 000 et 2 000 000. Par ailleurs, on constate que toutes les courbes sont, en effet, décalées vers la droite. On en conclue donc que la mobilité des protéines est plus faible en l'absence de dextran, notamment en ce qui concerne la migration des protéines de haute masse moléculaire.

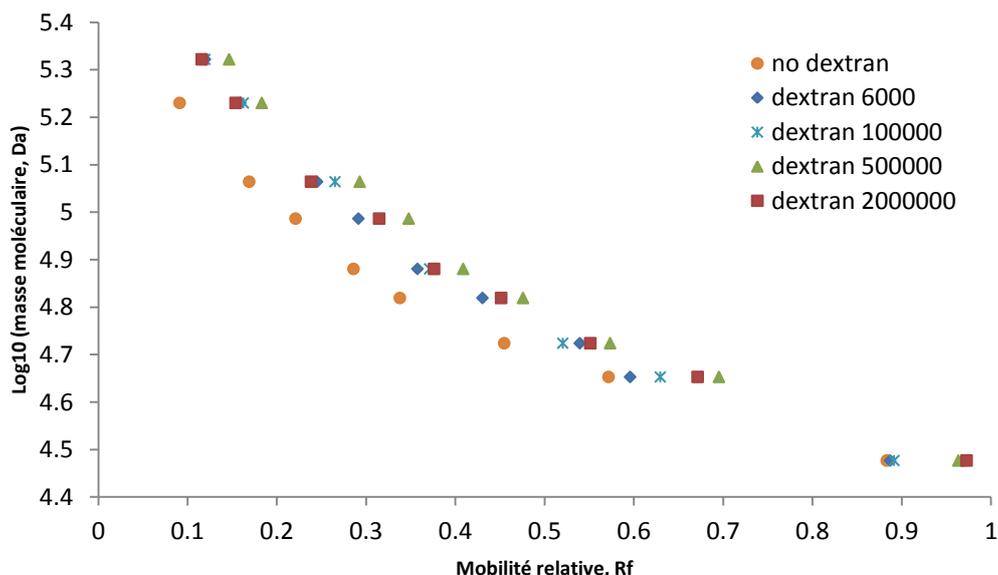


Figure 5.4 : Courbes de calibration $\text{Log}_{10}(\text{MW}) = f(R_f)$ pour évaluer l'influence de la masse moléculaire du dextran incorporé. La matrice de ces gels est composée de 10 % T, 2,6 % C, additionnée de 0,67 % de dextran, de masse moléculaire variable (entre 6000 à 2 000 000 g/mol).

Pour la proportion de 0,67 %, le dextran 2 000 000 est préféré pour ses propriétés mécaniques. En effet, on a pu constater que la fragilité du gel diminuait, et était donc plus facilement manipulable. Toutefois, on a pu constater qu'en augmentant la masse moléculaire du dextran, la turbidimétrie du gel augmentait. Pour réaliser ces mesures turbidimétriques, 1 mL de la solution classique de gel à 10 % T a été mis en présence de 0,05 % TEMED et 0,5 % APS (30 % w/v). L'évolution de l'absorbance a été suivie au cours de la polymérisation pendant 15 min, en utilisant une détection UV à 300 nm. La figure 5.5 illustre cette évolution pour différentes masses moléculaires de dextran utilisées. Par exemple, la solution de matrice ne contenant pas de dextran présente une valeur de 0,29 unité d'absorbance, alors que cette valeur est multipliée par 6 avec 0,67 % de dextran 2 000 000. Par conséquent, les dextrans de masse moléculaire entre 200 000 et 500 000 g/mol doivent préférentiellement être choisis dans la mesure où ils combinent une migration linéaire des protéines, une bonne résistance mécanique, et enfin des propriétés optiques intéressantes.

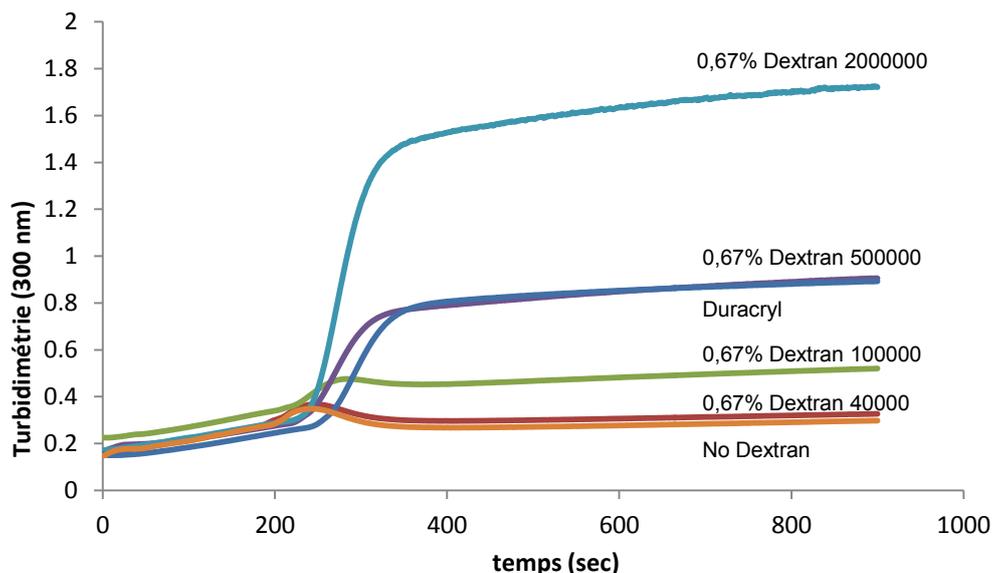


Figure 5.5 : Etude turbidimétrique lors de la polymérisation de matrice additionnée de Dextran (0.67 % w/v), de masse moléculaire variable (détection : 300 nm)

Nous avons décidé de nous intéresser plus en détails au dextran 500 000 dans la suite de notre étude. Nous avons, ainsi, testé différentes proportions de ce polymère, entre 0 et 1,65 % (w/v) afin de suivre l'évolution de la séparation protéique et de la turbidimétrie. La figure 5.6 représente les courbes de calibration de $\log_{10}(MW) = f(R_f)$ pour les différentes proportions de dextran 500 000. Là encore, les comportements logarithmiques de migration sont respectés (Annexe 5.3). On constate, par ailleurs, qu'une augmentation de la quantité de dextran influe sur le profil électrophorétique des gels. Même si la migration des protéines demeure homogène, on observe des distances de migration accrues pour les protéines de hautes masses moléculaires, tandis que celles de plus faibles masses moléculaires sont plus courtes. Les valeurs de pente augmentent avec la proportion de dextran incorporée : elles oscillent entre -0,3320 (sans dextran) et -0,5584 (avec 1,67 % w/v de dextran). Ces observations sont en accord avec les travaux de Righetti qui décrivent l'élargissement des pores lors de l'incorporation de polymères préformés dans la solution de matrice [2].

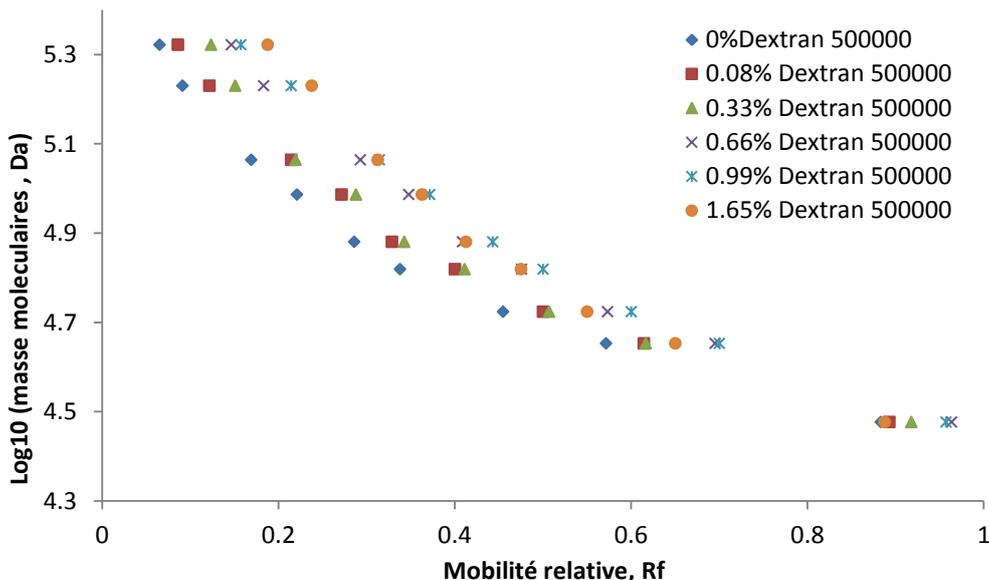


Figure 5.6 : Courbes de calibration $\text{Log}_{10}(\text{MW}_{\text{prot}}) = f(\text{Rf})$ pour évaluer l'influence de la proportion de dextran 500 000 sur le profil électrophorétique.

La turbidimétrie de ces gels a été également étudiée. Cette dernière est accrue avec l'augmentation de la proportion de dextran, comme le montre la figure 5.7. Ainsi les quantités de dextran optimales pour allier de bonnes propriétés optiques et mécaniques se trouvent dans une gamme de 0,33 à 0,66 % (w/v). Il est important de souligner que les gels à base de Duracryl™ possèdent une absorbance proche de celle du gel composé de 0,66 % de dextran 500 000. Par ailleurs, une quantité inférieure à 0,33 % conduit à des gels fragiles qui se déchirent facilement. Par conséquent, la meilleure composition de gel qui allie à la fois une migration homogène, une bonne résistance mécanique ainsi que des propriétés optimales satisfaisantes utilise 0,33 % w/v de dextran 500 000 ajouté à une solution classique d'acrylamide/Bis (10 % T, 2,6 % C).

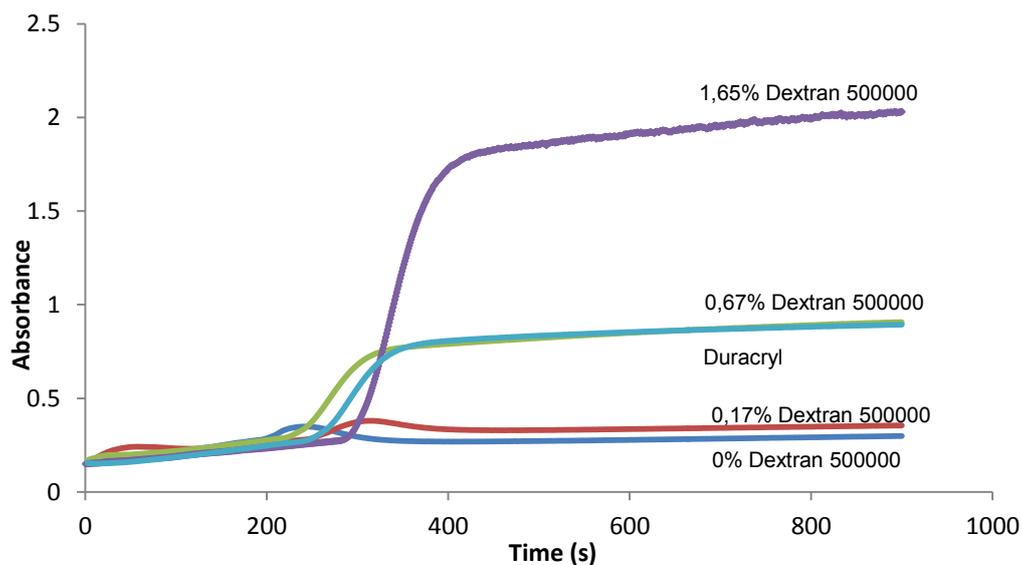


Figure 5.7 : Etude turbidimétrique lors de la polymérisation de matrice additionnée de Dextran 500 000 pour évaluer l'influence de la proportion de polymère incorporée (détection : 300 nm)

2.2.2. Evaluation des gels acrylamide/dextran

Afin d'approfondir la caractérisation de cette matrice acrylamide/bis/dextran, plusieurs proportions d'acrylamide ont été testées dans les conditions d'incorporation de dextran déterminées précédemment (500 000 g/mol à 0,33 % w/v) : 5 % T, 7,5 % T, 10 % T, 12,5 % T. On constate alors que l'addition de ce polymère préformé renforce les propriétés mécaniques même si le gel à 5 % T demeure fragile et délicat à manipuler.

A partir de la migration linéaire des protéines, illustrée par la figure 5.8, et à partir des règles de migration conventionnelle, on constate que la séparation des protéines de faibles masses moléculaires est favorisée par des %T élevés. De cette manière, les gels à 5% T permettent une séparation satisfaisante de protéines dont la masse moléculaire est comprise entre 66 kDa et 200 kDa. Les gels à 7,5 % T sont adaptés pour une gamme de 45 kDa et 200 kDa ; les gels à 10 % T permettent des séparations à partir de 30 kDa ainsi que les gels à 12,5 % T apparaissent adaptés pour la séparation de protéines de plus basse masse moléculaire (14 kDa).

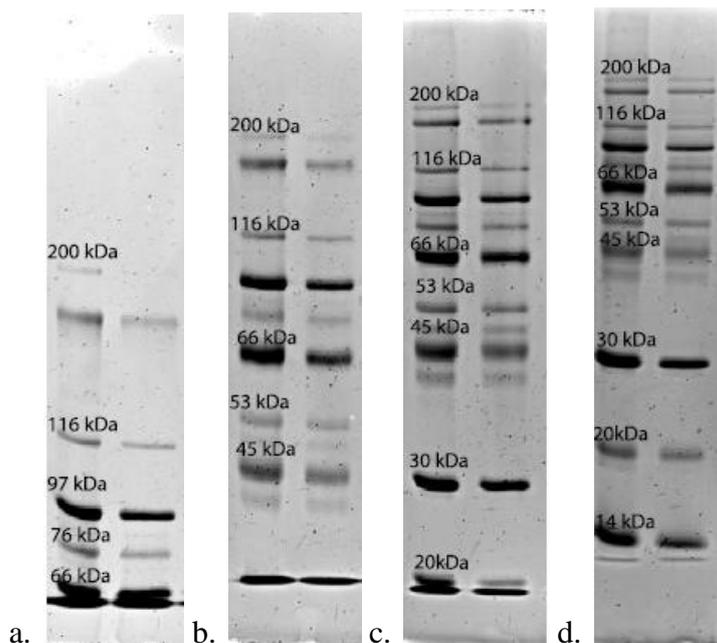


Figure 5.8 : Profil électrophorétiques obtenus pour les différents %T à partir d’une formulation acrylamide/Bis/dextran 500 000 (0,33 % w/v). a = 5 % T ; b = 7,5 % T ; c = 10 % T, d = 12,5 % T.

Ces observations sont également confirmées par le tracé de la distance parcourue de six protéines, dont les masses moléculaires se répartissent entre 66 et 200 kDa, en fonction du pourcentage T (Annexe 5.4). De plus, la figure 5.9 représente les « Ferguson plots » qui reprennent le $\log_{10}(R_f) = f(\%T)$; le comportement observé est caractéristique des gels de polyacrylamide cross-linkés en conditions SDS-PAGE [35, 36].

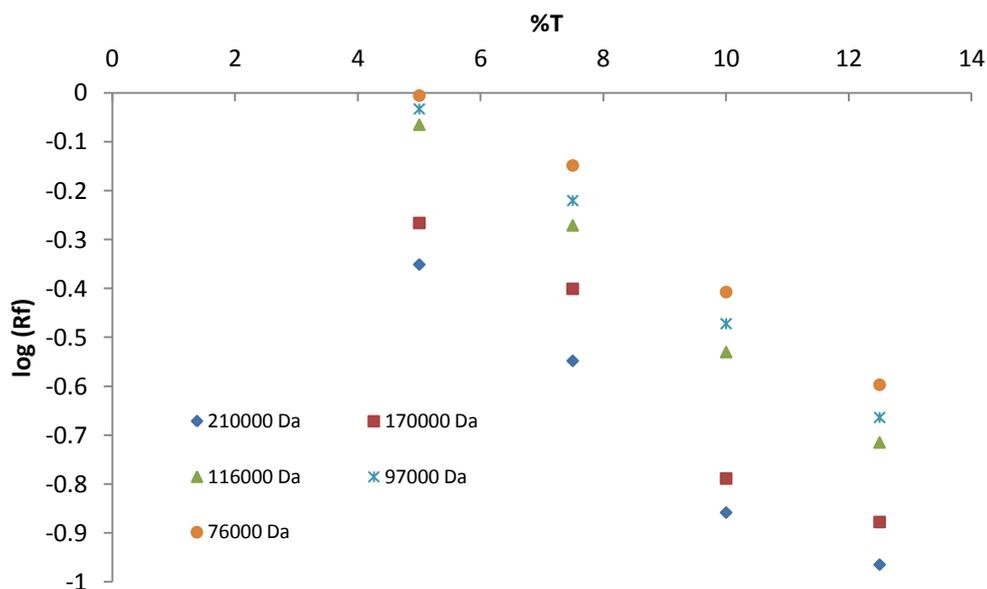


Figure 5.9 : « Ferguson plots » $\log_{10}(R_f) = f(\%T)$ pour la comparaison de migration à différents %T, Comparaison avec la matrice commerciale Duracryl™.

La résolution de la séparation des protéines a été également évaluée et comparée à celle obtenue sur des gels à base de Duracryl™. La comparaison est établie à partir de gels 10 %T et 2,6 %C. Pour ce faire, nous avons utilisé un logiciel développé au sein de notre laboratoire qui permet de générer des graphiques à partir de l'intensité du signal enregistré lors de la détection en fonction de la distance parcourue des protéines sur le gel. De plus, la résolution R se calcule selon la formule suivante :

$$R = 2 \frac{\Delta X}{W_1 + W_2}$$

avec W_1 et W_2 représentant les largeurs de deux bandes consécutives, et ΔX la distance qui sépare ces deux bandes.

Les figures 5.10a et 5.10b démontrent des propriétés de séparation supérieures des gels à base de Dextran par rapport à ceux qui utilisent le Duracryl™. De plus, on constate que cette nouvelle formulation permet d'augmenter significativement la résolution des bandes. On remarque une nouvelle fois des distorsions de bandes, dans les gels à base de Duracryl™. La figure 5.10.c appuie ces conclusions, car elle met en avant une résolution accrue des protéines de masses moléculaires élevées, avec l'incorporation de dextran. En effet, entre 76 kDa et 170 kDa, la résolution est au moins multipliée par 2. Ce nouveau système polyacrylamide/dextran présente aussi des performances de séparation supérieures à celle du Duracryl™, à la fois pour les basses et hautes masses moléculaires [37, 38].

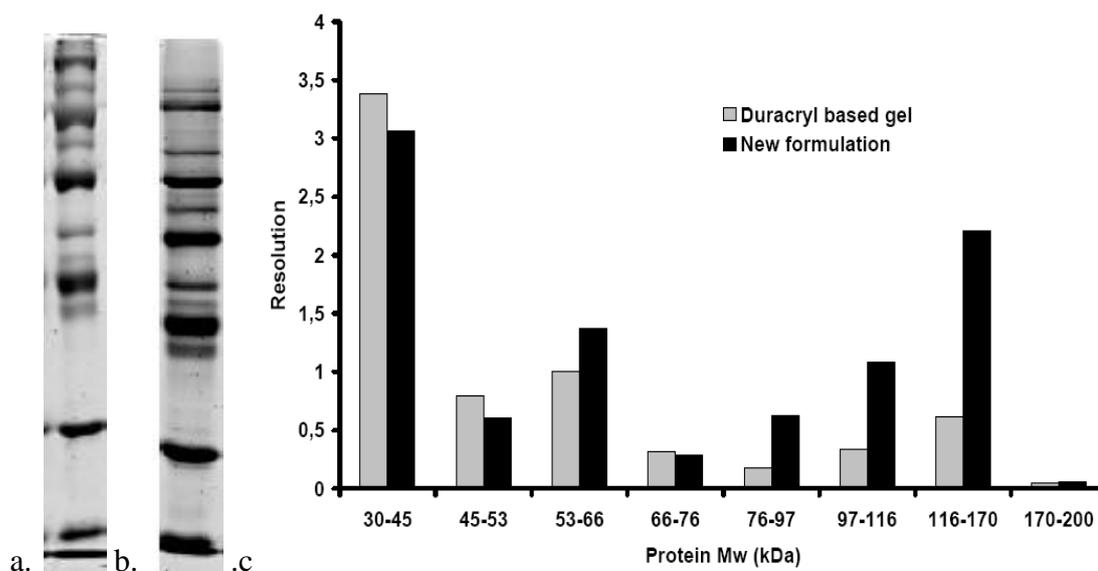


Figure 5.10 : Comparaison des performances de la nouvelle formulation d'acrylamide avec la matrice Duracryl. a = profil électrophorétique obtenu à partir de la matrice Duracryl ; b = profil électrophorétique obtenu à partir de la matrice d'acrylamide traditionnelle additionnée de 0,33 % (w/v) de Dextran 500 000. c = comparaison des résolutions obtenues dans chaque cas.

2.3. Compatibilité avec les techniques de coloration post-électrophorétiques

Un autre aspect important de cette étude a consisté à vérifier la compatibilité de cette nouvelle matrice à base de dextran 500 000 (0,33 % w/v) avec des colorants organiques et des colorants fluorescents (SyproRuby) (Figure 5.11a). De façon générale, aucune augmentation du bruit de fond n'a été constatée ; de plus, une bonne détection de protéines sur ces gels a été mise en avant, et ce malgré des dilutions successives du mélange de marqueurs de masse moléculaire. Les mêmes observations ont pu être établies à partir de colorations effectuées avec notre colorant fluorescent à base de $\text{Ru}(\text{BPS})_3$. Enfin, cette nouvelle formulation s'avère également compatible avec la coloration au Bleu de Coomassie (Figure 5.11b)

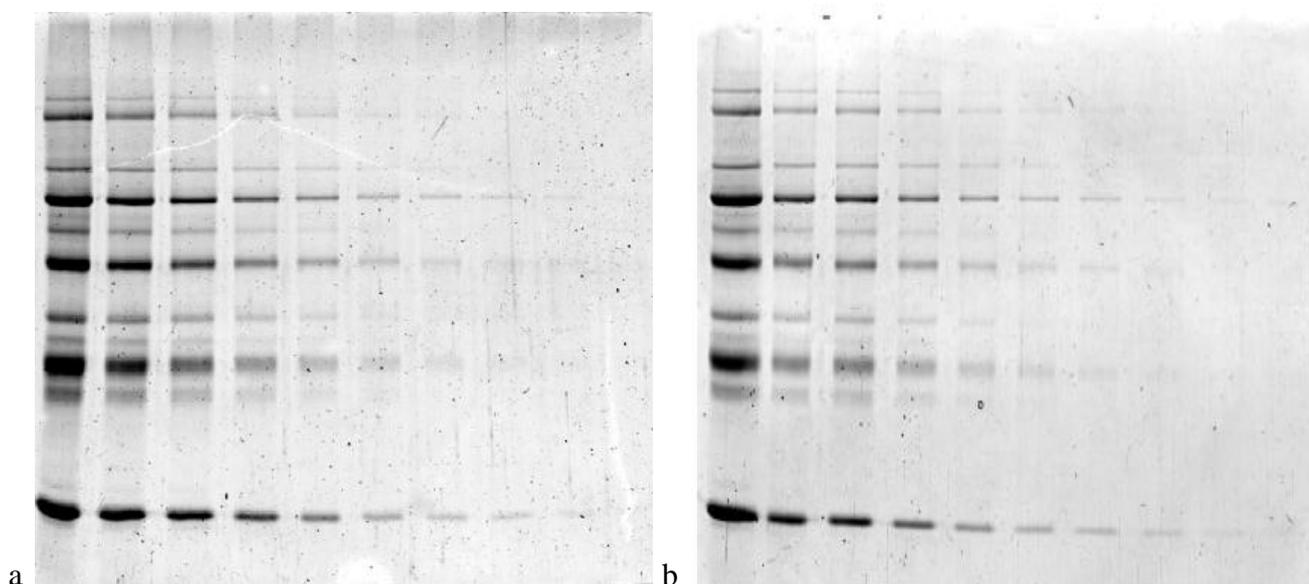


Figure 5.11 : Etude de compatibilité des méthodes de coloration post-électrophorétiques avec la nouvelle formulation acrylamide/Bis/Dextran 500 000 (0,33 % w/v) (a = coloration au Sypro Ruby, b= coloration au Bleu de Coomassie).

