

Application à l'étude de l'état redox des cystéines

Les résultats de la comparaison de la méthode FASP à la précipitation acide (TCA) (chapitre 5) pour l'application du protocole OcSILAC ont montré que la méthode FASP n'induisait pas d'avantage d'oxydation durant le protocole de traitement. Ces observations ont motivé le choix de concevoir un dispositif microfluidique destiné à la miniaturisation du protocole OcSILAC. Le *ChipFilter* a donc été conçu, testé et utilisé pour le traitement d'une protéine standard et ensuite d'un échantillon complexe. Une sensibilité satisfaisante a été constatée avec l'analyse de la BSA. Ensuite, l'analyse d'extrait protéique de cellules de levure a montré une bonne couverture du protéome. L'échantillon d'extrait protéique de levure a ensuite été utilisé pour tester la miniaturisation du traitement de l'échantillon dans le *ChipFilter*.

Dans ce chapitre sont présentés les résultats de la comparaison du protocole OcSILAC effectué dans le *ChipFilter* par rapport à la méthode classique caractérisée par la précipitation acide (TCA) et dont la miniaturisation était l'objectif principal de cette thèse. Malgré la sensibilité du *ChipFilter*, une quantité d'échantillon de 100 µg a été choisie. Ce choix est motivé par le besoin de se mettre un peu au niveau de la sensibilité de la méthode classique afin de pouvoir comparer la couverture du protéome et une éventuelle oxydation artéfactuelle. Ce chapitre comprend aussi la description du couplage du *ChipFilter* pour l'amélioration de la sensibilité et de la reproductibilité.

7.1 Miniaturisation du traitement de l'échantillon pour l'étude redox

7.1.1. Contrôle de l'oxydation en conditions acides

L'étude des PTMs de la cystéine est une analyse complexe du fait de la grande réactivité des thiols et du caractère labile de ces modifications qui peuvent être affectées durant la préparation de l'échantillon. L'acide trichloroacétique (TCA) est en général utilisé pour passer en conditions acides et bloquer la réactivité des thiols durant l'extraction des protéines ou l'élimination d'un réactif en excès. Mais la protéolyse pour générer les peptides en *bottom-up* nécessite de neutraliser l'échantillon. L'élimination du TCA passe d'abord par une précipitation des protéines suivi d'un rinçage avec de l'acétone froid. Ensuite l'évaporation de l'acétone permet de reprendre les protéines avec un tampon approprié permettant le blocage définitif des thiols. C'est une approche très utilisée malgré les risques de modification artéfactuelle. L'utilisation du *ChipFilter* pour des applications en rédoxomique est intéressante dans le sens où le rinçage de réactifs en excès peut se faire rapidement dans des conditions réduisant le risque de modifications artéfactuelles.

7.1.2. Comparaison avec le protocole de quantification redox OcSILAC

Comme indiqué au début de ce manuscrit, le protocole mis en œuvre pour la quantification relative de l'état redox des cystéines implique de nombreuses étapes avec un faible rendement et ce notamment à cause des lavages/précipitations multiples du protocole OcSILAC classique. Il est donc très intéressant de le transférer dans le *ChipFilter* afin d'éliminer ces étapes coûteuses en échantillon. Ce transfert se fait à travers une petite modification du protocole de traitement sur puce présentée au Tableau 7. La modification consiste en l'intégration de l'étape de marquage des cystéines oxydées avec la biotine. Le protocole appliqué pour cette comparaison est présenté au Tableau 9.