Dans ce cas, il est important de souligner qu'avec cette coloration, le bruit de fond du gel est considérablement diminué, si l'on compare avec une détection effectuée sur un gel à base de Duracryl™. En effet, dans la figure 5.12, on le mesure à 13 000 (unités arbitraires de densité optique) pour le gel à base de Duracryl™, tandis que le niveau de bruit de fond du gel à base de dextran n'est que de 10 000 unités. Par conséquent, avec ce nouveau type de support, il est possible d'augmenter le contraste de la détection pour une meilleure visualisation des bandes.

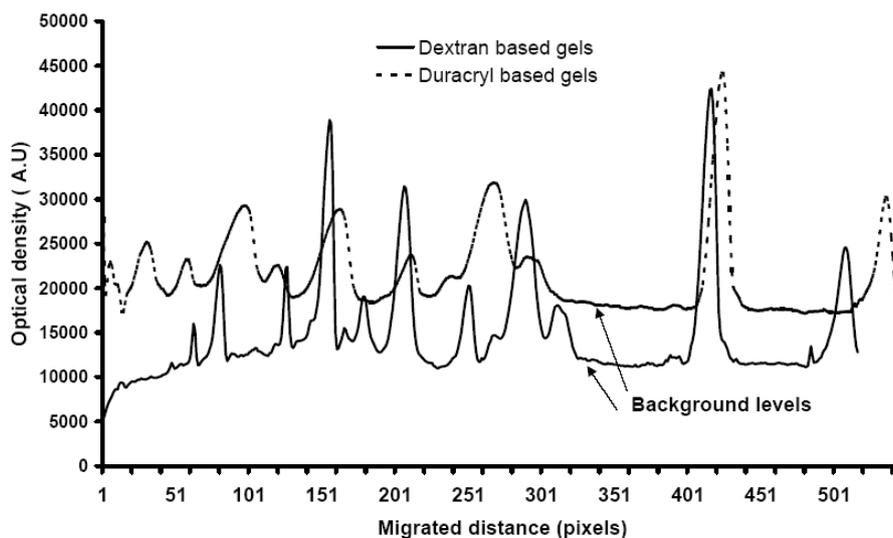


Figure 5.12 : Evolution de la densité optique sur des gels à base de dextran 500 000 et à base Duracryl™, après migration et coloration au bleu de Coomassie.

2.4. Application à la séparation d'un échantillon de plasma

Enfin, les performances des gels à base de dextran 500 000 (0,33 % w/v) ont été évaluées et comparées aux gels à base de Duracryl™ dans le cadre d'électrophorèse bidimensionnelle. La comparaison repose sur la séparation d'un échantillon de plasma humain non-déplété (350 µg total de protéines). La première dimension a été réalisée sur des strips commerciales IPG pH 4-7 (18 cm, GE Lifescience). Après migration, les strips ont été transférées en tête de gels à 10 %T, et la détection a été ensuite effectuée par fluorescence en utilisant notre colorant à base de Ru(BPS)₃.

La figure 5.13 représente les images des gels 2D. On constate que la résolution des spots protéiques dans le cas du gel à base de dextran 500 000 est plus élevée qu'avec la matrice Duracryl™. En effet, plusieurs spots présentent des traînées qui traduisent une faible immobilisation des protéines au sein du gel. Alors que la quantité totale de protéines déposée est identique dans les deux cas, plus de protéines sont détectées pour des mêmes conditions de détection. Ceci est un nouvel argument en faveur d'une immobilisation améliorée en présence de dextran, qui permet, par conséquent, une meilleure visualisation des protéines lors de la détection.

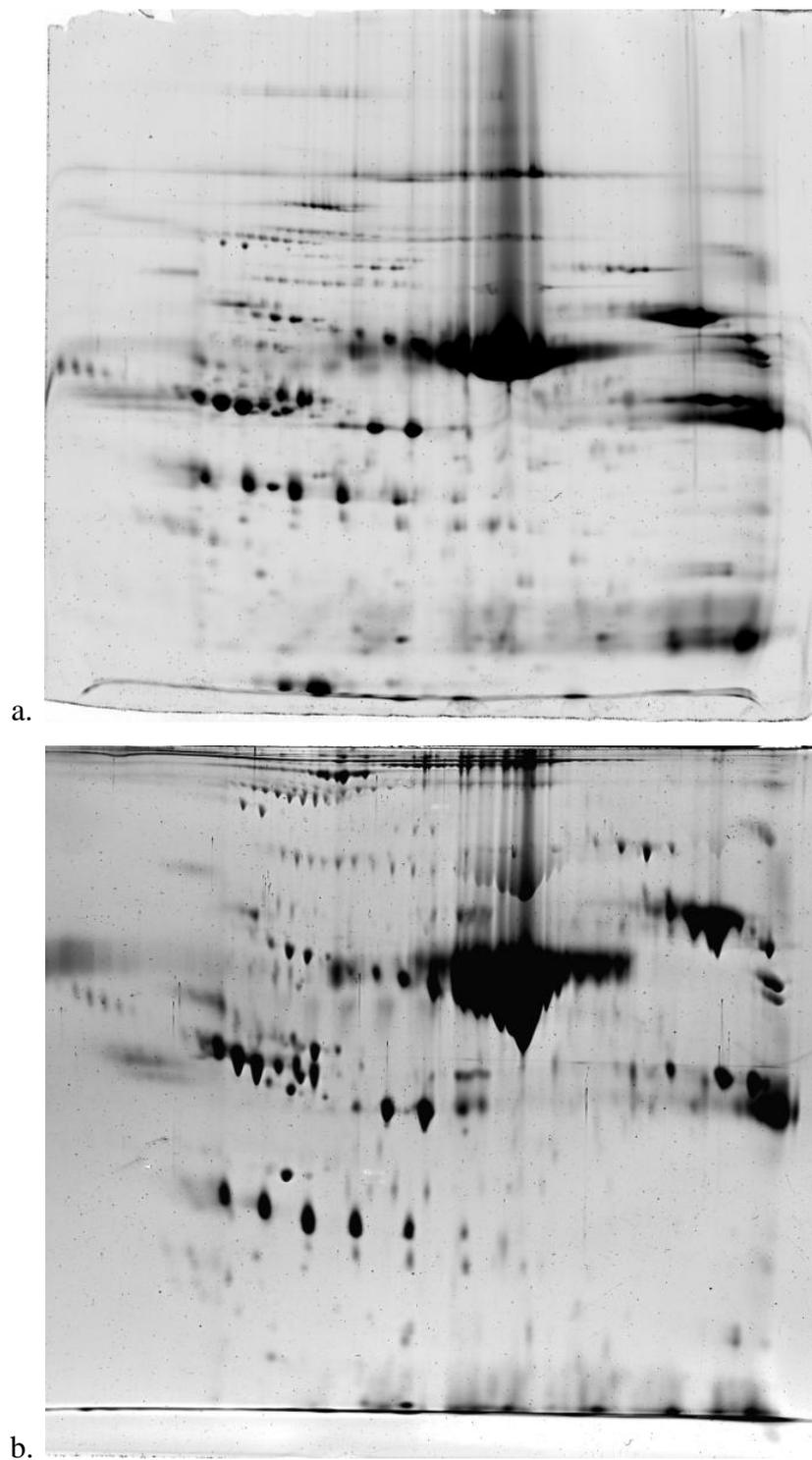


Figure 5.13 : Gels 2D représentant la séparation d'un échantillon de plasma humain non-déplété sur un support à base d'acrylamide/bis/dextran 500 000 (0,33 %) (a), et à base de Duracryl™.

3. Evaluation d'une nouvelle matrice pour l'analyse protéomique

3.1. Contexte de l'étude

De façon générale, les supports utilisés pour la séparation de protéines sur gel utilisent soit des polymères d'acrylamide ou d'agarose. Il s'agit dans les deux cas de polymères hydrophiles stables ne portant qu'un petit nombre de groupements chargés (agarose) voire aucune charge (polyacrylamide). Les gels d'agarose sont principalement utilisés pour séparer des grosses macromolécules comme des acides nucléiques pour la détermination de la taille de fragment d'ADN par exemple. En revanche, les gels de polyacrylamide conviennent pour définir la taille, la quantité, la pureté ou encore le point isoélectrique de polypeptides et de protéines. Les gels de polyacrylamide sont composés d'acrylamide réticulé (ou « cross-linké ») avec du N,N'-méthylène-bis-acrylamide (Bis). Leur gamme de séparation concerne des masses moléculaires comprises entre 2 kDa et 1 000 kDa, aussi bien dans les conditions d'électrophorèse dénaturantes que non-dénaturantes.

Toutefois, des molécules plus grandes ou des complexes multimoléculaires ne peuvent être correctement séparés avec des systèmes polyacrylamide/Bis. En effet, ce type de matrice conserve un effet de tamisage (« sieving-effect ») prononcé même à de faibles concentrations manipulables. Pour de tels composés, les gels d'agarose ne peuvent pas être utilisés non plus, malgré leur porosité élevée. Cela est dû à l'électroendo-osmose causée par les charges résiduelles au sein la matrice qui altère la résolution.

Plusieurs types de monomères (agents réticulants compris) ont pu être ainsi développés pour générer des gels macroporeux [2]. On peut citer par exemple une formulation comprenant de gel de polyacrylamide réticulé avec du bis-acryloyl-piperazine, à la place du Bis, qui propose des propriétés mécaniques renforcées ainsi que des pores légèrement plus gros. En effet, pour une concentration en monomères donnée, plus la masse moléculaire du monomère utilisé est grande, plus le gel obtenu est flexible et des pores de plus grandes tailles. Cependant, le caractère hydrophobe augmente généralement avec la masse moléculaire des monomères ce qui engendre soit une séparation de phase au cours de la polymérisation, soit une mauvaise séparation due à une hydrophobicité trop marquée.

C'est ainsi qu'ont ensuite été développés des monomères de haute masse moléculaires mais hydrophile. Kozuli a proposé un monomère acrylique hydrophile capable de générer des larges pores : le N-acryloyl-tris(hydroxylméthyl) aminométhane [16] (NAT, figure 5.14). Dérivé d'acrylamide, les gels composés de NAT « cross-linkés » avec du Bis ont été

initialement dédiés à l'électrophorèse sur gel d'ADN. Notre collaboration avec la société Elchrom Scientific nous a conduits à évaluer les propriétés de cette matrice pour l'adapter à la séparation des protéines.

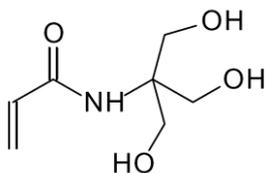


Figure 5.14 : Structure chimique du NAT

3.2. Caractéristiques du N-acryloyl-tris(hydroxyméthyl) aminométhane (NAT)

Les gels à base de poly(NAT) possèdent plusieurs avantages par rapport aux gels de polyacrylamide : une hydrophilie marquée et une porosité élevée. Ce monomère a été spécialement synthétisé en vue de son application pour la séparation des biomolécules, en particulier les fragments d'ADN.

Pour un pourcentage massique équivalent, la concentration molaire de NAT est plus faible qu'une solution de polyacrylamide, dans la mesure où la masse moléculaire du NAT est 2,5 fois plus élevée que l'acrylamide. Ainsi, il a été montré que ces gels étaient jusqu'à trois fois plus poreux que des gels d'acrylamide [15, 16].

Même si la porosité dépend de la taille du monomère utilisé, d'autres paramètres peuvent entrer en ligne de compte. S'il existe des interactions au cours de la polymérisation (i) entre les monomères, (ii) entre un monomère et un polymère naissant ou encore (iii) entre deux polymères naissants, il peut se former des agrégats, ce qui engendre des pores plus larges. En effet, l'origine de la grande porosité des gels d'agarose est expliquée par l'association des chaînes de polymères, au cours de la réticulation, qui est favorisée par des interactions « hydrogène ». Le monomère de NAT possède trois groupements hydroxyles, pour développer ce type d'interactions.

Le monomère de NAT est préparé à partir de chlorure d'acryloyle et de tris(hydroxyméthyl)aminométhane en présence de base forte (KOH) et d'inhibiteurs de polymérisation (NaNO_2 , K_2CO_3), à pH 8-9, dans un milieu bi-phasique (eau/dichlorométhane). Le monomère de NAT, récupéré dans la phase aqueuse, est ensuite isolé et purifié par IEX sur échangeur cationique (SCX) et anionique (WAX) [39].

3.3. Evaluation des propriétés électrophorétiques

La stratégie mise en place pour évaluer la matrice poly(NAT)[®] repose principalement sur la comparaison avec une solution commerciale de Duracryl[™] prête à l'emploi. Les propriétés électrophorétiques (sensibilité, résolution, extraction protéine/peptide) de cette matrice sont déterminées à partir des tests réalisés à partir de séparations (i) monodimensionnelles de marqueurs de masse moléculaire effectuées en conditions 1D SDS-PAGE et (ii) bidimensionnelles de plasma humain non-déplété pour la séparation par 2DE. Toutes les colorations des gels présentés dans cette nouvelle partie utilisent notre colorant à base de Ru(BPS)₃.

3.3.1. 1D SDS-PAGE

La première partie de l'évaluation de cette matrice repose sur la séparation électrophorétique d'un mélange commercial de protéines de masses moléculaires connues. Il s'agit du mélange de marqueurs protéiques présenté dans le tableau 5.1 ; sa gamme de masse s'étend entre 30 et 220 kDa. Tout d'abord, on sait qu'en conditions SDS-PAGE, le déplacement électrophorétique des protéines est inversement proportionnel au logarithme de leur masse moléculaire. On vérifie alors ce modèle en traçant $\log_{10}(MW_{\text{prot}})$ en fonction de la mobilité relative de chaque protéine. La figure 5.15 montre le profil électrophorétique du mélange protéique ; de plus on y vérifie le comportement logarithmique du déplacement des protéines sur ce gel avec un coefficient de corrélation de 0,9964.

Ainsi, il apparaît clairement que les hautes masses moléculaires sont mieux séparées avec la matrice à base de NAT car celles-ci parviennent à migrer à l'intérieur du gel de NAT. La séparation de plus basses masses moléculaires demeure équivalente pour toutes les matrices.

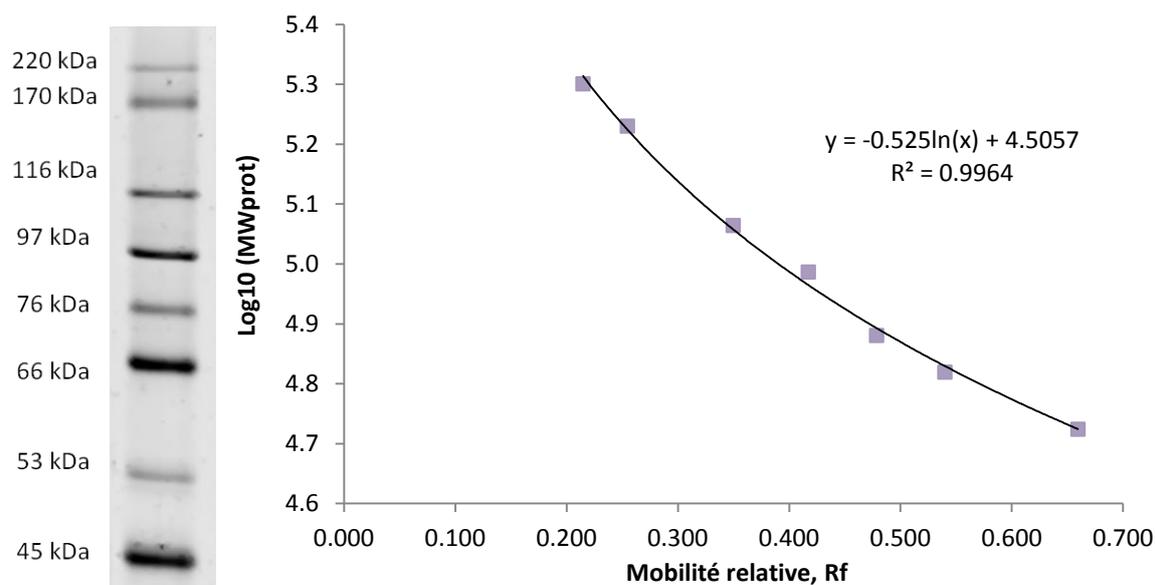


Figure 5.15 : Séparation d'un mélange protéique (a), et le tracé de $\log_{10}(MW_{\text{prot}}) = f(R_f)$ correspondant.

Dans un second temps, nous avons cherché à comparer les performances de plusieurs matrices à notre disposition : la matrice Duracryl et celle dont la formulation a été présentée dans la partie précédente, c'est-à-dire la matrice à base de dextran 500 000. Toutefois, il a fallu procéder en premier lieu à une recherche d'équivalence de réticulation afin d'obtenir des profils électrophorétiques similaires. En effet, la matrice poly(NAT)[®] est proposée sous la forme d'une poudre prête à l'emploi, qui après solubilisation (dans un tampon contenant 1,5 M de Tris à pH 8,8 pour le gel de séparation et dans un tampon contenant 1,5 M de Tris à pH 6.8 pour le gel de concentration), fixe la concentration totale (% T) des monomères à 12 %, selon les recommandations préconisées par Elchrom Scientific. Plusieurs pourcentages %T ont été testés pour les deux autres matrices. Ainsi, pour obtenir un profil électrophorétique équivalent, le pourcentage %T a été déterminé à 10 % et 8 % respectivement pour la solution à base de Dextran et pour la solution Duracryl[™] (Annexe 5.5). Il est, par ailleurs, nécessaire de noter que pour cette dernière, la réticulation a du être abaissée à 8 % afin de séparer correctement les standards de haute masse moléculaire.

La figure 5.16 montre les trois profils électrophorétiques (2 µg de protéines déposés) obtenus sur chacune des matrices. Tout d'abord, contrairement aux bandes observées sur le gel à base de Duracryl, les bandes dans les deux autres gels ne présentent pas de distorsions et mettent ainsi en avant une meilleure immobilisation des protéines. Plus en détails, en traçant l'évolution de la densité optique le long du gel à l'aide de notre logiciel, nous pouvons noter que les pics (correspondants à une protéine immobilisée dans le gel) sont plus fins et intenses dans le cas de la matrice à base de poly(NAT)[®].

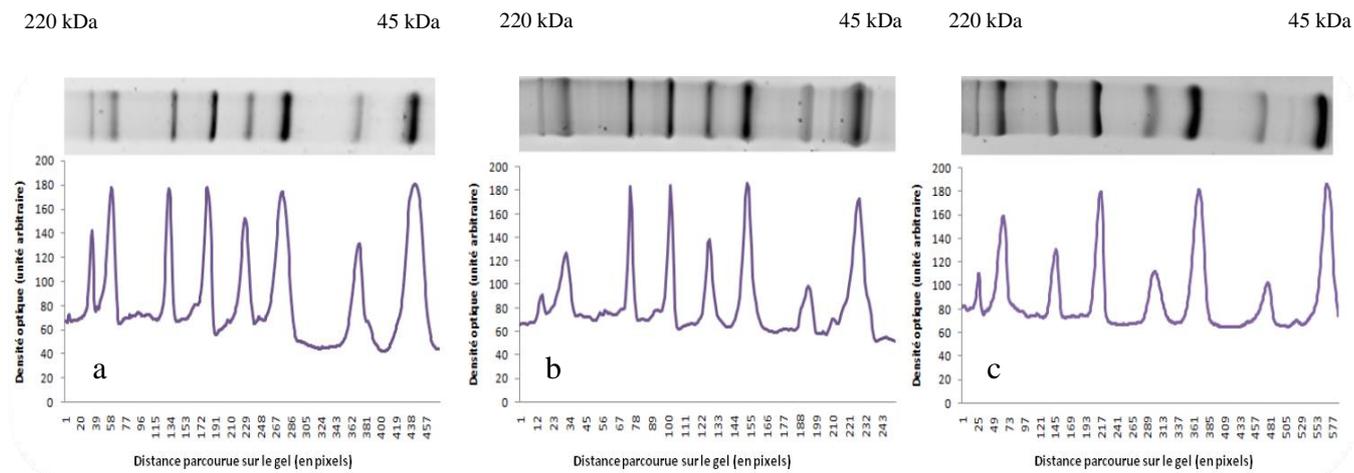


Figure 5.16 : Evaluation de la focalisation et résolution des bandes pour chaque matrice (a) poly(NAT)[®], (b) Dextran, (c) Duracryl.

Après normalisation de la DO de chaque bande (Annexe 5.6), on constate que les densités optiques les plus élevées sont observées pour la matrice poly(NAT)[®], à l'exception de deux de bandes qui sont plus intenses dans la matrice à base de Dextran 500 000.

Cette notion de focalisation permet d'expliquer une sensibilité accrue avec la matrice poly(NAT)[®]. En effet, à partir d'échantillons de standards protéiques préparés avec solution initiale contenant 2 µg de protéines, la quantité de protéines déposée dans chaque puits s'étend de 2 µg à 0,1 ng (dilutions au 1/3 successives). Il apparait ainsi possible de travailler avec un minimum de 8 ng de protéines déposés avec cette matrice. En revanche, la matrice Duracryl[™] apparait ici la moins sensible, avec un seuil de détection de 72 ng de protéines déposées (Figure 5.17). La matrice à base de dextran 500 000 présente une sensibilité intermédiaire, avec un seuil de détection de l'ordre de 24 ng de protéines déposés.

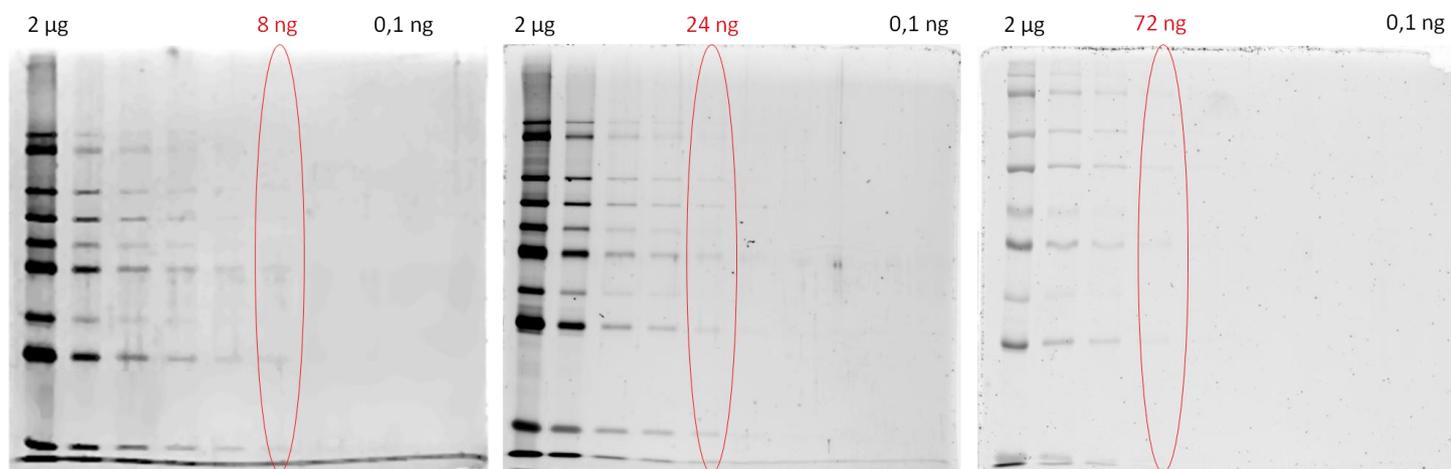
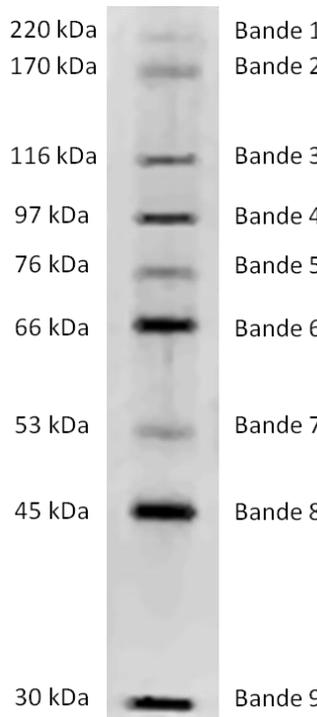


Figure 5.17 : Etude de sensibilité pour chaque matrice (coloration au Ru(BPS)₃).

Le tableau 5.2 récapitule la quantité (en ng) par protéine correspondant à la piste présentant la meilleure sensibilité pour chaque matrice. Ainsi, la quantité détectée la plus faible est de 0,53 pg pour le gel composé de poly(NAT)[®], pour la bande 3 à 116 kDa. Les seuils de détection de cette protéine sont de 1,57 pg et 4,68 pg respectivement pour la matrice à base de Dextran et celle à base de Duracryl.

Tableau 5.2 : Comparaison des quantités de protéines détectées pour les trois matrices évaluées, après coloration au Ru-(BPS)₃



Bande	Protéine	Quantité de protéine détectée (g)		
		Poly(NAT) [®]	Dextran 500 000	Duracryl [™]
1	Myosine	2,46E-09	2,46E-09	2,19E-08
2	Alpha2-Macroglobuline	9,84E-09	9,84E-09	9,84E-09
3	Béta-galactosidase	5,32E-10	1,57E-09	4,68E-09
4	Phosphorylase b	2,23E-09	6,59E-09	6,59E-09
5	Transferrine	1,67E-09	1,67E-09	1,49E-08
6	Albumine	8,83E-10	2,76E-09	8,17E-09
7	Glutamate déhydrogénase	1,77E-09	1,77E-09	1,58E-08
8	Ovalbumine	1,56E-09	4,89E-09	1,45E-08
9	Anhydrase Carbonique	8,83E-10	2,76E-09	7,28E-08

3.3.2. Extraction protéine/peptide

La notion d'extraction protéine/peptide est essentielle pour l'identification des protéines par MS, après excision et digestion de la bande ou du spot d'intérêt. Il est important de vérifier cette propriété dans notre étude, afin de valider son application à l'analyse protéomique. Ainsi, chaque bande protéique de chaque piste, a été excisée, lavée dans des bains contenant 50 mM bicarbonate d'ammonium pH 8,8/ACN (50/50 v/v), puis digérée en présence de trypsine. Les peptides recueillis ensuite ont été analysés ensuite par MALDI-TOF MS.

Ainsi, nous pouvons suivre l'évolution de l'identification selon le niveau de dilution, en se basant sur les résultats des interrogations de banques de données (recouvrement de séquence, nombre de peptides identifiés, score MASCOT). Le tableau 5.3 compare les résultats obtenus pour la bande 4 (phosphorylase b, 97 kDa) pour les matrices poly(NAT)[®] et Duracryl entre les pistes 1 (2 ng total) et 4 (0,25 ng total).

Tableau 5.3 : Evaluation de l'extraction protéine/peptide pour chaque matrice évaluée

Bande 4 Phosphorylase b	poly(NAT) [®]			Duracryl		
	recouvrement	peptides	score	recouvrement	peptides	score
piste 1 : 206 fmol / 20 ng	26	25	83	29	22	87
piste 2 : 68,8 fmol/6 ng	15	13	31	39	26	46
piste 3 : 2,3 fmol/2.22 ng	31	12	20	29	19	22
piste 4 : 7,6 fmol/0.74 ng	-	-	-	17	11	19

On constate ainsi qu'il est possible d'identifier une protéine, dont la quantité avoisine 7,6 fmol avec un gel à base de NAT alors qu'aucune identification n'est possible avec une matrice à base de Duracryl à cette quantité. Par ailleurs, on remarque que dans chaque cas, tous les paramètres considérés sont en faveur du poly(NAT)[®] : recouvrement de séquence, peptides et score.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés la qualité de spectre obtenus après excision et digestion des bandes protéines. La figure 5.18 illustre les spectres MS de la bande 8 (ovalbumine, 45 kDa) dans le cadre des trois matrices présentées jusqu'à maintenant : duracryl, dextran et NAT. La PMF de cette bande est globalement la même, toutefois on constate que l'intensité des pics est plus importante sur la PMF obtenue à partir de la bande excisée du gel à base de NAT que dans les deux autres matrices. La figure 5.18b met, par ailleurs, en avant un meilleur rapport signal/bruit en faveur du poly(NAT)[®].

Ces observations sont directement reliées à la capacité de focalisation accrue de ce type de gel. En effet, ces exemples permettent de démontrer une excellente extraction protéique/peptide au cours du traitement des bandes après digestion.

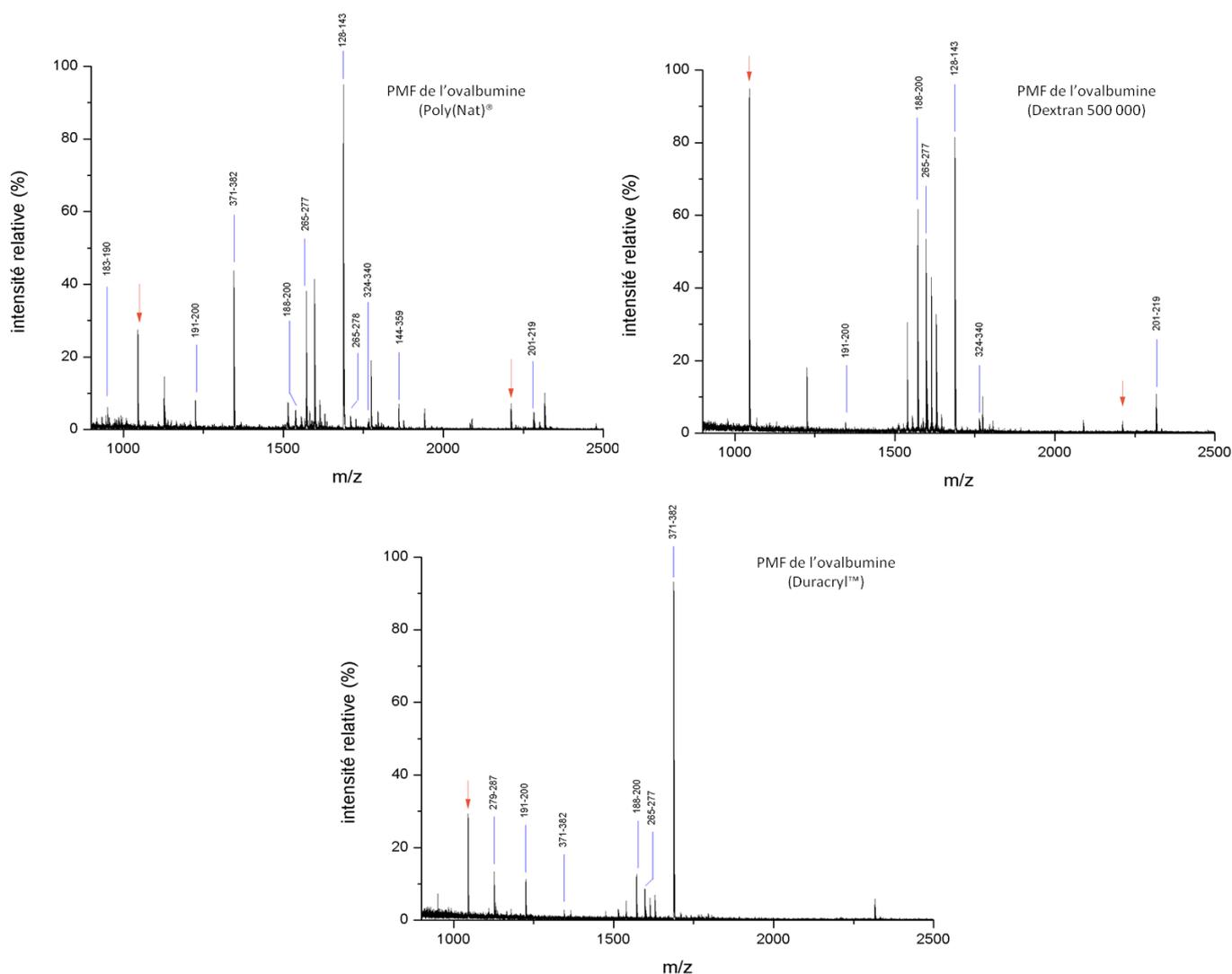


Figure 5.18 : Comparaison de la PMF de l'ovalbumine, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base de poly(NAT), de Dextran 500 000 et de Duracryl.

3.4. 2D SDS-PAGE

Nous avons précédemment démontré les performances de la matrice poly(NAT)[®], ce qui a permis de mettre en avant des capacités de résolution et de focalisation intéressantes. Afin de confirmer ces propriétés, nous avons appliqué cette matrice à la séparation bidimensionnelle d'un échantillon de plasma non-déplété (350 µg total de protéines déposés). Les conditions électrophorétiques sont identiques à celles décrites dans la *partie 1.3*, le gel obtenu est présenté dans la figure 5.19. De plus, dans la mesure où les migrations ont été effectuées en parallèle et à partir du même échantillon de plasma, ce dernier peut être comparé avec ceux présentés en figure 5.20 (a et b).

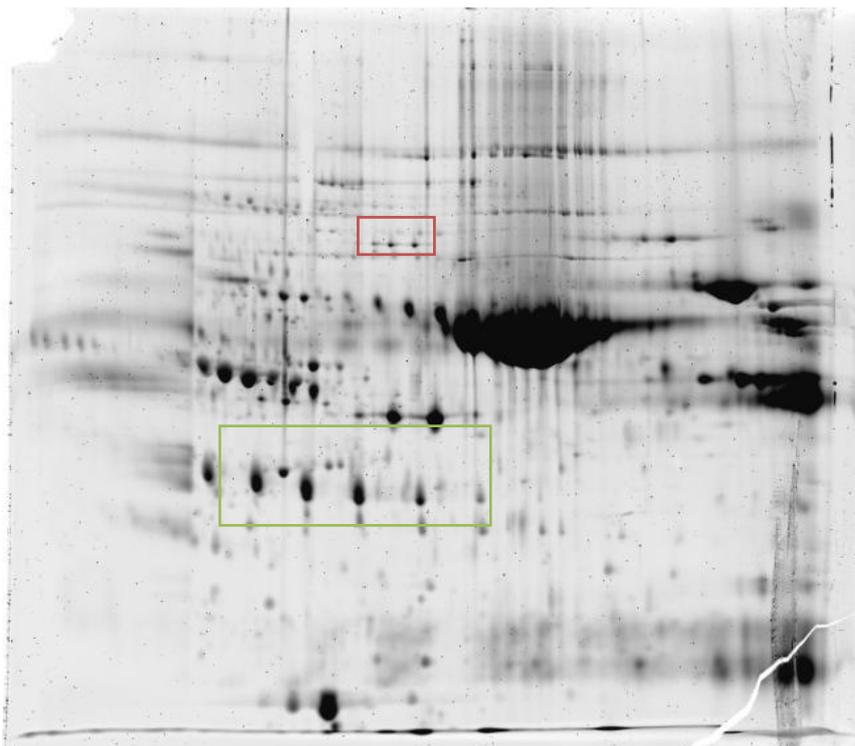


Figure 5.19 : Profil électrophorétique obtenu à partir d'un échantillon de plasma (gamme de pH : 4-7), obtenu à partir de la matrice poly(NAT) et coloration au Ru(BPS)₃

Ainsi, les profils électrophorétiques obtenus à partir des matrices Dextran et poly(NAT)[®] sont très proches, tandis que de fortes traînées sont observées avec le Duracryl. On constate également une véritable séparation des protéines de haute masse moléculaire. Dans les deux premiers cas, on vérifie une très bonne focalisation des spots protéiques, ce qui permet de détecter de nombreuses protéines. La figure 5.20 illustre les performances de résolution élevées en comparant les zones délimitées par les rectangles rouge et vert, pour chacune des matrices testées. On notera, pour la matrice à base de dextran, dans le cas des hautes masses moléculaires, que le dédoublement des spots est vraisemblablement dû à un problème de migration au cours de la première dimension de séparation.

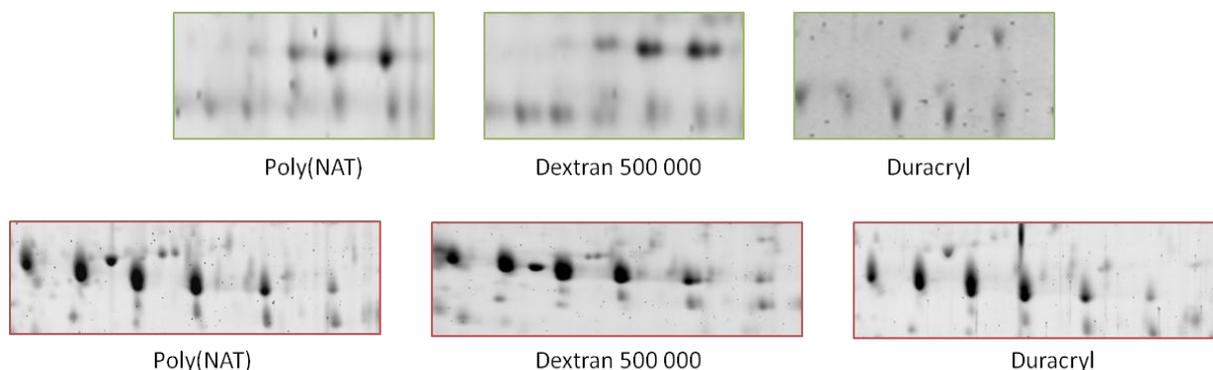


Figure 5.20 : Comparaison de la résolution obtenue à partir des trois matrices évaluées (encadré vert : zone des hautes masses moléculaires ; encadré rouge : zone des basses masses moléculaires)

Nous avons également cherché à vérifier la bonne extraction des protéines pour permettre leur identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le tableau suivant (Tableau 5.4) dresse la comparaison en termes de peptides identifiés, de recouvrement de séquence et de scores d'identification pour les principales protéines plasmatiques dans le cas de chaque matrice. Les annexes 5.7 à 5.12 présentent les PMF de chaque protéine pour les trois matrices utilisées. Ainsi, ces résultats confirment ceux établis dans la partie 2.1.2 : les matrices que nous proposons aboutissent à de meilleures identifications protéiques ainsi qu'à des spectres de masse bien résolus et avec un bon rapport signal-sur-bruit.

Tableau 5.4 : Evaluation de l'extraction protéine/peptide pour chaque matrice évaluée, après excision et digestion des spots protéiques (analyse MALDI-TOF MS)

Protéine	Masse (Da)	pI	Matrice	Score	Peptides identifiés	Recouvrement de séquence
Apolipoprotéine AI	30759	5,56	poly(NAT) [®]	105	15	48 %
			Dextran 500 000	119	16	52 %
			Duracryl [™]	60	19	62 %
Fibrinogène sous- unité γ	51479	5,37	poly(NAT) [®]	134	18	32 %
			Dextran 500 000	169	18	37 %
			Duracryl [™]	-	-	-
α -1-antitrypsine	46707	5,37	poly(NAT) [®]	301	28	61 %
			Dextran 500 000	223	24	62 %
			Duracryl [™]	-	-	-
Haptoglobine	45177	6,13	poly(NAT) [®]	63	8	15 %
			Dextran 500 000	51	11	16 %
			Duracryl [™]	-	-	-
Albumine	69321	5,92	poly(NAT) [®]	112	34	60 %
			Dextran 500 000	91	26	36 %

			Duracryl™	44	12	17 %
Apolipoprotéine A IV	45371	5,28	poly(NAT)®	126	19	43 %
			Dextran 500 000	188	23	52 %
			Duracryl™	-	-	-
Sérot transferrine	77000	6,81	poly(NAT)®	98	18	23 %
			Dextran 500 000	66	15	19 %
			Duracryl™	52	12	16 %

3.5. Applications

3.5.1. Etude de protéines minoritaires plasmatiques

Cette nouvelle étude a pour but de combiner la haute résolution de la séparation 2D du gel à base poly(NAT)® et celle de l'analyse par spectrométrie de masse FT-ICR pour l'identification des protéines minoritaires.

Cette démarche a été effectuée à partir d'échantillons de plasmas déplétés par immunochromatographie (Mars Hu-6, Agilent Technologies), avec un total de 350 µg protéines déposées. La première dimension est effectuée sur une gamme de pH comprise entre 4 et 7 (18 cm, GE Lifescience) ; la deuxième dimension est réalisée sur un gel à base de NAT à 12 %. Au cours de la migration, le système est maintenu à 20 °C. La coloration a été effectuée par fluorescence en utilisant notre complexe à base de Ru(BPS)₃. La figure 5.21 représente l'image du gel obtenue. On constate, encore une fois, une très bonne résolution de chaque spot protéique.

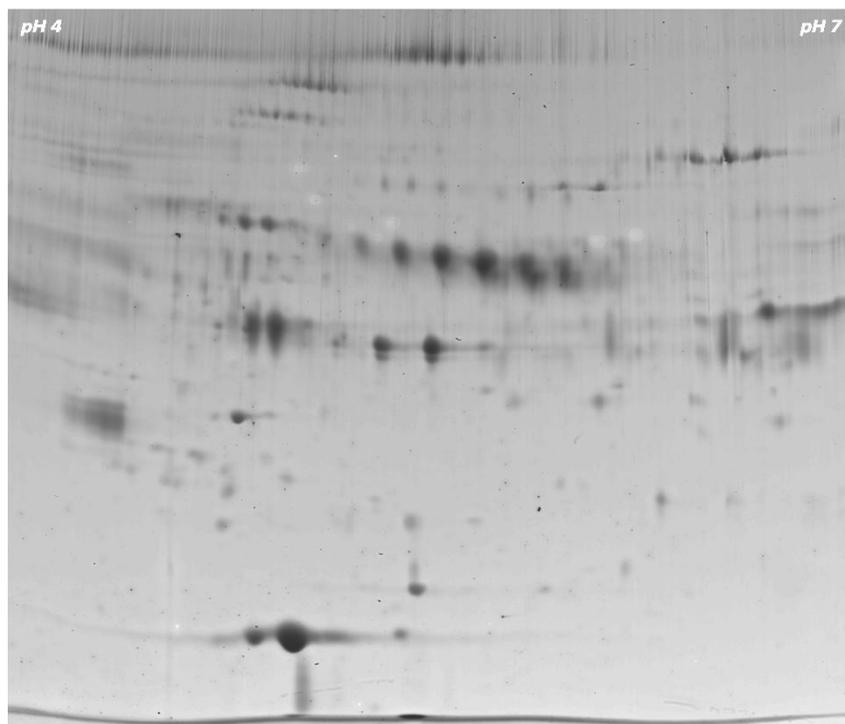


Figure 5.21 : Gel 2D obtenu à partir d'un échantillon de plasma déplété par immunochromatographie. Première dimension effectuée sur une gamme de pH comprise entre 4 et 7 (18 cm) ; deuxième dimension réalisée sur un gel à base de NAT à 12 % T.

L'excision et la digestion de spot ont été assistées par robots (SpotPicker et Digester, Amersham). L'analyse a ensuite été réalisée par nanoLC-nanoESI-FT-ICR-MS. Le tableau 5.5 présente les protéines identifiées (les annexes 5.13 et 5.14 détaillent la position et l'identification pour chacun des spots).

Tableau 5.5 : Bilan des protéines identifiées par MALDI-TOF MS

Protéines identifiées	Concentration (mg/L)	pI	Masse moléculaire	Numéro d'accèsion (Uniprot)
Fibrinogen (Alpha subunit)	2000 - 4000	5,65	92877	P2671
Fibrinogen (Beta subunit)		7,15	52315	P2675
Fibrinogen (gamma subunit)		5,24	48883	P2679
Angiotensin	45	5,6	49761	P01019
Antithrombin III	115-160	5,95	49039	P01008
Apolipoprotein A-IV	125-150	5,18	43375	P06727
Complement factor H-related protein 1 precursor (FHR1)	0,035	7,1	35738	Q03591

Chapitre 5

Complement C3	1000-2000	5,55	113028	P01024
		6,82	71316	
Alpha-1 β -glycoprotein	220	5,6	51920	P04217
Afamine	30	5,6	66577	P43652
Inter- α -trypsin inhibitor (heavy chain 4)	-	5,92	70585	Q14624
Albumine	35000-50000	5,67	66472	P02768
Gelsolin	100-400	5,72	82959	P06396
Kininogen	55-93	6,23	69885	P01042
	109-161		45822	
Complement C9	60	5,42	60978	P02748
Apolipoprotein A-I	1300-1500	5,27	28079	P2647
Ceruloplasmin	210-450	5,41	120085	P00450
Transthyretin	250	5,31	13761	P2766
Hemopexin	500-1000	6,43	49295	P2790
Complement factor H	200-600	6,12	137052	P08603
Complement factor B	170-260	6,66	83000	P00751
Plasminogen	70-200	7,08	88432	P004747
Clusterin	35-105	5,89	50062	P010909
Complement C1s	30	4,85	74887	P09871
Alpha-fetoprotein	< 0,05	5,53	66477	P02771
Complement C4	400	5,33	84183	P0COL4
Vitamin-K binding protein	400	5,22	51243	P02774
Heparin cofactor II	75	6,26	54960	P05546

Le graphique de la figure 5.22 reprend les concentrations plasmatiques physiologiques (chez l'adulte) de chaque protéine identifiée précédemment. On peut ainsi remarquer que les protéines identifiées se répartissent sur quatre ordres de grandeurs. Toutefois, il est intéressant que l'on parvienne à identifier l'alpha-fetoprotéine et la protéine FHR1, qui possèdent des concentrations plasmatiques de l'ordre de quelques dizaines de $\mu\text{g/L}$. L'alpha-fetoprotéine est une glycoprotéine servant de marqueur tumoral dans certains cancers [40, 41] ; la FHR1

est, quant à elle, impliquée dans la régulation du complément [42], et associée au métabolisme des lipides [43]. La gamme de protéines identifiées est élargie ainsi à 7 ordres de grandeurs.