Tableau 9 : Protocole de traitement sur puce pour l'étude redox

Etapes	Description	Débit (D) et Volume (V)
1) Chargement de l'échantillon	Solution d'extrait protéique solubilisé dans un tampon de lyse	D = 2 μ L/min, V : en fonction de la quantité de matériel à traiter
2) Blocage des cystéines réduites	Solution d'IAM 50 mM dans un tampon ABC 50 mM	i) 2 μ L/min, V=60 μ L, rinçage rapide ii) 1 μ L/min, V = 30 μ L réaction
3) Réduction des ponts disulfure et des cystéines oxydées	Solution de DTT 20 mM dans un tampon ABC 50 mM	i) 2 μ L/min, V=60 μ L, rinçage rapide ii) 1 μ /min, V=30 μ L, réaction
4) Marquage des cystéines nouvellement réduites avec la biotine HPDP	Solution d'IAM 50 mM dans un tampon ABC 50 mM	i) 2 μ L/min, V=60 μ L, rinçage rapide ii) 1 μ L/min, V= 30 μ L, réaction
5) Rinçage d'excès de biotine	Tampon d'ABC 50 mM rinçage des réactifs en excès pour préparer la digestion	2 μ L/min, V = 60 μ L pour atteindre les conditions optimales de digestion
6) Digestion	Solution de trypsine 0,1 μ g/ μ L dans tampon ABC 50 mM	i) D = 2 μ L/min, pour charger la trypsine ii) 0,4 μ L/min, V =24 μ L soit une heure, durée de la digestion
7) Elution	Solution d'ABC 50 mM	D = 2 μ L/min, V = 70 μ L

La dernière étape du protocole OcSILAC ne peut être réalisée sur le *ChipFilter* car ce dernier n'est pas équipé pour la rétention spécifique des peptides marqués avec la biotine. Après l'étape d'élution, les peptides récoltés vont faire l'objet d'un fractionnement sur une colonne de streptavidine dans les mêmes conditions que dans le protocole OcSILAC classique.

Pour comparer la préparation d'échantillon dans le *ChipFilter* et le protocole OcSILAC classique, 100 μ g d'extrait protéique de cellule de levure ont été traités par *ChipFilter* et autant par le protocole OcSILAC classique caractérisé par la précipitation acide. D'un côté, toutes les étapes de préparation des protéines et leur digestion ont été effectuées sur puce. La précipitation acide des protéines n'est plus nécessaire pour éliminer les réactifs

en excès car ces molécules passent facilement à travers la membrane. Pour le protocole OcSILAC classique, les protéines sont précipitées à la fin de chaque réaction pour éliminer les réactifs en excès. Les peptides générés sont passés sur une colonne de streptavidine dans le but d'enrichir sélectivement les peptides portant une cystéine biotinylée. Dans les 2 cas, cet enrichissement est effectué dans les mêmes conditions. Les fractions enrichies (contenant les peptides initialement oxydés et biotinylés) et non enrichies (les autres peptides) ont été analysées séparément. Une quantification sans marquage (*LabelFree*) a ensuite été effectuée séparément dans les fractions enrichie et non enrichie pour comparer le nombre de peptides identifiés ainsi que leur intensité.

Dans le protocole OcSILAC classique comparant 2 conditions de culture cellulaire, la quantification de la fraction enrichie permet de déterminer, en se basant sur le nombre de peptides identifiés et le rapport des intensités (version lourd/léger du même peptide), dans quelles conditions l'oxydation des cystéines a été plus importante. Dans le cadre de cette comparaison, c'est le même échantillon qui est traité de 2 manières différentes. La quantification *Label Free* de la fraction enrichie permettra donc de comparer l'importance de l'oxydation des cystéines survenue durant le traitement. L'identification a été réalisée avec le logiciel Maxquant et la quantification relative *Label Free* avec le logiciel ProteomeDiscoverer.

7.1.3 Réduction du temps de traitement de l'échantillon

La Figure 39 présente la durée de chaque étape du protocole OcSILAC réalisé par le dispositif *ChipFilter* et en solution avec la précipitation TCA pour un échantillon. La réduction du temps de traitement est considérable, le *ChipFilter* offre la possibilité de réaliser le même protocole en 8 à 10 fois moins de temps.