Ainsi, cette étude souligne une nouvelle fois les performances de la matrice à base de NAT en termes de résolution des spots protéiques et d'efficacité d'extraction de protéines au cours de l'hydrolyse enzymatique. L'analyse par spectrométrie FT-ICR MS a permis l'identification de protéines de très faible abondance.

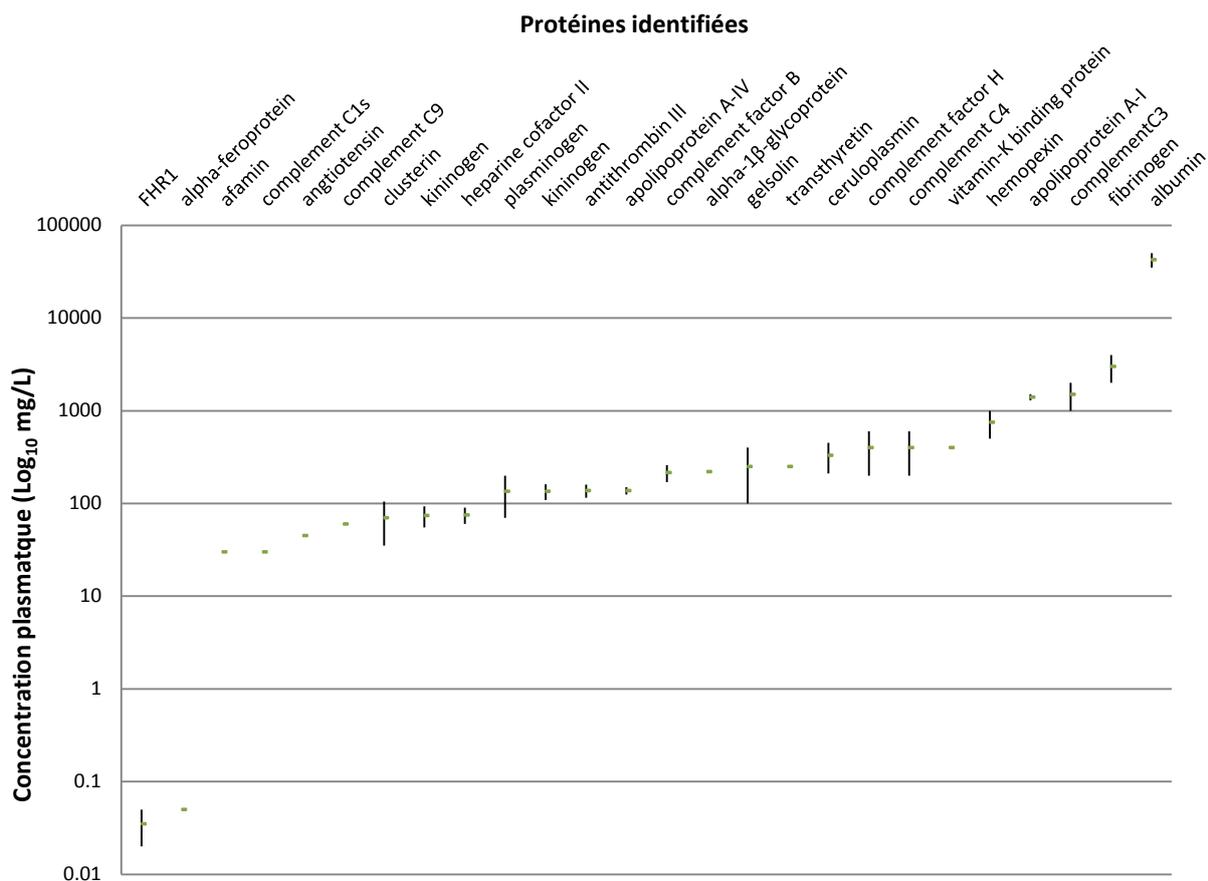


Figure 5.22 : Gamme dynamique des concentrations des protéines identifiées après 2DE et analyses nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS

3.5.2. Comparaison des profils électrophorétiques

Afin de profiter de la haute résolution de la séparation obtenue à partir de gels composés de poly(NAT)[®], il apparait très intéressant de l'utiliser dans le cadre de ce travail de thèse concernant l'étude de l'impact des traitements d'inactivation virale sur les protéines plasmatiques, selon une approche globale. Ainsi, afin de mettre en avant des différences majeures induites par le traitement au bleu de méthylène, deux échantillons de plasmas non-déplétés ont été séparés sur des gels 2D utilisant la matrice commerciale poly(NAT)[®] pour la seconde dimension (12 %T). Les échantillons ont été traités en parallèle : la première

séparation s'est effectuée sur une gamme de pH comprise entre 4 et 7 (18 cm). Au cours de la migration, le système est maintenu à 20 °C.

Les images des gels obtenues sont présentées dans la figure 5.23. Les deux profils électrophorétiques sont similaires, à l'exception du profil des isoformes de l'albumine. La digestion de ce massif d'isoformes n'a pas permis d'expliquer cette différence; une étude minutieuse de chaque image n'a pu mettre en avant de différences majeures.

Ainsi, cette étude ouvre la perspective d'une étude comparative plus approfondie, basée sur la technique 2D-DIGE. Il est possible d'envisager une comparaison des profils électrophorétiques sur des gammes de pH restreintes afin d'étudier ces protéines plasmatiques par groupes de protéines. Cette étude par 2D-DIGE viendra compléter l'étude présentée dans le chapitre 2.

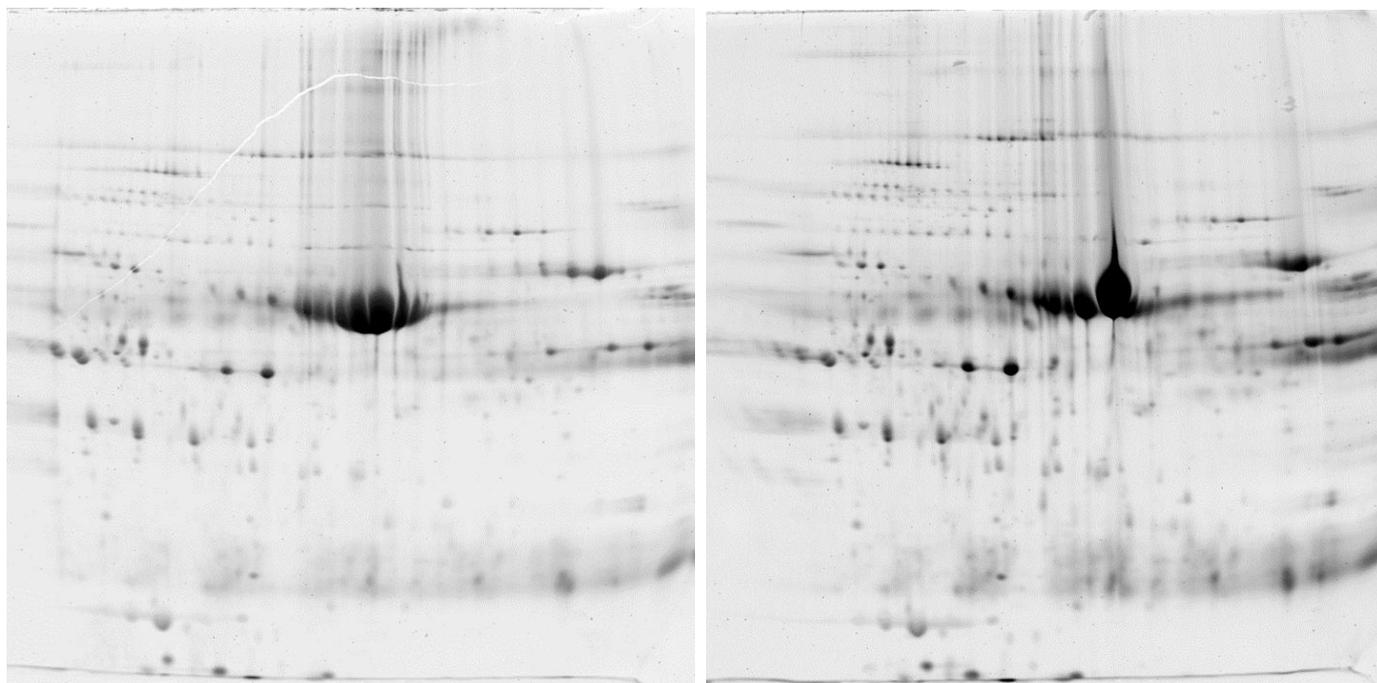


Figure 5.23 : à gauche, le profil électrophorétique d'un échantillon de plasma non traité. A droite, le profil électrophorétique du même échantillon de plasma, après traitement au BM/UV-vis.

4. Conclusion

Deux nouvelles matrices innovantes ont été proposées pour la séparation des protéines par électrophorèse sur gel. Elles proposent des supports plus poreux que les gels de polyacrylamide :

- La première repose sur l'incorporation de dextran. Ces gels sont compatibles avec les méthodes de coloration les plus courantes. Après optimisation, le dextran 500 000 a été

Chapitre 5

préféré, avec une proportion de 0,33 % w/w, pour les propriétés optiques et mécaniques qu'il confère aux gels (faible turbidimétrie et résistance).

- La seconde, issue d'une collaboration avec la société Elchrom Scientific, utilise un monomère hydrophile, de masse moléculaire plus élevée que l'acrylamide. Initialement destinée à la séparation de fragments d'ADN, nous avons démontré ses performances pour la séparation des protéines.

Toutes deux dépassent les propriétés proposées par des solutions commerciales, notamment en termes de résolution des bandes/spots protéiques sans compromis concernant les conditions électrophorétiques. L'extraction protéine/peptide est améliorée dans les deux cas, et facilite l'identification des protéines par analyse MS.

Matrices hautement résolutives, elles s'avèrent être des matrices de choix pour la séparation des échantillons de plasma. Elles sont à présent couramment utilisées au sein de notre équipe.

Bibliographie

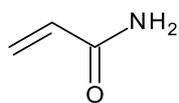
1. Bjellqvist B, Ek K, Giorgio Righetti P, et al.: Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1982; **6**:317-39.
2. Righetti PG, Gelfi C: Electrophoresis gel media: the state of the art. *Journal of Chromatography B* 1996; **699**:63-75.
3. Gordon AH, Keil B, Sebasta K, Knessl O, Sorm F: Adaptive and lethal processes in liquid media and on agar plates. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 1950; **15**:1-8.
4. Smithies O: Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochemical Journal* 1955; **61**:629-41.
5. Raymond S, Weintraub L: Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science (Washington, D C, 1883-)* 1959; **130**:711.
6. Davis BJ: Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1964; **121**:404-27.
7. Hjerten S: "Molecular-sieve" electrophoresis in cross-linked polyacrylamide gels. *Journal of Chromatography* 1963; **11**:66-70.
8. Hjertén S, Mosbach R: "Molecular-sieve" chromatography of proteins on columns of cross-linked polyacrylamide. *Analytical Biochemistry* 1962; **3**:109-18.
9. Norton IT, Goodall DM, Austen KRJ, Morris ER, Rees DA: Dynamics of molecular organization in agarose sulphate. *Biopolymers* 1986; **25**:1009-29.
10. Righetti PG, Caglio S, Saracchi M, Quaroni S: 'Laterally aggregated' polyacrylamide gels for electrophoresis. *Electrophoresis* 1992; **13**:587-95.
11. Wenisch E, de Besi P, Righetti PG: Conventional isoelectric focusing and immobilized pH gradients in 'macroporous' polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1993; **14**:583-90.
12. Bode HJ: The use of liquid polyacrylamide in electrophoresis: II. Relationship between gel viscosity and molecular sieving. *Analytical Biochemistry* 1977; **83**:364-71.
13. Lyubimova T, Caglio S, Gelfi C, Righetti PG, Rabilloud T: Photopolymerization of polyacrylamide gels with methylene blue. *Electrophoresis* 1993; **14**:40-50.
14. Boschetti E: Polyacrylamide derivatives to the service of bioseparations. *Journal of biochemical and biophysical methods* 1989; **19**:21-36.
15. Kozulic B, Mosbach K, Pietrzak M: Electrophoresis of DNA restriction fragments in poly-N-acryloyl-Tris gels. *Analytical Biochemistry* 1988; **170**:478-84.
16. Kozulic M, Kozulic B, Mosbach K: Poly-N-acryloyl-tris gels as anticonvection media for electrophoresis and isoelectric focusing. *Analytical Biochemistry* 1987; **163**:506-12.
17. Kozulic B: U.S Patent 5,185,466. 1993.
18. Kozulic B, inventor U.S Patent 5,371,208. 1994.
19. D'Alessandro A, Righetti PG, Zolla L: The Red Blood Cell Proteome and Interactome: An Update. *Journal of Proteome Research* 2009; **9**:144-63.

20. Smith CL, Ewing CM, Mellon MT, Kane SE, Jain T, Shorr RGL: HydroLink™ gel electrophoresis (HLGE). II. Applications of a new polymer matrix to dsDNA analysis. *Journal of biochemical and biophysical methods* 1989; **19**:51-64.
21. Chiari M, Micheletti C, Nesi M, Fazio M, Righetti PG: Towards new formulations for polyacrylamide matrices: N-acryloylaminoethoxyethanol, a novel monomer combining high hydrophilicity with extreme hydrolytic stability. *Electrophoresis* 1994; **15**:177-86.
22. Simò-Alfonso E, Gelfi C, Sebastiano R, Citterio A, Righetti PG: Novel acrylamido monomers with higher hydrophilicity and improved hydrolytic stability: II. Properties of N-acryloylaminopropanol. *Electrophoresis* 1996; **17**:732-7.
23. Tokarski C, Fillet M, Rolando C: Improved gel electrophoresis matrix for hydrophobic protein separation and identification. *Analytical Biochemistry* 2010; **410**:98-109.
24. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M: Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry* 1996; **68**:850-8.
25. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M: In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protocols* 2007; **1**:2856-60.
26. Bornemann S, Rietschel B, Baltruschat S, Karas M, Meyer B: A novel polyacrylamide gel system for proteomic use offering controllable pore expansion by crosslinker cleavage. *Electrophoresis* 2010; **31**:585-92.
27. Anderson NL, Anderson NG: The Human Plasma Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* 2002; **1**:845-67.
28. Schulenberg B, Arnold B, Patton WF: An improved mechanically durable electrophoresis gel matrix that is fully compatible with fluorescence-based protein detection technologies. *Proteomics* 2003; **3**:1196-205.
29. Porath J: Fractionation of polypeptides and proteins on dextran gels. *Clinica Chimica Acta* 1959; **4**:776-8.
30. Whitaker JR: Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration of Sephadex. *Analytical Chemistry* 1963; **35**:1950-3.
31. Dolník V: Capillary zone electrophoresis of proteins. *Electrophoresis* 1997; **18**:2353-61.
32. Zhang J, Horváth C: Capillary electrophoresis of proteins in dextran-coated columns. *Electrophoresis* 2003; **24**:115-20.
33. Patras G, Qiao GG, Solomon DH: Characterization of the pore structure of aqueous three-dimensional polyacrylamide gels with a novel cross-linker. *Electrophoresis* 2000; **21**:3843-50.
34. Caulfield MJ, Purss HK, Solomon DH: Novel cross-linked polyacrylamide matrices: An investigation using gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis* 2001; **22**:4297-302.
35. Ferguson KA: Starch-gel electrophoresis--Application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. *Metabolism* 1964; **13**:985-1002.
36. Chrambach A, Rodbard D: Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science (New York, NY)* 1971; **172**:440-51.
37. Lerman LS, Frisch HL: Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule? *Biopolymers* 1982; **21**:995-7.

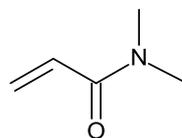
38. Viovy J, Lessec J. Separation of macromolecules in gels: Permeation chromatography and electrophoresis. In: *Polymer Analysis and Characterization*: Springer Berlin / Heidelberg; 1994:1-41.
39. Kozulic B: U.S Patent 5,319,046. 1994.
40. Debruyne EN, Delanghe JR: Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: New aspects and applications. *Clinica Chimica Acta* 2008; **395**:19-26.
41. Wright LM, Kreikemeier JT, Fimmel CJ: A concise review of serum markers for hepatocellular cancer. *Cancer Detection and Prevention* 2007; **31**:35-44.
42. Zipfel PF, Skerka C: Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunology Today* 1994; **15**:121-6.
43. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD: Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; **11**:785-97.

Annexes

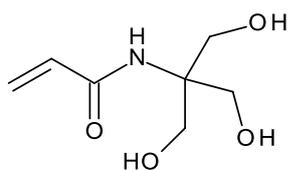
Annexe 5.1 : Principaux monomères synthétisés pour l'électrophorèse [2]



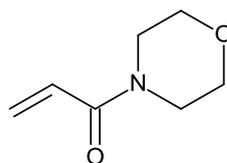
acrylamide



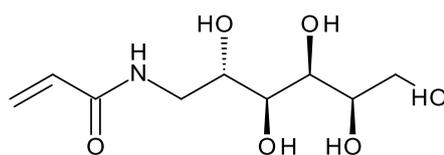
N,N'-diméthylacrylamide (DMA)



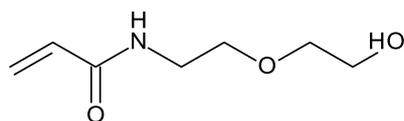
N-acryloyl tris(hydroxyméthyl)-aminométhane



N-acryloyl morpholine

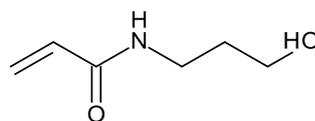


N-acryloyl-1-amino-1-deoxy-D-glucitol



N-acryloyl amino ethoxy ethanol

N-acryloyl amino propanol



Annexe 5.2 : Evaluation de l'influence de la masse moléculaire de Dextran incorporé sur la séparation électrophorétique

	Dextran (masse moléculaire, g/mol)						
	no dextran	6000	15000	40000	100000	500000	2000000
Log ₁₀ (MW _{prot})	Mobilité relative (Rf)						
5,322219295		0,11921053	0,12743506	0,11392405	0,11921053	0,14634146	0,11578947
5,230448921	0,09	0,15890351	0,15604708	0,16447368	0,1622807	0,18292683	0,15366541
5,064457989	0,16883117	0,24491228	0,25487013		0,265	0,29268293	0,23815789
4,986771734	0,22077922	0,29122807	0,31858766	0,32894737	0,31469298	0,34756098	0,31447368
4,880813592	0,28571429	0,35736842	0,38230519	0,40789474	0,37105263	0,40853659	0,37593985
4,819543936	0,33766234	0,43017544	0,45900974	0,48684211	0,45061404	0,47560976	0,45112782
4,72427587	0,45454545	0,53921053	0,56720779	0,59210526	0,52017544	0,57317073	0,55103383
4,653212514	0,57142857	0,59561404	0,68214286	0,72368421	0,62938596	0,69512195	0,6712406
4,477121255	0,88311688	0,88692982	0,93725649	0,94736842	0,89127193	0,96341463	0,97255639

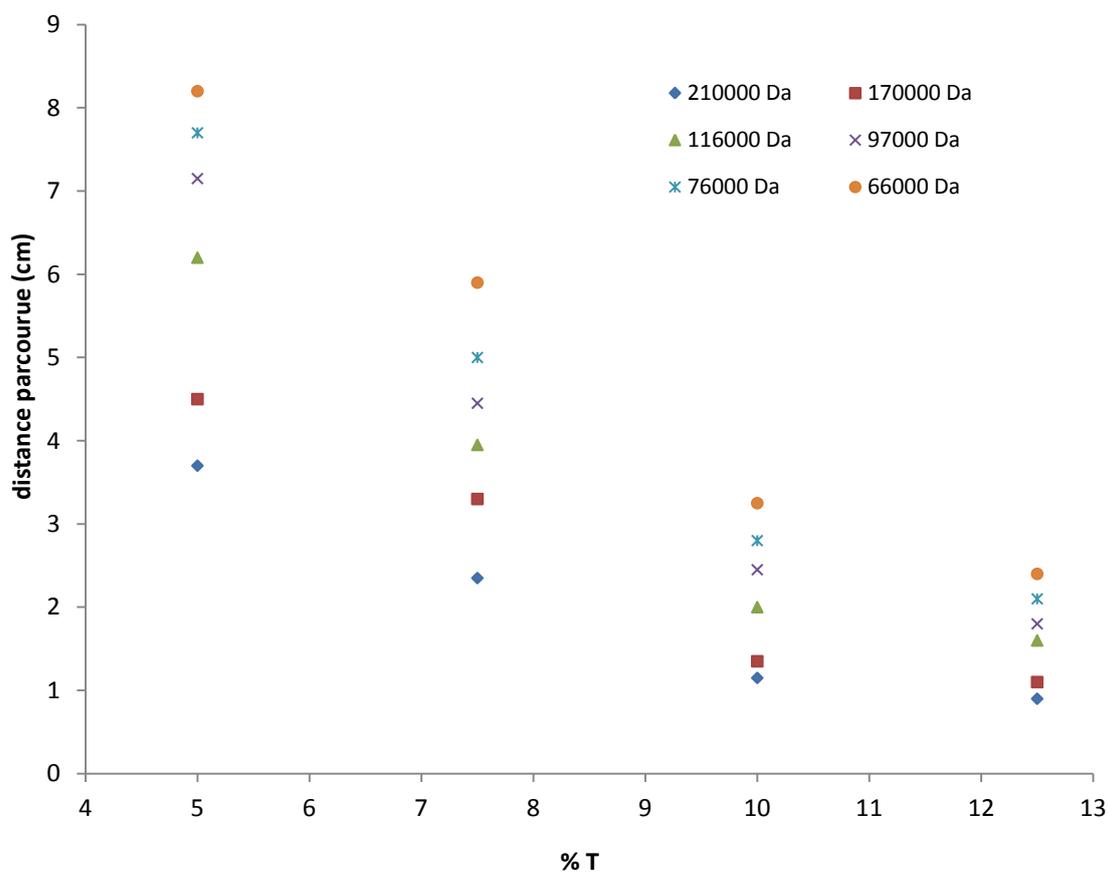
Régression logarithmique de Log₁₀(MW_{prot}) = f (Rf)

Dextran (g/mol)	Logarithmic fit	R ²
No	y=-0,322ln(x)+4,4689	0,9942
6000	y=-0,3804ln(x)+4,5195	0,9922
15000	y=-0,4034ln(x)+4,5060	0,9945
40000	y=-0,391ln(x)+4,5149	0,9866
60000	y=-0,4023ln(x)+4,5023	0,9905
100000	y=-0,4085ln(x)+4,5023	0,9872
200000	y=-0,4215ln(x)+4,489	0,9938
500000	y=-0,4478ln(x)+4,4835	0,9947
2000000	y=-0,3684ln(x)+4,4981	0,9921