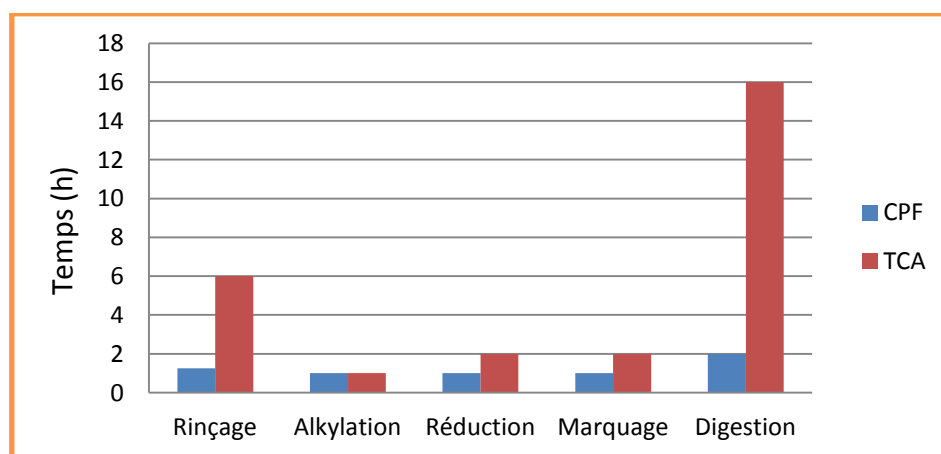


Figure 39 : Comparaison de la durée des différentes étapes de préparation d'échantillon par *ChipFilter* (CPF) et par précipitation acide (TCA)
Nature et quantité d'échantillon

7.1.4 Identification et quantification

Pour résumer, la même quantité d'échantillon a été traitée dans le *ChipFilter* et par le protocole OcSILAC classique (TCA) dans le but de comparer les 2 approches pour la quantification redox. Le *ChipFilter* a permis de miniaturiser toutes les étapes du protocole

OcSILAC sauf le fractionnement qui est effectué dans les mêmes conditions que le protocole classique. Les fractions issues de chaque approche sont analysées séparément. Nous allons donc avoir, pour chacune des 2 approches que nous comparons, une fraction enrichie ou *Bound* et une fraction non enrichie ou *UnBound*. La fraction enrichie contient principalement les peptides contenant une cystéine marquée par la biotine clivable et soluble dans l'eau (donc cystéine oxydée). Ces peptides ont été retenues spécifiquement sur la colonne de streptavidine d'où le nom (*Bound*, lié). La fraction non enrichie correspond à la partie de l'échantillon qui n'a pas été retenue par la colonne de streptavidine et qui contient donc tous les autres peptides. Les résultats de cette comparaison basée sur les peptides et protéines identifiés dans ces fractions ainsi que leurs intensités sont présentés dans cette partie.

Le premier point de comparaison concerne la couverture du protéome avec le nombre de protéines et de peptides identifiées. Le tableau 10 montre le nombre de peptides et de protéines identifiés dans les fractions enrichies (*Bound*) et non enrichie (*Unbound*). On observe que dans la fraction enrichie, le nombre de protéines et de peptides identifiés est plus élevé pour l'approche classique (TCA_en_solution) que pour la digestion sur puce (*ChipFilter*). C'est le contraire qui est observé dans la fraction non enrichie.

Tableau 10 : Nombre de protéines et peptides identifiés par les approches de traitement sur puce et classiques

	<i>ChipFilter</i>			TCA_en_solution		
	Protéines	Peptides	Peptides avec C	Protéines	Peptides	Peptides avec C
Bound	1018	3616	1644	1220	3544	2819
UnBound	2012	15190	1150	1440	10782	867

Un diagramme de Venn a été réalisé afin de comparer, au sein de chaque approche, les protéines identifiées dans les fractions enrichies et non enrichies (Figure 40). Pour le traitement dans le *ChipFilter* (CFP), la majorité des protéines identifiées dans la fraction enrichie le sont aussi dans la fraction non enrichie. Seules 101 protéines sont exclusivement identifiées dans la fraction enrichie. Pour l'approche classique, 367 protéines sont exclusivement identifiées dans la fraction enrichie.