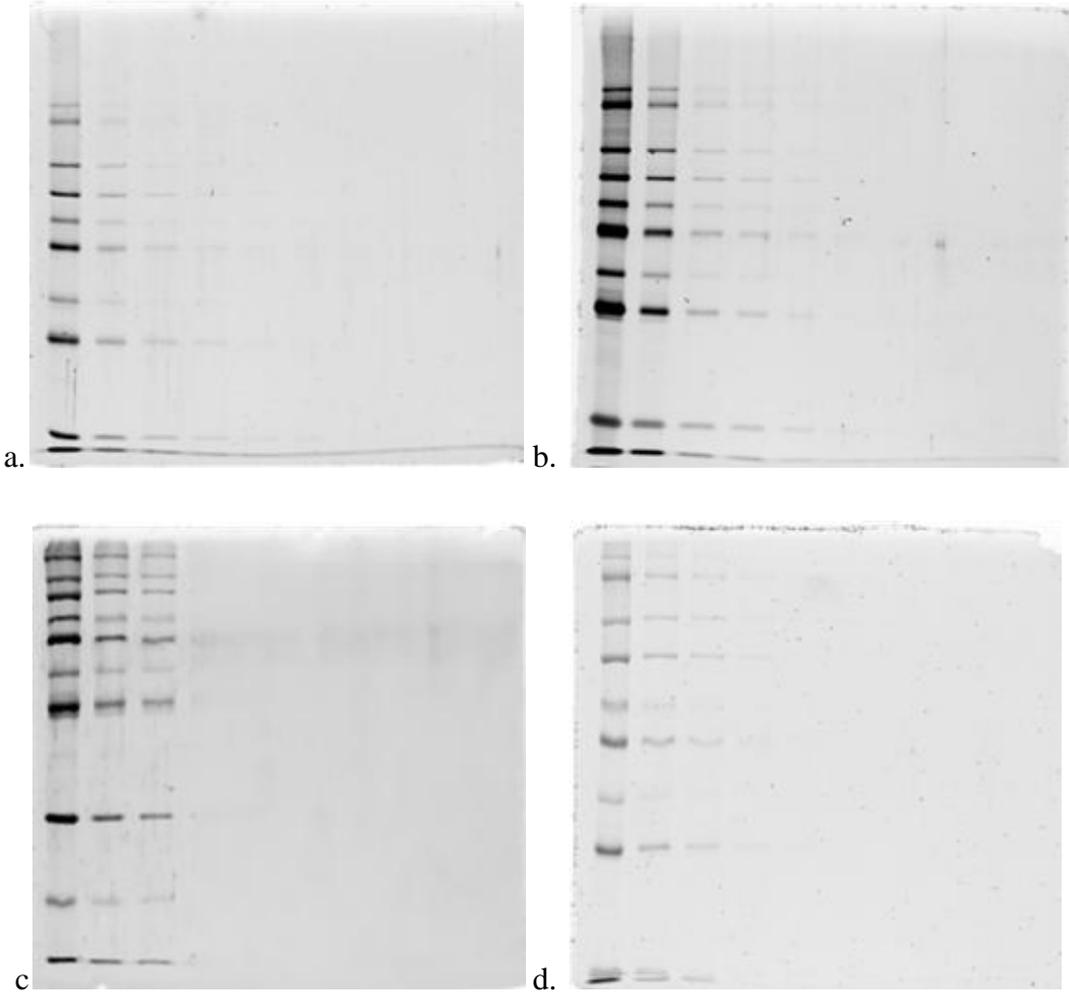
Annexe 5.3 : Evaluation de l'influence de la proportion (% w/v) de Dextran 500 000 incorporée. Régression logarithmique $\text{Log}_{10}(\text{MW}_{\text{prot}}) = f(\text{Rf})$

Dextran 500 000 % (w/v)	Logarithmic fit	R ²
0	$y = -0,322\ln(x) + 4,4689$	0,9942
0,08	$y = -0,3604\ln(x) + 4,4767$	0,9898
0,33	$y = -0,4170\ln(x) + 4,4451$	0,9985
0,67	$y = -0,4478\ln(x) + 4,4835$	0,9947
0,99	$y = -0,4767\ln(x) + 4,4851$	0,9921
1,65	$y = -0,5584\ln(x) + 4,4060$	0,9970

Annexe 5.4 : Représentation graphique de la distance parcourue en fonction du pourcentage % T



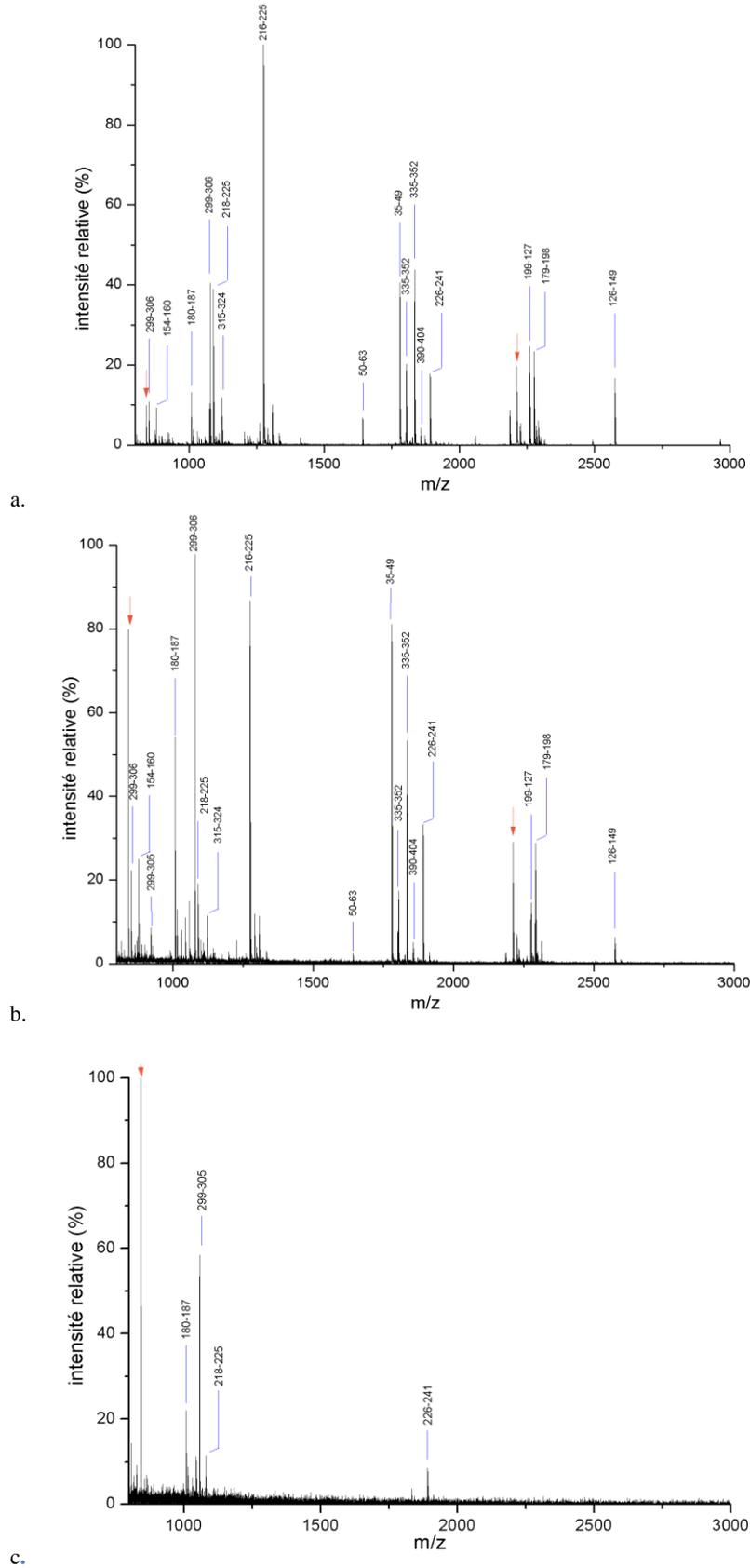
Annexe 5.5 : Travail sur l'équivalence de réticulation



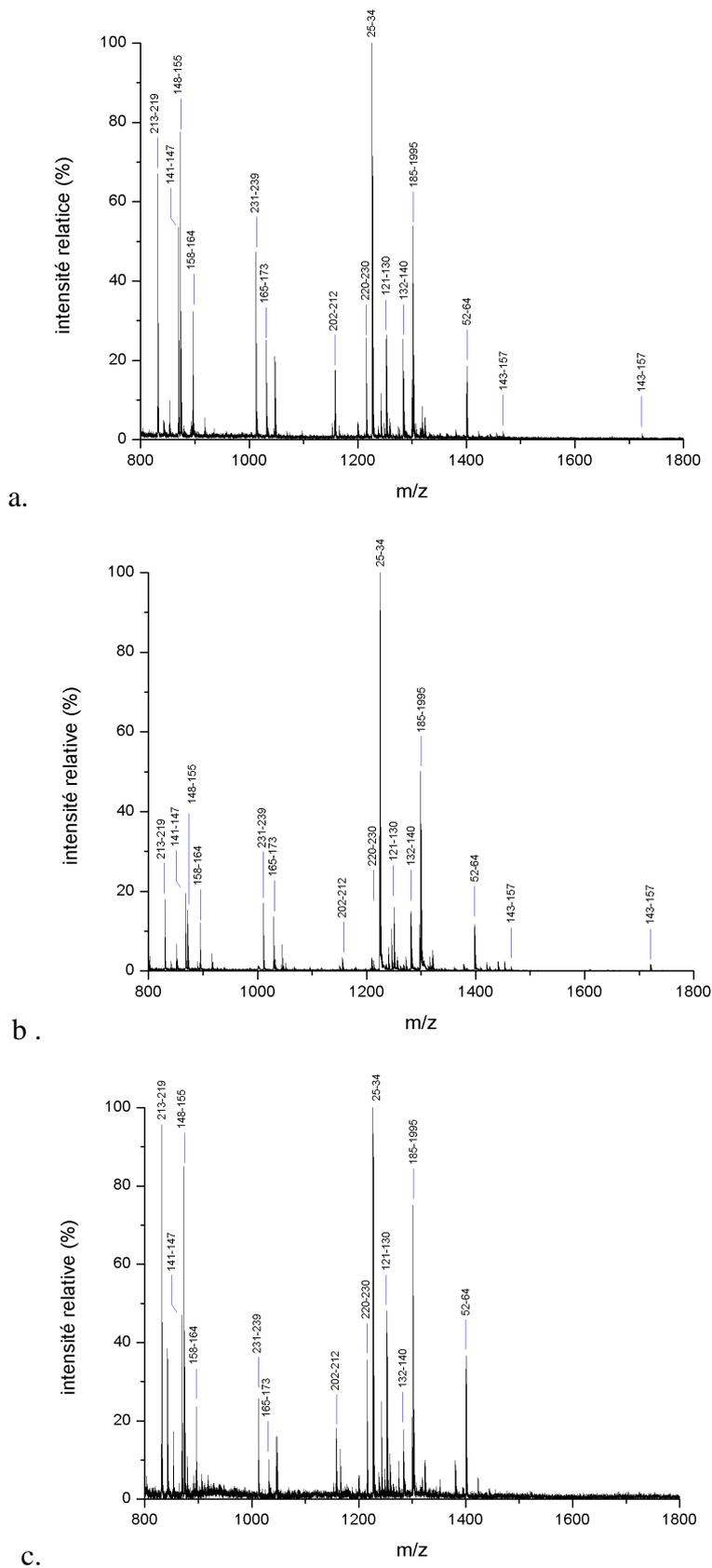
Annexe 5.6 : Normalisation des DO

Protéines	Matrice poly(NAT) [®]	Matrice Dextran	Matrice Duracryl [™]
1	75,70	24,86	34,67
2	111,93	54,02	79,04
3	111,14	107,64	57,65
4	109,66	115,91	105,61
5	89,54	72,75	43,55
6	111,82	123,82	115,27
7	87,54	38,09	37,18
8	135,03	118,91	121,42

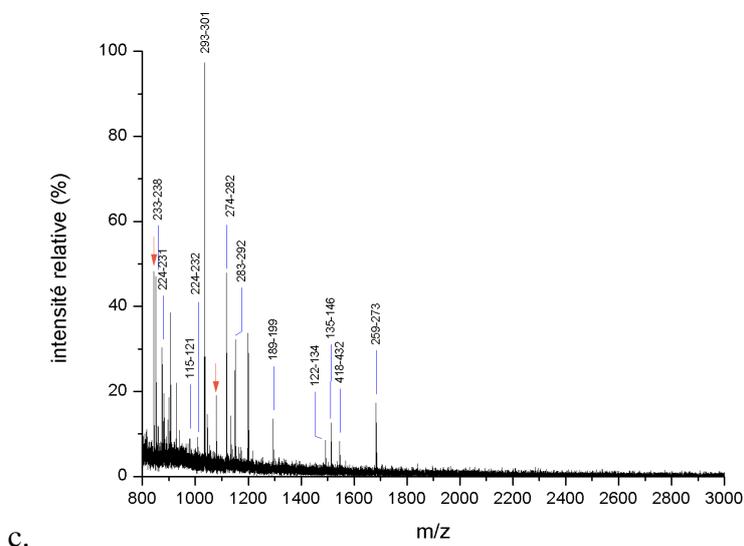
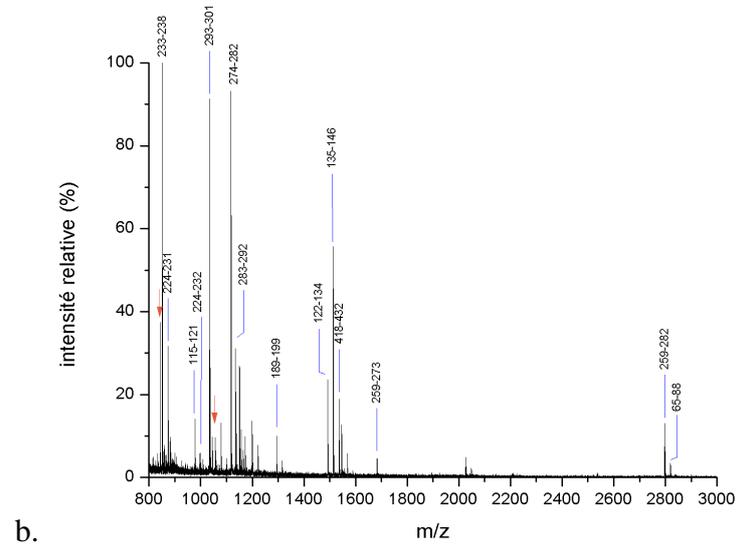
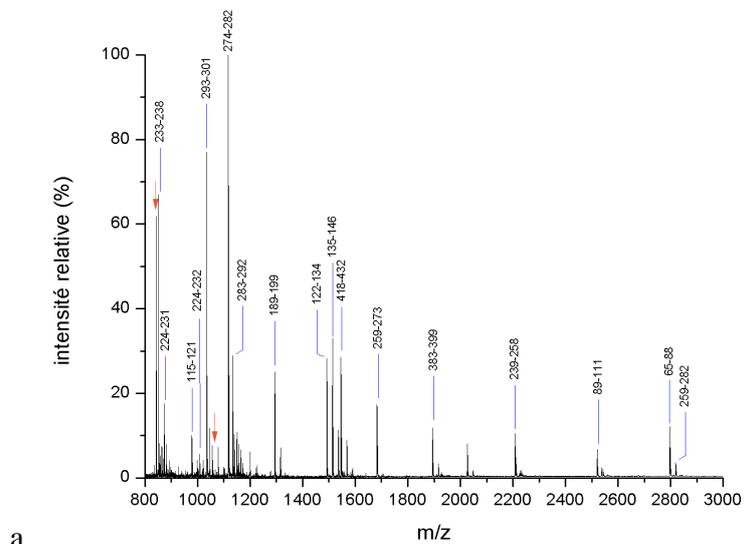
Annexe 5.7 : Comparaison de la PMF de l'alpha-1-antitrypsine, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base (a) de poly(NAT), (b) de Dextran 500 000 et de (c) Duracyl.



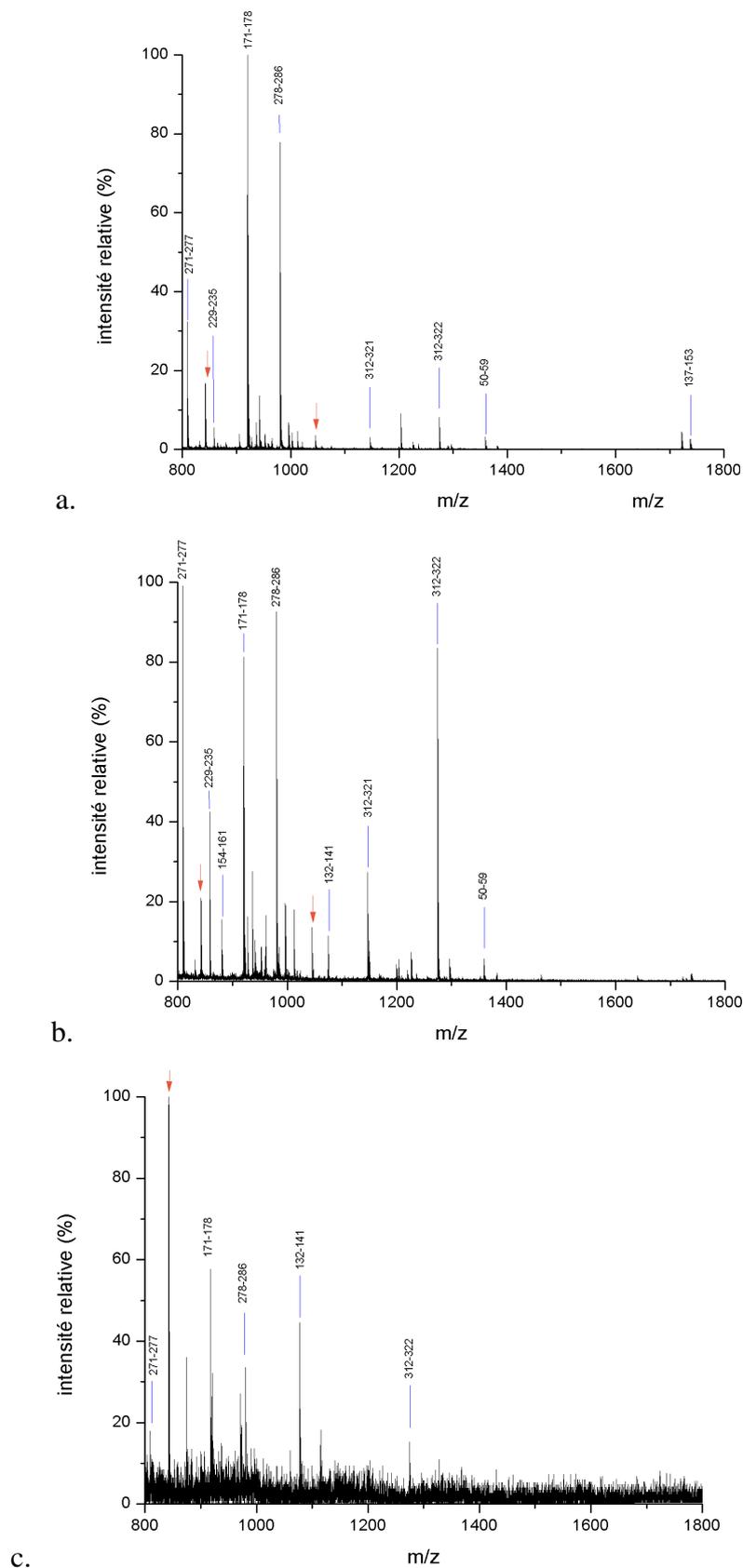
Annexe 5.8 : Comparaison de la PMF de l'apolipoprotéine A-I, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base (a) de poly(NAT), (b) de Dextran 500 000 et de (c) Duracryl.



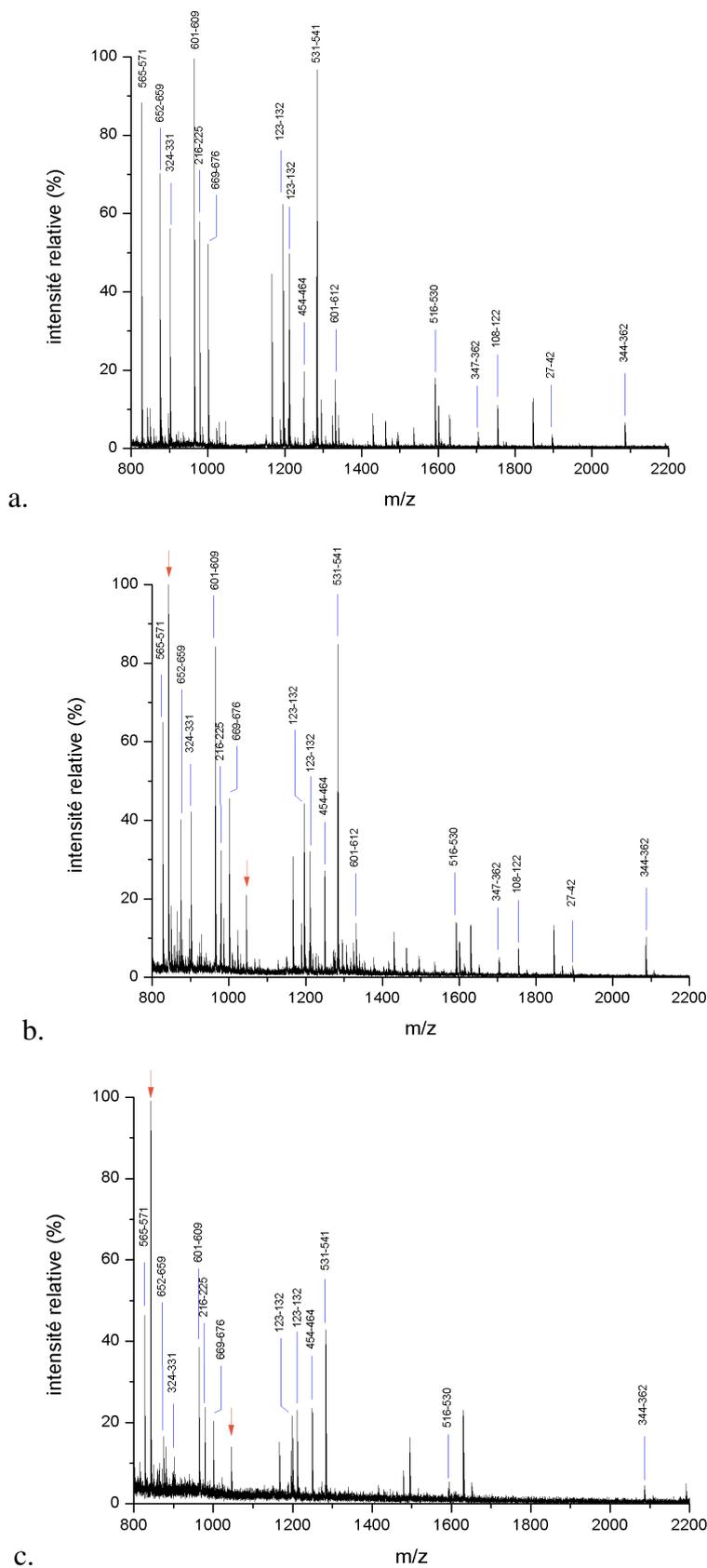
Annexe 5.9 : Comparaison de la PMF de la sous-unité gamma du fibrinogène, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base (a) de poly(NAT), (b) de Dextran 500 000 et de (c) Duracryl.