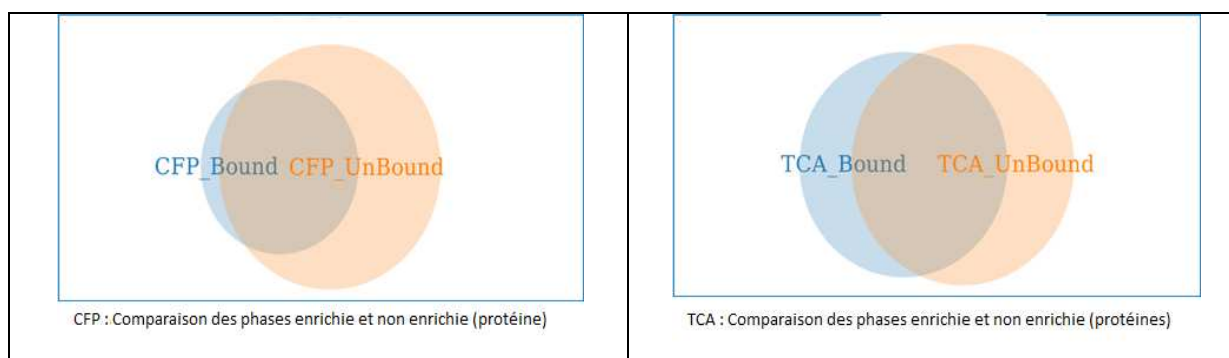


Figure 40 : Diagramme de Venn des protéines identifiées dans les fractions enrichies (Bound) et non enrichies (UnBound) du traitement sur puce à gauche (Chip) et classique (TCA) droite 100 µg d'extrait protéique de cellules de levure

On observe qu'un total de 2113 protéines ont été identifiées par le traitement sur puce et 1767 par l'approche classique. Quand on compare l'ensemble des protéines identifiées (Enrichie+NonEnrichie) dans chaque approche, 205 protéines sont exclusivement identifiées avec l'approche classique et 551 sont exclusives au traitement sur puce (Figure 41). Le traitement sur puce offre donc une meilleure couverture du protéome.

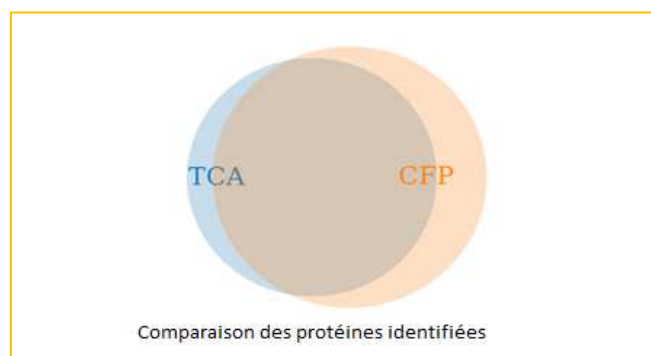


Figure 41 : Comparaison des protéines identifiées dans les fractions enrichie et non enrichie avec les approches classique (TCA) et traitement sur puce (CFP)
100 µg d'extrait protéique de cellules de levure

En ce qui concerne les peptides, on s'aperçoit que d'avantage de peptides comportant une cystéine sont identifiés avec l'approche classique(TCA) (Figure 42).

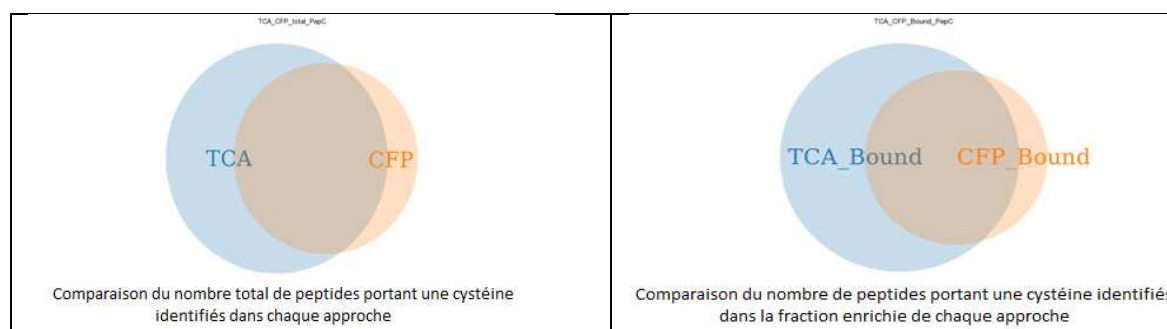
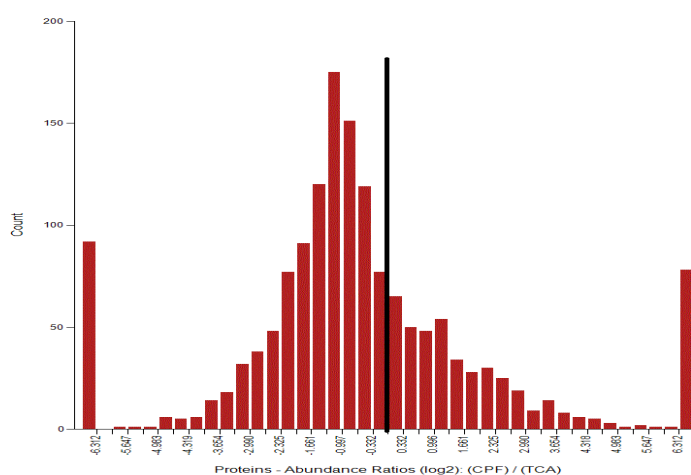