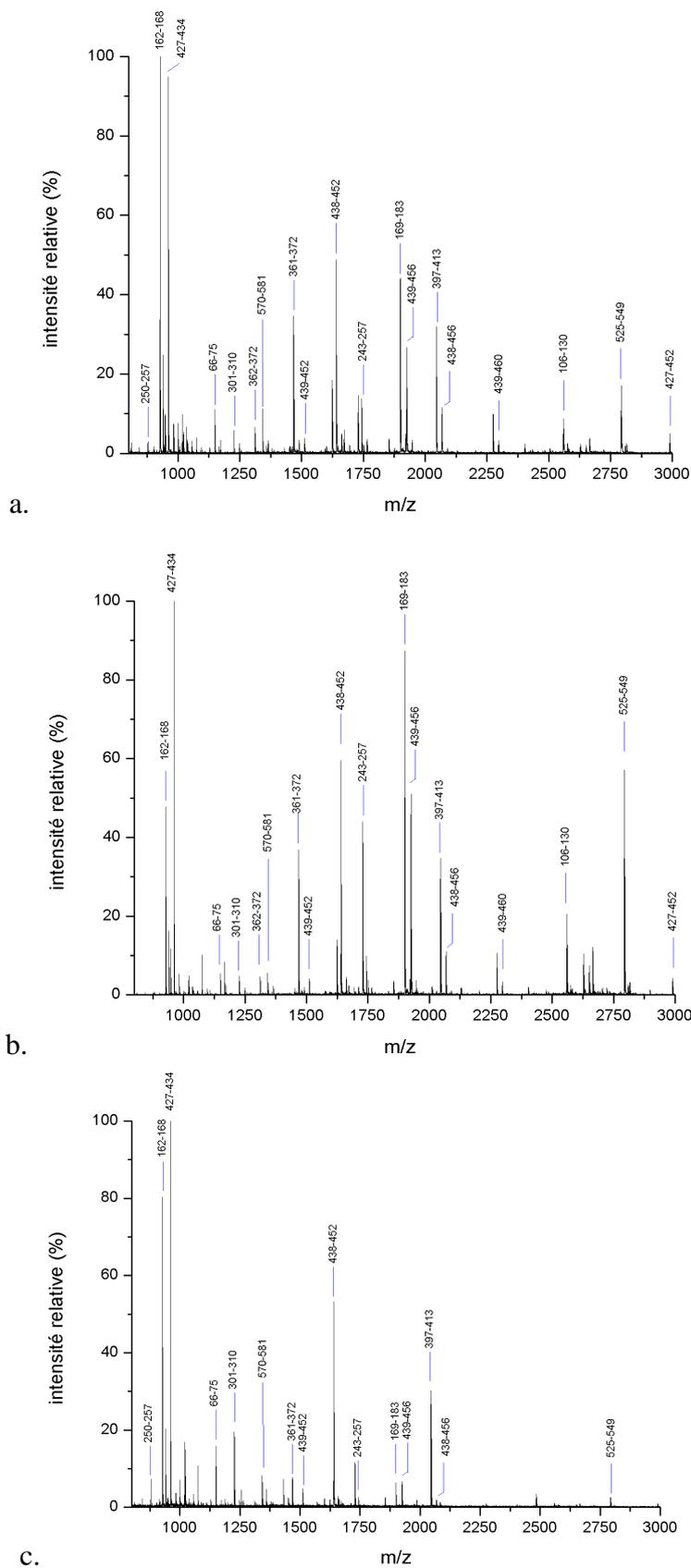
Annexe 5.10 : Comparaison de la PMF de l'haptoglobine, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base (a) de poly(NAT), (b) de Dextran 500 000 et de (c) Duracryl.



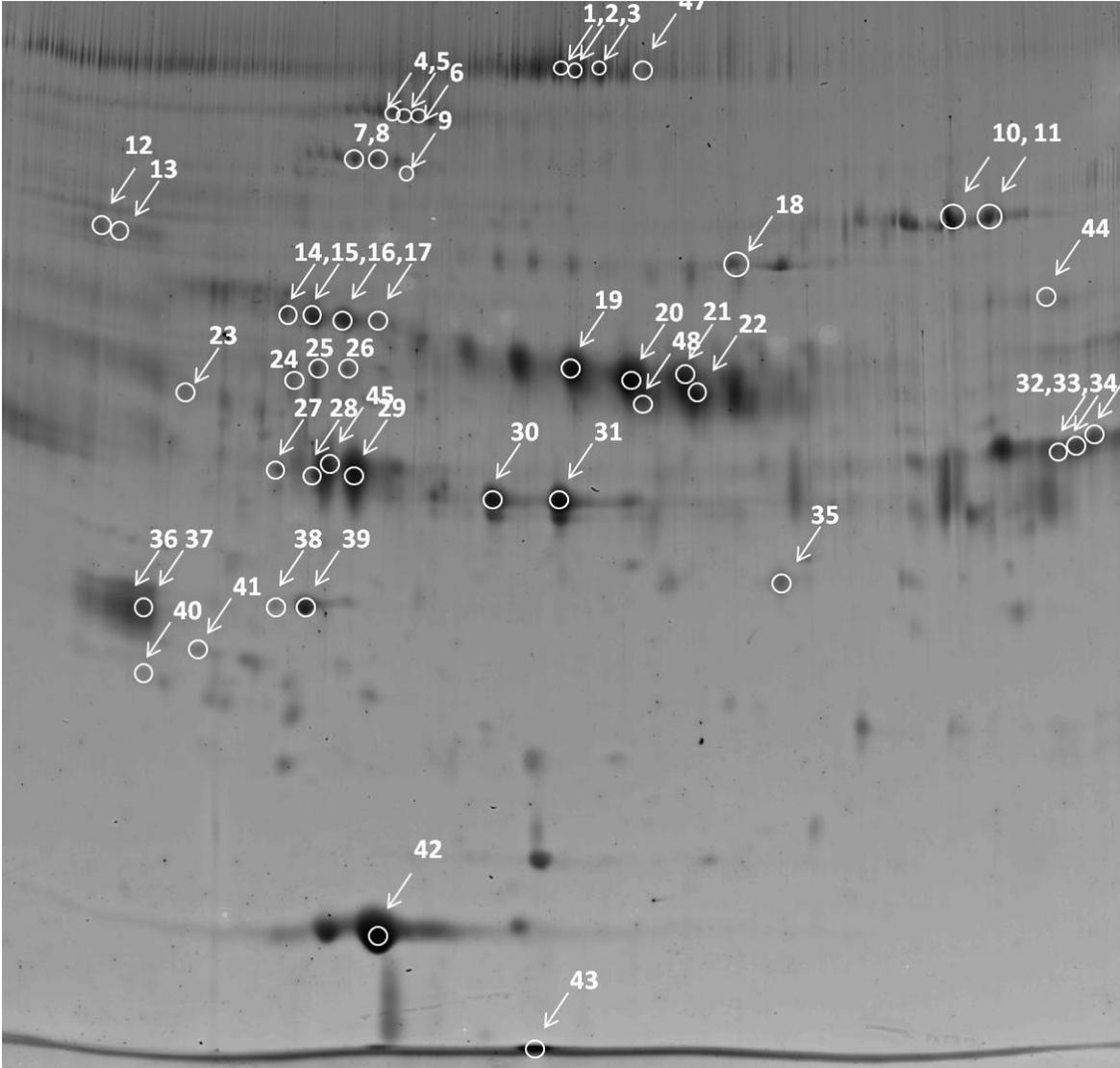
Annexe 5.11 : Comparaison de la PMF de la sérotransferrine, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base (a) de poly(NAT), (b) de Dextran 500 000 et de (c) Duracryl.



Annexe 5.12 : Comparaison de la PMF de l'albumine, après excision et digestion (analyse MALDI-TOF), à partir des matrices à base (a) de poly(NAT), (b) de Dextran 500 000 et de (c) Duracryl.



Annexe 5.13 : Plan de découpe du gel 2D obtenu à partir d'un échantillon de plasma déplété par immunochromatographie



Annexe 5.14 : Récapitulatif des protéines identifiées, après excision des spots et analyses nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS

# spot	Protéine identifiée	Score MASCOT	Peptide count
1	CFAH_HUMAN	188	9
2	CFAH_HUMAN	63	3
3	CFAH_HUMAN	65	6
4	CERU_HUMAN	58	3
5	CERU_HUMAN	37	3
6	CERU_HUMAN	53	3
7	CERU_HUMAN	31	3
8	CERU_HUMAN	45	3
9	PLMN_HUMAN	28	3
10	CFAB_HUMAN	241	17
11	CFAB_HUMAN	65	5
12	C1S_HUMAN	38	3
13	C1S_HUMAN	52	3
14	A1BG_HUMAN	162	13
14	ITIH4_HUMAN	94	4
14	AFAM	67	4
15	A1BG_HUMAN	107	8
15	ITIH4_HUMAN	84	2
15	AFAM_HUMAN	37	5
16	A1BG_HUMAN	180	16
16	ITIH4_HUMAN	97	4
17	A1BG_HUMAN	39	4
18	GELS_HUMAN	94	5
19	ALBU_HUMAN	143	9
19	FETA_HUMAN	41	3
19	HEMO_HUMAN	50	3
20	ALBU_HUMAN	36	3

# spot	Protéine identifiée	Score MASCOT	Peptide count
22	ALBU_HUMAN	155	9
22	HEMO_HUMAN	68	12
23	KNG1_HUMAN	33	3
24	CO9_HUMAN	66	5
25	CO9_HUMAN	41	3
26	CO9_HUMAN	99	5
27	ANT3_HUMAN	143	7
28	ANT3_HUMAN	75	11
28	FIBG_HUMAN	60	5
28	VTDB_HUMAN	81	11
29	FIBB_HUMAN	42	3
30	ANT3_HUMAN	40	3
30	FIBG_HUMAN	106	5
31	FIBG_HUMAN	106	4
32	ANGT_HUMAN	78	9
33	FIBB_HUMAN	218	36
34	FIBB_HUMAN	28	4
35	FHR1_HUMAN	49	3
36	CO3_HUMAN	146	10
37	CO3_HUMAN	103	7
38	APOA4_HUMAN	166	10
39	APOA4_HUMAN	178	21
40	CLUS_HUMAN	118	5
41	CLUS_HUMAN	95	4
42	APOA1_HUMAN	1009	73
43	TTHY_HUMAN	219	8
44	CO4A_HUMAN	136	5

Chapitre 5

20	HEMO_HUMAN	30	6
20	HEP2_HUMAN	54	4
21	ALBU_HUMAN	182	12
21	HEMO_HUMAN	159	19

44	FIBA_HUMAN	256	21
45	VTDB_HUMAN	107	12
46	HEMO_HUMAN	57	3
47	CFAH_HUMAN	45	2

Conclusion générale

La protéomique reste encore peu utilisée dans le domaine de la transfusion sanguine, et en particulier en ce qui concerne le plasma transfusionnel. Ces travaux de thèse, en étroite collaboration avec l'Etablissement Français du Sang Nord-de-France, avaient non seulement pour objectif d'étudier l'impact des traitements d'inactivation des agents pathogènes et des conditions de stockage sur les protéines plasmatiques, mais également de démontrer l'apport de l'analyse protéomique à la médecine transfusionnelle.

Tout au long de ces travaux, plusieurs démarches de l'analyse protéomique ont été déployées. Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence l'impact du traitement au bleu de méthylène sur un échantillon de plasma. Pour ce faire, nous avons établi une liste de oxydations (+ 15,99 Da) apparaissant sur des protéines modèle dans les conditions du traitement au bleu de méthylène. Nous avons poursuivi notre étude par la mise en place d'une stratégie de quantification différentielle sans marquage (ou « label-free ») basée sur l'analyse nanoLC-nanoESI-FT-ICR et sur le traitement statistique des données, à partir de digests de plasma avant et après traitement. Des modifications, principalement des oxydations et des déamidations (+ 0,98 Da), ont pu être identifiées sur diverses protéines plasmatiques après traitement.

Dans un second temps, nous avons prolongé ce travail par une approche ciblée. Au cœur de la cascade de coagulation, le fibrinogène est la protéine la plus touchée par le traitement au bleu de méthylène, après lequel on constate une diminution de son activité coagulante. Après purification, l'analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de fibrinogène issu de plasma traité a confirmé non seulement la présence d'oxydations et de déamidations, mais également de citrullinations (+ 0,98 Da) et de carbamylations (+ 43,00 Da). Ces modifications

Conclusion générale

expliquent, pour la première fois, l'origine de la baisse de l'activité du fibrinogène due au traitement au bleu de méthylène.

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de la RBP4, envisagée comme marqueur de dégradation plasmatique. En effet, la RBP4 circule dans le plasma associée avec la transthyréline. Au cours de la dégradation du plasma, ce complexe se dissocie, libérant la RBP4. Tout d'abord, une stratégie de quantification absolue (AQUA) de la RBP4 a été mise en place dans la perspective de pouvoir évaluer la qualité transfusionnelle du plasma. Ainsi, trois peptides protéotypiques de cette protéine ont été sélectionnés ; la méthode analytique a été validée à partir de la quantification de la RBP4 totale, contenue dans un plasma. En parallèle, un important travail de purification de la forme libre de RBP4 a été effectué. Après avoir testé plusieurs approches, l'immuno-chromatographie a permis d'isoler cette forme. Enfin, un suivi de dégradation a montré que la dissociation du complexe intervenait à partir de 12h suivant la plasmaphérèse. L'utilisation de la RBP4 comme indice de dégradation est extrêmement intéressante dans la mesure où il s'agit d'un marqueur qui est indépendant du sexe et du l'âge du donneur, contrairement au facteur VIII, actuellement dosé pour établir la stabilité de plasma transfusionnel.

Enfin, l'électrophorèse sur gel occupe une place importante de l'analyse protéomique. Nous avons également proposé un travail de développement de deux nouveaux supports permettant d'augmenter la résolution des séparations électrophorétiques, sur des échantillons aussi complexes que le plasma. Deux approches ont été déployées pour développer de tels supports : (i) l'ajout d'un polymère préformé (le dextran), et (ii) l'utilisation d'un monomère (le NAT). Ces deux matrices conviennent idéalement à la séparation de protéines. En effet, ces matrices présentent (i) une faible turbidimétrie diminuant le bruit de fond du gel alors de l'étape de détection, (ii) une immobilisation et une résolution accrues des bandes/spots protéiques permettant une meilleure visualisation des protéines après coloration, (iii) des propriétés mécaniques intéressantes leur permettant d'être facilement manipulées, (iv) une compatibilité avec les techniques de coloration post-électrophorétiques les plus courantes. Enfin, nous avons pu mettre en avant que ces deux matrices facilitaient également l'identification des protéines, à partir d'analyses MALDI-TOF MS et nanoLC-nanoESI-FT-ICR MS.

Plus généralement, nous avons été confrontés à la complexité de l'échantillon plasmatique, en termes de composition protéique et de gamme dynamique. En effet, les deux approches ciblées abordées (étude du fibrinogène et de la RBP4) ont nécessité d'inclure une

Conclusion générale

étape de purification aux stratégies analytiques mises en place. Différentes méthodes de purification ont été testées ; plusieurs modes de la chromatographie liquide ont été utilisés (SEC, IEX, HIC, immunoaffinité), qui parfois ont imposé la préparation de phases stationnaires spécifiques. Dans le cadre de l'étude du fibrinogène, il a fallu définir des conditions chromatographiques qui puissent allier spécificité et préservation de l'activité biologique. Pour l'étude de la RBP4, la méthode de purification devait être à la fois spécifique et sensible, dans la mesure où seule la forme libre de cette protéine est intéressante pour le suivi de dégradation du plasma. Une attention particulière a été portée au nombre d'étapes devant être utilisées pour ces deux purifications, afin de minimiser l'impact de la préparation d'échantillon : les purifications mises en place n'excèdent pas deux étapes.

Au travers de l'étude du fibrinogène et de la RBP4, il apparaît évident que l'on touche ici aux limites de l'analyse protéomique actuelle, dans la mesure où l'analyse des protéines à partir de leurs peptides constitutifs ne suffit plus. En effet, ces deux études soulèvent la notion d'« *interactome* » avec le fibrinogène et de « *complexome* » avec la RBP4, domaines vers lesquels la protéomique de demain devra s'orienter pour comprendre pleinement la fonctionnalité des protéines, ou encore appréhender les répercussions des modifications d'une protéine vis-à-vis de son « *interactome* », comme le montre notre étude sur le fibrinogène.

Perspectives

Ces travaux ouvrent plusieurs perspectives afin de poursuivre l'effort dans l'amélioration de la qualité transfusionnelle du plasma.

En effet, dans l'optique de généraliser le dosage de la RBP4 à plus grande échelle, il est impératif d'adapter la méthodologie développée dans ces travaux afin de la transférer au sein des EFS. Même si au cours de la purification, une attention particulière a été portée pour minimiser la préparation d'échantillon, celle-ci reste encore perfectible. En effet, l'étape de digestion des fractions purifiées et le tracé des droites d'étalonnage, telles qu'elles ont été utilisées, demandent un temps important. Il est possible de réduire des temps de digestions et le temps d'analyse, voire même d'envisager de travailler sur d'autres spectromètres de masse, comme par exemple un MALDI/QqQ qui permettrait d'allier analyse haut-débit, spécificité de détection, sensibilité et quantification. Par ailleurs, il est également possible d'avoir recours à des tests de type ELISA sandwich qui utiliseraient l'anticorps anti-RBP4 libre utilisé au cours de notre purification. Un autre argument en faveur de l'ELISA est la quantification par

Conclusion générale

fluorescence, qui nécessite moins d'investissement, ce qui est un aspect non-négligeable pour l'implantation du dosage de la RBP4 libre au sein de l'EFS.

De plus, les résultats issus de l'étude du fibrinogène nous ont conduits à établir l'origine de la diminution de son activité après traitement au bleu de méthylène. Actuellement, la démarche développée est appliquée sur plusieurs lots de plasma travail afin de confirmer les observations constatées. Par ailleurs, il serait également pertinent d'utiliser cette démarche pour étudier l'impact d'autres traitements photochimiques d'inactivation, afin de les comparer à celui du bleu par exemple. Plus théorique, une étude structurale du fibrinogène est également envisagée afin d'appréhender les conséquences des modifications sur la structure du fibrinogène, et permettrait de rationaliser pleinement l'origine de la baisse d'activité. Enfin, un travail visant à stabiliser le fibrinogène, par une solution composée d'espèces osmolytiques, par exemple, pendant le traitement d'inactivation au bleu de méthylène, est en cours. Ce dernier projet nous a, d'ailleurs, permis de développer une collaboration avec la société Macopharma, fournisseur du bleu de méthylène pour la France.

Enfin, à partir des performances (résolution, extraction protéine/peptide) constatées des deux matrices développées pour l'électrophorèse, il serait particulièrement intéressant d'allier ces propriétés à la puissance de la technique DIGE pour suivre l'évolution du profil électrophorétique d'échantillon de plasma avant et après traitement d'inactivation. Dès lors, ce travail de comparaison peut être aisément étendu aux autres traitements d'inactivation, comme l'inactivation des agents pathogènes par l'amotosalen ou par solvant-détergent, également utilisés en France.

Matériels & Méthodes

Sommaire

1	Préparation des échantillons avant analyse.....	253
1.1	Modification in-vitro	254
1.2	Préparation de plasmas	255
1.2.1	Déplétion des protéines abondantes	256
1.2.2	Purification du fibrinogène.....	257
1.2.3	Isolement de la RBP4	259
1.3	Dosage de protéines.....	259
1.3.1	Méthode de Lowry	260
1.3.2	Méthode de Bradford	262
1.4	Dessalage des échantillons	270
2	Séparation électrophorétique, révélation post-électrophorétique et analyse d'images	271
2.1	Gel d'électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)	271
2.2	Gel d'électrophorèse bidimensionnelle	272
2.3	Coloration post-électrophorétique	272
2.4	Analyse d'image des gels d'électrophorèse.....	351
3	Hydrolyse enzymatique	351
3.1	Hydrolyse enzymatique d'un échantillon protéique : digestion en solution	351
3.2	Hydrolyse enzymatique de protéines séparées sur gel d'électrophorèse.....	352
4	Analyse par spectrométrie de masse	353
4.1	Analyse par MALDI-TOF MS	353
4.2	Analyse par MALDI –TOF/TOF MS	353
4.3	Analyse par couplage nanoLC-nanoESI – MS/MS	354
4.3.1	NanoLC	354
4.3.2	Analyse par nanoLC-nanoESI-Qq-TOF MS/MS	355
4.3.3	Analyse par nanoLC-nanoESI Qh-FT-ICR.....	356
5	Identification des protéines	357

5.1	Identification protéique par les empreintes peptidiques des protéines	357
5.2	Identification protéique par données MS/MS.....	357
6	Quantification AQUA.....	358

Matériel & Méthodes

1 Préparation des échantillons avant analyse

1.1 Modification *in-vitro*

Les différentes conditions *in-vitro* ont été développées sur plusieurs standards : la substance P (Sigma Aldrich), l' α -lactalbumine (Sigma Aldrich), l'albumine sérique bovine (Sigma Aldrich). Les solutions standards sont préparées à 1 mg/mL dans du sérum physiologique pH 7 (NaCl 0,9%), puis transférées dans le système Theraflex (MacoPharma).

Des solutions de substance P, d' α -lactalbumine et de BSA ont été respectivement illuminées suivant la démarche standard développée par l'EFS Nord-de-France. Le bleu de méthylène est introduit dans la solution de standard à une concentration finale de 1 μ M, illuminée ensuite pendant 20 min à 20°C à une longueur d'onde de 560 nm (énergie finale émise : 180 J/cm²). Après illumination, la solution est filtrée sur un dispositif BlueFlex (MacoPharma) pour retirer le bleu de méthylène et les azurs résiduels.

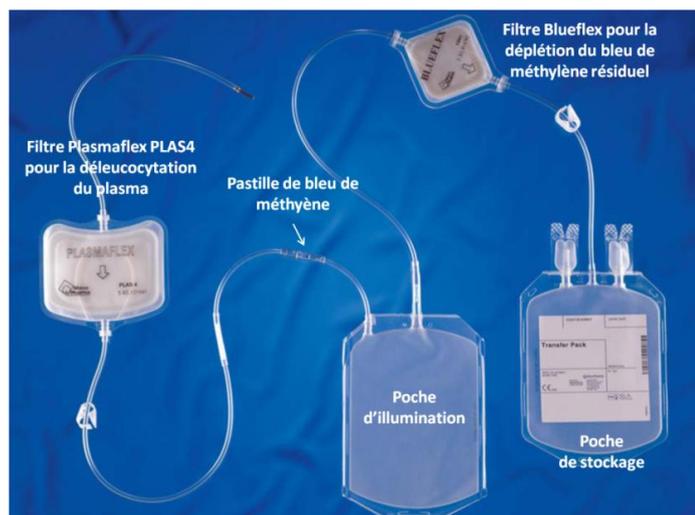


Figure 1 : Schéma du dispositif utilisé pour le procédé de viro-inactivation photochimique au bleu de méthylène

1.2 Préparation de plasmas

Tous les plasmas traités ou non traités ont été fournis par l'Établissement Français du Sang Nord-de-France.

1.2.1 Déplétion des protéines abondantes

Afin d'éliminer les protéines les plus abondantes présentes dans le plasma, une colonne d'immuno-affinité a été utilisée. Il s'agit de la colonne MARS Hu-6 (Multiple Affinity Removal Systems) commercialisée par Agilent Technologies, de dimension 4,6mm i.d x 100 mm. Elle permet la déplétion des six protéines majoritaires : l'albumine, les immunoglobulines G et A, l'haptoglobine, l' α -1-antitrypsine et la sérotransferrine. La séparation sur la colonne MARS est effectuée sur un système AKTAPurifier™ (GE Lifescience) ; les phases mobiles A et B sont fournies par Agilent Technologies. Les plasmas sont préalablement dilués au 1/5 dans le tampon A et filtrés sur des unités 0,22 μ m (Agilent Technologies). 200 μ L de plasma ainsi dilués sont injectés.

La détection se fait par UV aux longueurs d'onde $\lambda_1 = 254$ nm et $\lambda_2 = 280$ nm, caractéristiques des protéines. L'élution est effectuée avec un débit de 0,4 ml/min : après injection, un mode isocratique 100% de A est appliqué pendant 30 minutes pour permettre l'élution des protéines non retenues de faible abondance, ensuite un autre palier à 100% de B est appliqué pendant 25 minutes afin de permettre l'élution des protéines « majoritaires », enfin un retour à 100 % de A pendant 20 minutes est effectué pour ré-équilibrer la colonne. Un fractionnement de l'éluât est effectué en sortie de colonne, permettant ainsi de collecter chaque type de protéines (« min » et « MAJ »). On réalise des fractions d'un mL. Après

déplétion, les fractions d'intérêts sont réunies puis concentrées et dessalées sur Amicon®Ultracel (Millipore) avec un seuil de coupure de 3 kDa. La concentration s'effectue par centrifugation pendant 90 minutes à 6000 g à 10°C. Typiquement, on recueille 100 µL de protéines déplétées et 150 µL de protéines majoritaires.

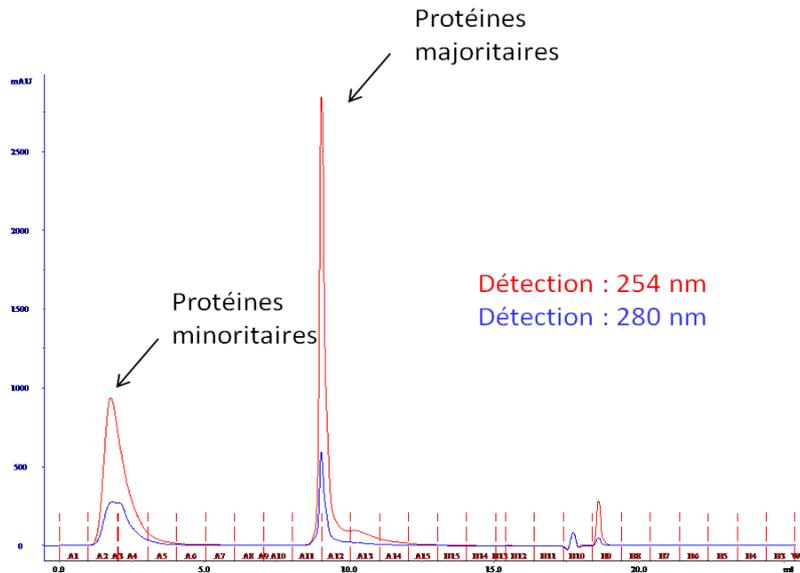


Figure 2 : Profil d'éluion au cours de la déplétion sur colonne MARS Hu-6

1.2.2 Purification du fibrinogène

1.2.2.1 Précipitation de Cohn

Cette étape de précipitation a été envisagée comme étape préliminaire avant le fractionnement chromatographique. Ainsi, 10 mL de plasma sont précipités selon la méthode de Cohn : par ajout de 8% éthanol (v/v) sous agitation. Le pH de la solution est alors ajusté à 7,2. On laisse alors cette solution incuber à -3°C pendant 18 h. Le précipité résultant est ensuite collecté par centrifugation (5000 rpm, 10 °C, 15 min). Enfin, le précipité est dissout dans 5 mL de 50mM tris-HCl, 50mM phosphate, 10mM NaCl pH 8.5.

1.2.2.2 Chromatographie d'interaction hydrophobe

La sepharose 4B a été obtenue auprès de GE Lifescience et est conservée à 4°C ; les autres réactifs ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich : acétone technique et anhydre, carbonyle diimidazole (CDI), *n*-pentylamine, hydroxyde de sodium, acide chlorhydrique, azoture de sodium, urée, tris-HCl, EGTA (acide tétra-acétique d'éthylène glycol) et chlorure de sodium.

1.2.2.2.1 Préparation de la phase Seph-C5

Le couplage de la chaîne alkyle sur la Sepharose 4B s'effectue à partir d'une amine, la *n*-pentyl amine. L'étape d'activation par le CDI doit s'effectuer dans des conditions anhydrides, ainsi le choix du solvant et sa teneur en eau est donc déterminant. L'acétone utilisée doit contenir moins de 0,1% d'eau. Dans un bécher, on pèse 25 g de Sepharose 4B définissant ainsi un volume de solution (environ 20 mL). Sur Büchner, le volume de Sepharose 4B est lavé successivement par 20 volumes d'eau, 20 volumes Eau/Acétone (technique) (3:1), puis 20 volumes Eau/Acétone (technique) (1:3), et enfin 20 volumes d'acétone « pure » (ou « sèche », ie 0.5% eau). On prolonge le séchage de la résine sous vide pendant une heure. On recueille alors 0,62 g (poudre blanche). On y ajoute alors deux volumes d'acétone « sèche » puis 1,5 g de CDI. On laisse incuber à température ambiante, sous agitation pendant 30 min. Sur Büchner, on réhydrate la sepharose ainsi activée par des lavages successifs : 20 volumes eau/acétone (1:3), 20 volumes eau/acétone (3:1), et enfin 20 volumes d'eau. On obtient alors 25 g de gel. On ajoute ensuite 2 volumes de *n*-pentylamine à 2M, pH 10,0. On laisse incuber 1h à 4°C. Pour neutraliser la solution, on effectue trois lavages successifs : 20 volumes 0.01M NaOH, 20 volumes 0.02 M HCl, et enfin 20 volumes d'eau. Le gel de Seph-C5 est alors repris dans deux volumes d'eau, on y ajoute également une pointe de spatule de NaN₃. Jusqu'à son utilisation, le gel est conservé à 4°C.

1.2.2.2.2 Remplissage de la colonne

Pour le remplissage de la colonne, on utilise un système AKTA Purifier™ (GE Lifescience), un dispositif de type POROS® SelfPack™ (Applied Biosystems) ainsi qu'une colonne en PEEK (PolyEtherEtherCétone) de dimension 4,6 mm i.d x 100 mm (Applied Biosystems), soit un volume de colonne de 1,66 mL. Un mélange Eau/EtOH (95 :5) (v/v) est utilisé comme solution de remplissage.

Dans un premier temps, on connecte la colonne métallique POROS (partie supérieure) à la colonne à remplir. On remplit ensuite la partie supérieure avec la phase SephC5. On ferme le système. On applique alors un débit de 1 ml/min pendant 15 min. La pression mesurée oscille en 16 et 18 MPa. On procède à un ajout de phase pour s'assurer que l'intégralité de la colonne soit correctement remplie. De nouveau, on applique un débit de 1 mL/min pendant 30 min avec une pression de 17,8 MPa ; après 45 min, la pression est stable.

1.2.2.2.3 Conditions chromatographiques

La chromatographie mise en place nécessite l'utilisation de quatre solutions pour la purification du fibrinogène. Sur la voie A1, la solution d'équilibration est composée de 1,5 M de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, 1mm de EGTA pH 7,4. Sur la voie A2, la concentration en NaCl est de 150 mM, le reste de la composition reste identique à la précédente solution. La voie B1 est composée à 100% d'eau ultra pure. Enfin, une solution de 7,5 M Urée est montée sur la voie B2. Toutes les phases mobiles sont filtrées sur 0,22 µm. Le tableau 1 résume le déroulement de la purification. Le plasma brut est dilué au cinquième dans le tampon A1. La prise d'essai est de 1 mL. La purification s'effectue sous un débit de 0,25 mL/min. La détection s'effectue par la mesure d'absorbance aux longueurs d'onde λ_1 et λ_2 . On suit également l'évolution de la conductimétrie. L'éluât est recueilli sous forme de fractions de 1 mL.

Tableau 1 : Déroulement de la purification du fibrinogène par HIC

volume de colonne (CV)	Phase mobile			
	A1 1,5 M NaCl	A2 150 mM NaCl	B1 eau	B2 7,5 M urée
0-9	100	0	0	0
9-12	0	100	0	0
12-15	0	0	100	0
15-20	0	0	0	100
20-25	100	0	0	0

Les fractions d'intérêt sont ensuite recueillies, éventuellement réunies et concentrées par ultracentrifugation sur des membranes de cellulose (Amicon® Ultracel 3K, Millipore).

1.2.2.3 Chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie d'échange ionique a été effectuée sur un système AKTAPurifier (GE Lifescience). L'élution est effectuée à température ambiante, et sous un débit de 0,5 mL/min. Ainsi, une colonne de 1 mL Hitrap DEAE (GE Lifescience) a été équilibrée avec un tampon composé de 50mM de tris-HCl, 50mM phosphate, 10mM de NaCl pH 8,5 pendant 2 CV. 1 mL de plasma précipité (*partie 1.2.2.1*) est injecté. La colonne est alors lavée par 5 CV. Les protéines sont ensuite éluées par un gradient de pH et de force ionique pendant 10 CV à l'aide d'un tampon composé de 500mM de tris-HCl, 500mM de phosphate, 500mM de NaCl à pH 4,2. La détection s'effectue à λ_2 . Des fractions d'un mL sont collectées. Les

fractions d'intérêt sont ensuite concentrées par ultrafiltration (Amicon YM, membrane avec un seuil de coupure de 3 kDa, Millipore) à 1 mg/mL.

Plusieurs phases chromatographiques (1 mL) ont également été testées à partir du kit *Hitrup IEX selection* (GE Lifescience). Les conditions chromatographiques sont identiques pour chaque type de colonne.

1.2.2.4 Test d'activité du fibrinogène

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer l'activité du fibrinogène. La méthode décrite ici utilise le temps de coagulation, déclenché par la thrombine, 1 μ L (soit 250 U/mL) de thrombine (Sigma Aldrich) sont ajoutés à 100 μ L de l'échantillon contenant le fibrinogène (plasma, précipité de la fraction I de Cohn ou de la fraction DEAE contenant le fibrinogène purifié). On ajoute ensuite 100 μ L de PBS (pH 7.4) additionné de 1mM Ca^{2+} . La solution est alors incubée à température ambiante. Le temps de coagulation est le temps au bout duquel se forme le caillot.

Un suivi turbidimétrique de la formation du caillot a également été réalisé par détection UV (340 nm), à l'aide du spectrophotomètre UV JASCO V530. L'échantillon (100 μ L) est dilué au dixième dans un tampon composé de 20 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 1 mM de Ca^{2+} (pH 7,6). Un volume de 1 μ L de thrombine (62,5 U/mL) est ajouté afin de déclencher la coagulation.

1.2.3 Isolement de la RBP4

1.2.3.1 Exclusion stérique

Les phases stationnaires Sephadex G25 Superfine et Sephadex G50 (GE Lifescience) ont été utilisées. Après préparation de chaque phase, nous avons rempli une colonne en PEEK de dimension 4,6 mm i.d x 100 mm (Applied Biosystems). Des solutions de sérum albumine, de β caséine, d'ovalbumine et de cytochrome c à 7,5 mg/mL filtrées sur des unités de 0,22 μ m ont été utilisées pour la calibration des colonnes. La phase mobile utilisée est une solution de bicarbonate d'ammonium 50 mM pH = 8,0. L'échantillon de plasma est préalablement dilué au 1/5^{ème} dans le tampon de phase mobile, puis filtré sur unités de 0,22 μ m. Le volume d'échantillon injecté est de 200 μ L. Le débit est de 1 mL/min. 15 fractions de 500 μ L environ sont collectées de 0 à 10 minutes après injection. Elles sont concentrées environ 10 fois sur Amicon 3 kDa (Millipore) avant d'être analysées en électrophorèse monodimensionnelle.

Pour la séparation réalisée sur une colonne HiTrap Desalting (GE Lifescience), les conditions chromatographiques sont identiques à celles précédemment décrites. Les fractions majoritaires collectées sont concentrées puis séparées sur une colonne analytique : Superdex 200 PC 3,2/30 (GE Lifescience) selon les mêmes conditions d'élution. Toutefois, le débit est fixé à 0,04 ml/min et l'on procède à un fractionnement de 120 minutes. Ces fractions sont évaporées à sec puis reprises dans 10 µL de tampon Laemmli afin de les faire migrer à travers un gel d'électrophorèse monodimensionnelle.

1.2.3.2 Précipitation séquentielle

0,164 g de sulfate d'ammonium (Sigma Aldrich) sont ajoutés à 1 ml de plasma afin de précipiter les protéines insolubles dans 30 % de sulfate d'ammonium. Le mélange est tenu sous agitation magnétique jusqu'à totale solubilisation du sulfate d'ammonium puis conservé 4 heures à + 4°C. Le surnageant est transvasé dans un autre tube et 0,181 g de sulfate d'ammonium sont ajoutés; la concentration en sulfate d'ammonium est alors de 60 %. Le mélange est solubilisé et conservé 4 heures à + 4°C. Une nouvelle centrifugation à 2000 g pendant 30 minutes permet de récupérer la RBP4 précipitée dans 60 % de sulfate d'ammonium. Ce culot est dissous dans 1 ml de tampon phosphate à 50 mM.

1.2.3.3 Immunochromatographie

L'anticorps a été obtenu auprès de la société HyTest. Il a fallu donc tout d'abord procéder au greffage de cet anticorps sur une phase Sepharose préalablement activée au NHS (GE Lifescience). On greffe sur cette phase 1 mg d'anticorps. Le gel de Sepharose NHS étant conditionné dans de l'isopropanol, le gel est tout d'abord rincé par 3 x 2 mL d'une solution de 1 mM de HCl. Il est ensuite mis en présence de 1 mL de tampon de couplage (0,2 M de Na₂CO₃ – 0,5 M de NaCl pH 8,0). On laisse alors incuber à 4°C jusqu'au lendemain. Le gel est ensuite lavé alternativement par 3 x 2 mL d'une solution de 0,5 M d'éthanolamine – 0,5 M de NaCl pH 8,3 (solution A) puis par 3 x 2 mL – 0,5 M de NaCl pH 4 (solution B) pour éliminer les anticorps non liés et désactiver les groupements restant de la Sepharose. On lave une nouvelle fois avec 3 x 2 mL de solution A, avant d'incuber à 4°C jusqu'au lendemain. Le gel est alors lavé successivement par 3 x 2 mL de solution B, 3 x 2 mL de solution A, 3 x 2 mL de solution B. Enfin, le gel est conservé dans une solution de 50 mM de NaH₂PO₄ – 0.1% de NaN₃, pH 7,0 puis stocké à 4°C avant d'être utilisé et entre chaque utilisation.

Les conditions chromatographiques sont identiques à celles employées pour la déplétion des échantillons de plasma. On injecte 200 μ L de plasma dilué au 1/5. L'éluât est recueilli sous forme de fractions de 1mL. Les fractions d'intérêt sont réunies puis concentrées par ultracentrifugation sur des membranes de cellulose (Amicon® Ultracel 3K, Millipore)

1.3 Dosage de protéines

Les différentes méthodes de dosages décrites se basent sur l'absorbance UV de complexes. Pour réaliser ces mesures d'absorbances, le spectrophotomètre UV JASCO V530 a été utilisé. Par ailleurs, les courbes d'étalonnage sont établies à partir de solutions connues de BSA.

1.3.1 Méthode de Lowry

Cette méthode combine une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret. La sensibilité de la méthode de Lowry peut atteindre 5-10 μ g ce qui en fait sa principale qualité. La mesure d'absorbance est faite à 280 nm. Le dosage protéique a été réalisé à partir du kit 2D-Quant commercialisé par GE HealthCare Lifescience (Uppsala, Suède) et en appliquant le protocole fourni avec le kit.

1.3.2 Méthode de Bradford

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie G250 après complexation avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines.

En milieu méthanolique acide, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu. La forme anionique (liée) du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximale estimé historiquement à 595 nm. Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouges et vertes, absorbant à 465-470 nm.

Dans un premier temps, on réalise la gamme étalon de concentration 0,1 à 1,4 mg/ml à partir d'une solution mère de BSA de 2 mg/mL (tableau 2). Chaque dilution est effectuée par ajout de tampon phosphate salin (PBS). Une prise d'échantillon de 50 μ L est ajoutée à 1 mL de réactif de Bradford. Après homogénéisation de la solution, on laisse incuber 15 minutes à

température ambiante (le complexe protéine/colorant est stable pendant 60 minutes). On mesure ensuite l'absorbance de chaque solution (étalon et échantillon à doser) à 595 nm.

Tableau 2 : Gamme d'étalonnage pour le dosage Bradford

Concentration	Volume BSA 2mg/mL (μ L)	Volume PBS (μ L)	volume Bradford (mL)
0	0	50	1
0,05	1,75	48,25	1
0,1	2,5	47	1
0,25	5	45	1
0,5	12,5	37,5	1
1	25	25	1
1,4	50	0	1

1.4 Dessalage des échantillons

Les échantillons peptidiques (standards protéiques, digests) sont dessalés sur des phases ZipTip C18 (Millipore). La phase est tout d'abord conditionnée dans 100 μ L d'acétonitrile, puis 100 μ L d'eau ultra pure acidifiée à 0,1% d'acide formique (v/v). Le chargement de la phase se fait par environ 30 pipetages (allers-retours) de 10 μ L d'échantillons dilués à 1 pmol/ μ L dans de l'eau ultra pure acidifiée à 0,1% d'acide formique (v/v). La phase est ensuite lavée par 10 μ L d'eau ultra pure acidifiée à 0,1% d'acide formique (10 allers-retours) pour éliminer les sels non retenus. Enfin, l'élution des peptides est réalisée par 10 μ L d'une solution acétonitrile/0,1% d'acide formique (50/50 v/v) (30 allers-retours). Les échantillons sont alors évaporés à sec et repris dans 10 μ L d'eau ultra pure acidifiée à 0,1% d'acide formique (v/v). L'acétonitrile peut être remplacé par du méthanol.

Le dessalage des solutions d' α -lactalbumine, de BSA intactes est réalisé sur ZipTip C4 (Millipore) dans des conditions similaires à celles décrites précédemment.

2 Séparation électrophorétique, révélation post-électrophorétique et analyse d'images

2.1 Gel d'électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)

Le gel de SDS-PAGE a été élaboré avec un gel de concentration à 4,7% T et un gel de séparation entre 8 et 14% T, selon les besoins de la séparation envisagée. La polymérisation est déclenchée par ajout de 250 μ L d'APS à 10% et de 12.5 μ L de TEMED.

Les protéines sont dissoutes dans un tampon dénaturant contenant 3,75 M de Tris-Base, 20% de glycérol, 4% de SDS, 3% de DTT et 0,1% de bleu de bromophénol. La quantité de protéines déposées varie entre 20 et 100 µg de protéines totales.

La migration électrophorétique a été effectuée sur des gels de dimension 11 x 13 x 0,75 cm par le système SE 600 Ruby™ (GE Lifescience) avec un tampon de migration contenant 25 mM de Tris-Base et 192 mM de glycine sous une tension de 100 V et sous une intensité de 30 mA par gel. Le système est maintenu à 20°C pendant toute la durée de la séparation. La migration est arrêtée lorsque le front de migration s'apprête à sortir du gel.

Pour un suivi rapide de purification, l'électrophorèse monodimensionnelle est réalisée sur des gels plus petits, de dimension 10 x 10,5 x 0,75 cm sur un système SE 260 (GE Lifescience). Dans ce cas, la quantité de protéines déposée varie entre 2 et 10 µg de protéines totales. La migration électrophorétique est réalisée alors sous une tension de 100 V et sous intensité de 20 mA par gel. La migration est arrêtée lorsque le front de migration s'apprête à sortir du gel.

2.2 Gel d'électrophorèse bidimensionnelle

300 µg de protéines sont utilisés pour les gels d'électrophorèse analytiques. Les échantillons protéiques avant isofocalisation sont repris dans un tampon d'isoélectrofocalisation (*tampon de chargement* : 36% Urée, 15% Thiourée, 4% CHAPS, 1% DTT, 0.48% Tris-Base, 0.2% bleu de bromophénol) pour un volume final de 200 µL, puis repris dans 200 µL de tampon de resolubilisation (*tampon de réhydratation* : 36% Urée, 15% Thiourée, 2% CHAPS, 0.15% DTT, 5 mL Pharmalyte™ 40% (GE Lifescience), 0.2% bleu de bromophénol), pour un volume final de 400 µl.

Le mélange protéique est appliqué contre la bandelette d'isoélectrofocalisation (IPG strip 180 mm, pH 4-7, Immobiline™DryStrip, GE Healthcare) afin que le gel se réhydrate passivement au contact de la solution protéique. Après réabsorption de la totalité de l'échantillon, l'isoélectrofocalisation est réalisée par application d'une tension croissante selon le gradient de voltage suivant : 50 V pendant 9 h puis 200 V pendant 1 h, 1000 V pendant 1 h, un gradient atteignant 8000 V en 13 h puis un plateau final de 4h30. Pendant toute la durée de l'isoélectrofocalisation, l'intensité de chaque bandelette est limitée à 50 µA, et la température maintenue à 20°C.

Avant la deuxième dimension d'électrophorèse, les bandelettes sont successivement baignées (2 bains de 45 minutes) dans un tampon de réduction contenant du Tris (Tris-HCl

37,5 mM, pH 8,8), de l'urée (6M), du SDS (2%), du glycérol (30% v/v) et du DTT (2%) puis un tampon d'alkylation contenant de l'iodoacétamide (2%) à la place du DTT. Les bandelettes d'isoélectrofocalisation équilibrées sont ensuite transférées sur les gels SDS-PAGE (10% en acrylamide, gel de 25,5 x 20,5 x 0,1 cm). La deuxième dimension d'électrophorèse est menée sur un système Ettan™DALTsix (GE Healthcare) à une intensité fixe de 30 mA par gel ; le système est maintenu à 20°C pendant toute la durée de la séparation. La migration, réalisée dans un tampon de migration composé de 25 mM de tris base et 192 mM de glycine, est arrêtée lorsque le front de migration s'apprête à sortir du gel.

2.3 Coloration post-électrophorétique

Après migration, les gels sont tout d'abord placés dans un bain de fixation (7% d'acide acétique, 10% d'éthanol) pendant 2x15 min sous légère agitation. Ensuite, ils sont placés dans un bain de coloration (14% d'acide acétique, 25% d'éthanol et 0.5 mg/L de complexe Ru(BPS)₃ pendant une nuit à l'abri de la lumière. Le lendemain, les gels sont lavés pendant 30 min dans une solution contenant 14% d'acide acétique et 25% d'éthanol, puis rincés dans de l'eau ultra pure pendant 2 x 20 min.

2.4 Analyse d'image des gels d'électrophorèse

Les gels sont numérisés à une résolution de 100 dpi avec un scanner Typhoon®9400 (GE Lifescience). L'acquisition d'images se fait à 550 V par le laser bleu 2 ($\lambda_{\text{excitation}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{émission}} = 610$ nm BP 30 nm). Les images sont enregistrées en format .gel par le logiciel ImageQuant (GE Healthcare) afin de générer les images en format .tif pour être retraitées. Le logiciel SameSpots (Nonlinear Dynamics) est également utilisé pour comparer et établir des listes de spots à découper.

3 Hydrolyse enzymatique

3.1 Hydrolyse enzymatique d'un échantillon protéique : digestion en solution

Nous avons décidé d'utiliser la trypsine pour réaliser l'hydrolyse enzymatique des protéines à caractériser. L'échantillon protéique est préparé à une concentration de 1µg/µL.

5 µg de protéine sont dilués au dixième dans un tampon de dénaturation contenant 50 mM de Tris-HCl, 4 mM de DTT et 60% TFE (v/v), puis mis à chauffer à 70°C pendant 2 h. L'alkylation des groupements sulfhydryles est réalisée à l'aide d'iodoacétamide 5 mM pendant

1 h à température ambiante à l'abri de la lumière. L'échantillon est ensuite dilué une nouvelle fois au dixième dans un tampon de bicarbonate d'ammonium à 50 mM, pH 8,8. Enfin, les protéines ainsi préparées à la digestion sont mise en contact avec la trypsine (Proméga) selon un rapport enzyme/protéine fixé à 1/50. L'échantillon est alors incubé à 37°C sur la nuit. Le lendemain, après évaporation à sec, les peptides sont repris dans 10 µL d'une solution d'eau ultra pure acidifiée à 0,1% d'acide formique (v/v).

3.2 Hydrolyse enzymatique de protéines séparées sur gel d'électrophorèse

Afin de procéder à l'identification des protéines séparées par électrophorèse mono- et bidimensionnelle, les bandes ou les spots d'intérêts sont découpés. Les bandes sont excisées manuellement alors que la découpe des spots est assistée par un automate (Ettan SpotPicker, Amersham Biosciences).

Les bandes d'intérêts sont donc découpées, lavées trois fois à l'eau ultra pure et décolorées trois fois avec un mélange acétonitrile/bicarbonate d'ammonium 50 mM (50/50 v/v) pendant 20 min par bain. Les bandes de gel sont déshydratées avec de l'acétonitrile par trois lavages de 10 min. Elles sont ensuite réhydratées et digérées avec la solution de digestion tryptique (20 µg d'enzyme dans 1 mL de bicarbonate d'ammonium 50 mM, pH 8,8) pendant 30 min dans la glace, pour limiter l'autolyse de la trypsine. Les bandes de gel sont alors mises à 37°C pendant 18 h dans environ 50 µL de bicarbonate d'ammonium 50 mM, pH 8,8. Les digests sont évaporés à sec et repris dans un volume de 5 µL d'acide formique 0,1% avant analyse par spectrométrie de masse.

Le traitement de spots excisés diffère légèrement de celui des bandes de gel, d'autant qu'il est réalisé par un robot EttanDigester (Amersham Biosciences). La liste des spots à exciser est éditée par le logiciel SameSpots (NonLinear Dynamics). Après excision, plusieurs cycles de lavages sont effectués : trois bains de 30 min avec une solution de 50/50 50 mM bicarbonate d'ammonium/méthanol (v/v) suivis d'un lavage de 20 min à l'aide d'une solution de 70% acétonitrile, et enfin deux lavages de 20 min dans une solution de 70/30 50 mM Bicarbonate d'ammonium/acétonitrile (v/v). On ajoute ensuite 40 µL d'enzyme, la trypsine, à une concentration de 0,15 µg/µL dans une solution contenant 20 mM bicarbonate d'ammonium à pH 8,8. La digestion se déroule à température ambiante, jusqu'au lendemain. Après évaporation à sec, les échantillons sont repris dans 5 µL d'acide formique 0,1% avant analyse par spectrométrie de masse.

4 Analyse par spectrométrie de masse

4.1 Analyse par MALDI-TOF MS

Les analyses MALDI-TOF MS ont été réalisées sur un Voyager DE STR développé par la firme Applied Biosystems. Equipé d'un laser d'azote (337 nm), d'un analyseur à temps de vol long (longueur de 3 m en mode réflectron) et d'une source à extraction retardée, ce spectromètre se caractérise par une grande précision de mesure (5 ppm à la masse 1500) et une résolution importante (jusqu'à 17 à 20000 de résolution sur les peptides de la fenêtre de masse 500-2500 Da).

Afin d'identifier les protéines hydrolysées, les peptides générés sont analysés par MALDI-TOF MS. Ainsi, 1 µL de solution peptidique (dont la concentration peut varier entre 0,5 et 10 pmol/µL) est mélangé à 1 µL de matrice (Acide dihydroxybenzoïque (DHB) à 10 mg/mL dans un mélange eau/méthanol (50/50 v/v). Déposé sur une cible MALDI, l'ensemble est mis à sécher à température ambiante sous flux d'air (« Dried droplet method »). Après cristallisation, la plaque est insérée dans le spectromètre de masse. L'extraction retardée est fixée à 200 nsec. Tous les spectres sont acquis en mode d'ionisation positif et en mode réflectron à 20000 V de tension d'accélération et 66% de potentiel de grille primaire. Ces paramètres peuvent être modifiés selon les besoins de l'analyse.

Typiquement pour chaque digest, 200 tirs laser sont accumulés. Le retraitement et l'interprétation des spectres MS et MS/MS sont effectués avec le logiciel DataExplorer (Applied Biosystems). Les spectres obtenus sont calibrés en interne en utilisant les pics d'autodigestion de la trypsine (soient les signaux $[M+H]^+$ de m/z 842,5100, 1045,5642 et 2211,1046).

4.2 Analyse par MALDI –TOF/TOF MS

Les analyses MALDI-TOF/TOF ont été réalisées sur un ABI 4800 développé également par la société Applied Biosystems équipé d'un laser Nd-YAG (355 nm).

La matrice est l'HCCA préparée à 7 mg/mL (à saturation) dans un mélange contenant 75% d'acétonitrile, 25% d'eau ultra pure et 0,1% de TFA (v/v). L'échantillon et la matrice sont mélangés dans un rapport 1:1. 1 µL du mélange est ensuite déposé sur la cible MALDI par séchage à l'air et à température ambiante (« Dried droplet method »). Après cristallisation, la cible est insérée dans l'instrument.

Les analyses de peptides/protéines intactes sont réalisées en mode réflectron positif. Pour l'acquisition MS, 500 tirs laser sont réalisés pour obtenir un spectre MS. La tension d'accélération dans la source est de 20 kV, et la tension du grid est de 16 kV. Pour l'acquisition MS/MS, la fragmentation s'effectue en mode CID, en présence soit d'air, soit d'argon dans la cellule de collision. L'intensité du laser peut varier entre 3800 à 4200. 1000 tirs laser sont réalisés pour obtenir un spectre MS/MS. La tension d'accélération dans la source 1 est de 8 kV, et la tension appliquée sur le grid et dans la cellule de collision sont respectivement de 7,3 et 7,0 kV.

Le retraitement et l'interprétation des spectres MS et MS/MS sont effectués avec le logiciel DataExplorer (Applied Biosystems). Les spectres obtenus sont calibrés en interne en utilisant les pics d'autodigestion de la trypsine (soient les signaux $[M+H]^+$ de m/z 842,5100, 1045,5642 et 2211,1046).

4.3 Analyse par couplage nanoLC-nanoESI – MS/MS

4.3.1 NanoLC

La séparation des digests protéiques avant analyse par nanoESI-FT-ICR-MS ou nanoESI-Qq-TOF MS a été réalisée sur une chaîne nanoLC fournie par Dionex LC Packings. Elle se compose d'un passeur automatique d'échantillon *Famos* avec une plaque réfrigérée, d'une pompe *Switchos* et d'une pompe quaternaire *Ultimate*. Deux modes d'injections peuvent être utilisés avec une boucle de 10 μ L. Le mode « *full loop* » permet d'injecter 10 μ L d'échantillon, tandis que le mode « *pick up* » ne prélève qu'1 μ L d'échantillon (le volume de la boucle est alors complété par la phase mobile A, contenant un mélange d'eau acidifiée à 0,1% acide formique/acétonitrile (95/5 v/v)). Ces deux modes permettent de jouer sur la quantité d'échantillon injectée en fonction de leur concentration. L'échantillon est dans un premier temps dessalé et concentré en le fixant sur une précolonne de type C18 (Acclaim® PepMap™ 300 μ m i.d. x 5 mm, Dionex LC Packings) pendant 3 minutes à un débit de 10 μ L/min. La séparation est ensuite réalisée sur une colonne analytique de type C18 (Acclaim® PepMapA100™ C18, 3 μ m, 75 μ m i.d. x 15 cm, de taille de pores de 100 Å, Dionex LC Packings) ; l'élution est effectuée à un débit de 170 μ L/min avec la phase A et une phase organique B composée d'un mélange eau acidifiée à 0,1% acide formique/acétonitrile (25/75 v/v). La durée du gradient utilisé varie selon le couplage envisagé. Un gradient de deux heures est effectué pour toutes analyses en couplage nanoLC-nanoESI-Qq-TOF MS/MS tandis qu'un gradient de trois heures est préféré pour l'analyse en couplage nanoLC-nanoESI

Qh-FT-ICR MS/MS afin de tirer pleinement partie des performances de l'instrument, en particulier sa haute résolution.

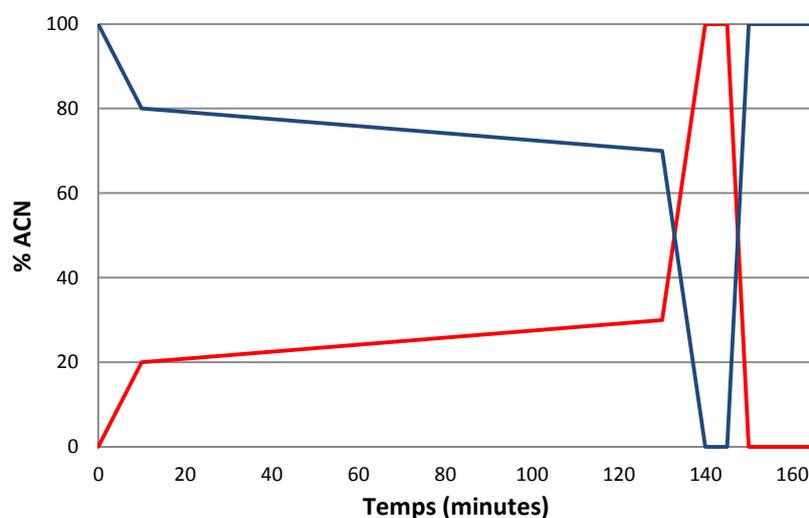


Figure 3 : Gradient utilisé pour la séparation chromatographique des protéines par nanoLC (phase aqueuse A : 94,9% eau milliQ, 5% acétonitrile, 0,1% acide formique ; phase organique B : 24,9% eau, 75% acétonitrile, 0,1% acide formique).

4.3.2 Analyse par nanoLC-nanoESI-Qq-TOF MS/MS

Le spectromètre de masse hybride Q-TOF de type Q-STAR Pulsar I (Applied Biosystems) a été utilisé pour les analyses de séquences peptidiques. La résolution isotopique (9000 de résolution à $m/z = 800$) de l'appareil et sa précision de mesure (précision de 5 ppm en calibration interne et 20 ppm en calibration externe sur une gamme de m/z entre 150 et 900) autant en mode MS qu'en mode MS/MS en fait un outil de choix pour l'analyse d'échantillons peu concentrés et fortement dénaturés.

Les analyses ont été menées à des valeurs de DP (Declustering Potential) de 20 et de FP (Focusing Potential) de 60. La tension appliquée à l'aiguille oscille autour de 1,8 kV en fonction de la qualité de l'aiguille de nébulisation. Le spectromètre de masse Q-STAR est utilisé en mode « *enhance* » pour la transmission pulsée des ions parents et fragments dans l'analyseur à temps de vol. Le séquençage est effectué en mode automatique (mode IDA) sous le contrôle du logiciel d'acquisition qui réalise tout d'abord un spectre complet, sélectionne automatiquement les ions multichargés à analyser, puis enregistre le spectre de fragmentation. Le temps total d'un cycle de balayage est de 4 s dans la fenêtre de masse considérée (m/z 300-2000 pour la MS, et m/z 50-2000 pour la MS/MS). L'énergie de collision appliquée aux précurseurs est automatiquement sélectionnée en fonction de son état de charge et sa masse relative m/z .

4.3.3 Analyse par nanoLC-nanoESI Qh-FT-ICR

Les analyses à haute résolution ont été réalisées sur un spectromètre de masse à transformée de Fourier possédant un aimant de 9,4 T, équipé d'une source nanoelectrospray : l'ApexQe (Bruker Daltonics) (figure 4). Les analyses sont effectuées en mode d'ionisation positif. Les aiguilles nano-électrospray ont été obtenues auprès de New Objective ; elles sont recouvertes d'un alliage conducteur et ont les dimensions suivantes : 360 μm e.d., 20 μm i.d., 10 μm i.d.. Une tension de 1,8 kV est appliquée pour la formation du spray. La température du capillaire est fixée à 180°C.

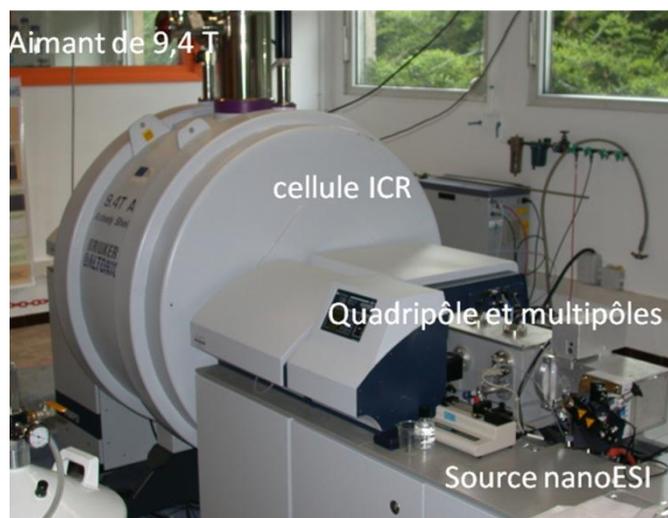


Figure 4 : Le spectromètre de masse nanoESI-FT-ICR : ApexQe (9,4 T)

L'accumulation des ions dans la cellule de collision en mode MS/MS se fait sur une durée de 2 s. La méthode d'acquisition consiste en un full scan MS entre m/z 288-2500 en mode large bande avec 512 k points de données. La figure 5 illustre les conditions d'acquisition MS et MS/MS pour l'analyse d'échantillons peptidiques. La durée d'un cycle complet MS et MS/MS est d'environ 6 s.

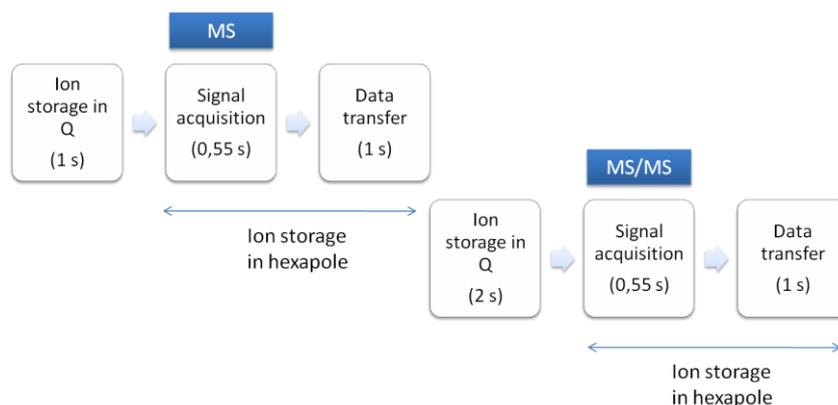


Figure 5 : Acquisition MS et MS/MS pour l'analyse nanoLC-nanoESI-FT-ICT.

L'interrogation des banques pour l'identification des protéines sur la base des empreintes peptidiques est rendue possible grâce à l'extraction de pics effectuée par le logiciel Automation (Bruker Daltonics), en générant des fichiers au format .mgf.

5 Identification des protéines

L'identification protéique est réalisée par un programme publiquement disponible sur internet (MASCOT : <http://www.matrixscience.com>).

5.1 Identification protéique par les empreintes peptidiques des protéines

Les spectres MALDI-TOF MS (Voyager DE STR ou Voyager 4800) sont retraités avec le logiciel DataExplorer (Applied Biosystems). Ainsi, une calibration interne est effectuée sur les pics d'autolyse de la trypsine, les pics mono-isotopiques des massifs peptidiques sont isolés (« de-isotoping ») et utilisés pour l'analyse.

L'identification protéique sur la base des empreintes peptidiques ainsi générées est effectuée en utilisant les algorithmes de recherche MASCOT) par interrogation des banques protéiques SwissProt ou des banques de données réduites, selon l'étude envisagée.

Les paramètres d'interrogation sont les suivants : espèce (Human), jusqu'à 3 sites de clivage manqués par l'enzyme ; erreur de mesure de masse fixée à 50 ppm. Les modifications chimiques affectant les peptides comme l'oxydation des méthionines et la carbamidométhylation des cystéines sont prises en compte pour l'identification. D'autres modifications variables peuvent être incluses suivant les travaux. Les critères d'acceptation ou de rejet d'une identification protéique sont établis de la façon suivante : une couverture de séquence protéique satisfaisante, un minimum de quatre peptides pour valider l'identification, une probabilité minimum de 30 pour le « mowse score » (MASCOT), une précision de mesure et un écart de masse acceptable. La taxonomie est par ailleurs prise en compte (Human) obligatoirement dans les premiers candidats à l'identification quand la recherche est menée sans aucun filtre d'espèce.

5.2 Identification protéique par données MS/MS

Les logiciels de retraitement des données issues de l'acquisition des spectres MS/MS dépendent de l'instrument utilisé : DataAnalysis version 3.2 pour les analyses FT-MS (Bruker Daltonics), DataExplorer pour les analyses TOF/TOF MS/MS (Applied Biosystems), et enfin Analyst pour les analyses Q-TOF MS/MS (Applied Biosystems). De plus, les spectres issus

d'analyses FT-MS correspondants aux digests protéiques ont été traités par le logiciel Automation (Bruker Daltonics) afin de générer les pics mono-isotopiques et pouvoir procéder à l'interrogation des banques de données. Les fichiers destinés aux interrogations des banques de données sont au format .mgf.

Les paramètres d'interrogation sont les suivants : espèce (Human), jusqu'à 3 sites de clivage manqués par l'enzyme ; erreur de mesure de masse (MS et MS/MS) fixée à 50 ppm pour les spectres issus de Q-TOF MS et MALDI-TOF-TOF MS, et 5 ppm pour les analyses issues de FT-MS. Les modifications chimiques affectant les peptides comme l'oxydation des méthionines et la carbamidométhylation des cystéines sont prises en compte pour l'identification. D'autres modifications variables peuvent être incluses suivant les travaux. Les critères d'acceptation ou de rejet d'une identification protéique sont établis de la façon suivante : une couverture de séquence protéique satisfaisante, un minimum de deux peptides pour valider l'identification, une probabilité minimum de 50 pour le score protéique et de 20 pour le score peptidique (MASCOT), une précision de mesure et un écart de masse acceptable. La taxonomie est par ailleurs prise en compte (Human) obligatoirement dans les premiers candidats à l'identification quand la recherche est menée sans aucun filtre d'espèce.

6 Quantification AQUA

Nous avons utilisé des HeavyPeptides AQUA QuantPro de chez ThermoFisher Scientific. Ils sont commercialisés à une concentration de 5 pmol/ μ L dans 5% v/v d'acétonitrile/eau. La précision de cette concentration est de $\pm 25\%$, ce qui est acceptable pour la mise en place de notre méthode. L'analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR d'1 μ L d'une gamme de concentrations de 30 à 500 fmol/ μ L d'un mélange équimolaire des 3 peptides AQUA a permis l'établissement d'une courbe étalon. Le retraitement des données se fait par le logiciel Data Analysis version 3.4 (Bruker Daltonics) pour l'enregistrement des intensités des pics et Mascot Distiller version 2.3.2.0 (Matrix Science) pour le retraitement de leurs aires.

Pour l'étape de quantification, 5 μ L de plasma brut dilué ou 5 μ L de plasma déplété ont été digérés en solution. Ils sont repris dans un volume final de 10 μ L de tampon phase A auquel est ajouté 1 μ L d'un mélange des 3 peptides AQUA à une concentration équimolaire de 50 fmol/ μ L. 1 μ L de ces solutions est analysé en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. Les valeurs des aires sous les pics et des intensités des peptides natifs de la RBP4 identifiés sont relevées grâce à l'utilisation des logiciels Data Analysis v3.4 et Mascot Distiller v2.3.2.0.

Elles sont ensuite reportées sur le graphique établi à partir de la gamme étalon afin de déterminer les concentrations plasmatiques de RBP4.

Bien que la protéomique ait été largement appliquée pour l'étude du plasma humain, son application dans le domaine de la transfusion sanguine reste peu employée. En collaboration avec l'EFS, l'objectif de cette thèse est de proposer des outils analytiques destinés à évaluer l'impact des traitements d'inactivation des agents pathogènes et des conditions de stockage sur les protéines plasmatiques.

Le traitement au bleu de méthylène est le traitement d'inactivation virale le plus utilisé en France. Une approche globale et ciblée se sont intéressées aux modifications induites par ce traitement photochimique. Plusieurs modifications, notamment sur les sous-unités du fibrinogène, ont pu être identifiées, après analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS. L'origine de la diminution d'activité du fibrinogène a pu ainsi être expliquée.

Une étude de dégradation thermique du plasma a permis d'identifier un nouveau marqueur de dégradation plasmatique: la RBP4. Dans le plasma, elle forme un complexe avec la transthyréline. Lors de la dégradation du plasma, ce complexe se dissocie. Une méthode de quantification absolue, basée sur des peptides AQUA, a été développée, permettant de doser la RBP4 dans le plasma. Par ailleurs, une méthode de purification permettant d'isoler spécifiquement la forme libre de la RBP4 a été développée, ouvrant ainsi la possibilité de suivre le relargage et de doser la RBP4 au cours de la dégradation plasmatique. Enfin, nous avons montré que la dissociation du complexe intervenait 12h après plasmaphérèse.

Enfin, deux matrices innovantes pour l'électrophorèse sur gel ont été évaluées pour la séparation de protéines plasmatiques. L'une incorpore un polymère préformé, le dextran, à une solution d'acrylamide classique. L'autre fait appel à un monomère hydrophile, le NAT. Les performances dépassent celles de solutions commerciales. En effet, toutes deux présentent de bonnes propriétés optiques et mécaniques, augmentent significativement la résolution des spots protéiques et facilitent l'identification des protéines par MS.

Mots clé : analyse protéomique, plasma, médecine transfusionnelle, traitement d'inactivation, spectrométrie de masse

While Proteomics has been widely applied to study plasmatic proteins, its application to the field of transfusion medicine is quite recent. In partnership with the French blood agency (EFS), the main objective of this Ph.D work was to provide analytical tools to evaluate the impact of pathogen inactivation treatments and storage conditions on plasmatic proteins.

Photochemical treatment using methylene-blue is the most used treatment for pathogen inactivation in France. Both global and targeted studies were carried out to determine the protein modifications involved in this treatment. Based on nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR MS analyses, several modifications were identified, especially targeting the sub-unit of fibrinogen. This allows the decrease in fibrinogen clottability to be explained after methylene-blue treatment.

A study of thermal degradation on plasma sample showed a new marker of plasma degradation: RBP4. This protein circulates associated to transthyretin as a macromolecular complex: during degradation, this complex dissociates, releasing RBP4 in plasma. An absolute quantification method was developed using AQUA peptides to assay the amount of RBP4 in plasma sample. Furthermore, a purification method was developed to specifically target the free form of RBP4, which allows the amount of free RBP4 released to be quantified during plasma degradation. We also proved that the complex dissociation occurred after 12h following plasmapheresis.

Two innovative matrices for gel electrophoresis were developed and evaluated for plasma protein separation. One of them relies on the use of a preformed polymer incorporated prior to acrylamide polymerization. The other one is based on a hydroxylated acrylamide monomer, N-acryol-tris(hydroxymethyl)-amino methane. Both exhibited interesting optical and mechanical properties, enhanced spot resolution and outstanding protein/peptide recovery, which facilitates protein identification by MS.

Keywords: proteomics, plasma, transfusion medicine, inactivation treatment, mass spectrometry