Figure 42: Comparaison des peptides portant une cystéine identifiés dans chaque approche au total (gauche) et uniquement dans la fraction enrichie (droite)

Cependant, la grande majorité des peptides portant une cystéine identifiés avec l'approche classique le sont dans la fraction enrichie. Il s'agit donc de cystéines oxydées. La comparaison de l'ensemble peptides identifiés portant une cystéine (enrichie+NonEnrichie) avec les 2 approches montre que 1282 peptides sont exclusivement identifiés avec l'approche classique (TCA) et 356 avec le traitement sur puce. Cependant, la couverture du protéome obtenue avec le traitement sur puce est meilleure quand on considère l'ensemble des peptides et protéines identifiés. Ceci peut s'expliquer par la survenue d'oxydation artéfactuelle durant le traitement de l'échantillon par le protocole classique étant donné que c'est le même échantillon qui a été analysé dans les approches. En effet, si les peptides sont oxydés, leur enrichissement peut aider à leur identification. Tandis que, s'ils ne sont pas oxydés, ils sont analysés avec la fraction non enrichie (plus complexe), réduisant la probabilité de leur identification. D'où le fait qu'il y'a plus de peptides portant une cystéine identifiés avec l'approche classique (TCA)

alors cette dernière offre une moins bonne couverture du protéome par rapport au traitement sur puce (*ChipFilter*).

La quantification *Label Free* de la fraction enrichie donne une distribution des rapports d'abondance ($\log_2$ ratio *ChipFilter*/TCA) en faveur de l'approche classique (figure 39). Ceci signifie que, dans la fraction enrichie, les protéines identifiées présentent une intensité globalement plus élevée avec l'approche classique qu'avec le traitement sur puce. Cette observation rejoint celle faite sur la comparaison du nombre de peptide et de protéine identifiés dans les fractions enrichies. Elle serait due au fait que la précipitation acide des protéines dans le protocole classique (TCA) pour le rinçage induit d'avantage d'oxydations artéfactuelles comparée au traitement sur puce.



Cette hypothèse est renforcée par le fait que la distribution des rapports d'abondance dans la fraction non enrichie est favorable au traitement sur puce (Figure 44). Au vu des résultats de la quantification *LabelFree* dans les fractions enrichies et non enrichies, le traitement sur puce permettrait d'obtenir une meilleure couverture du protéome avec moins d'oxydations artéfactuelles. L'utilisation du dispositif miniaturisé a aussi permis de réduire la durée du traitement de l'échantillon de manière significative (Figure 39). Cependant, la quantité d'échantillon utilisée est trop importante et pourrait être diminuée.

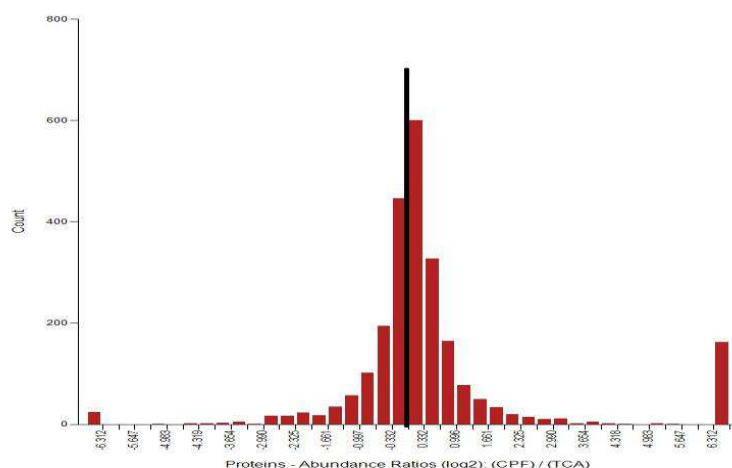


Figure 44 : Quantification *Label Free* de la fraction non enrichie : Distribution des log2 des ratios d'abondance des protéines identifiées selon les 2 méthodes *ChipFilter*/Précipitation TCA ; n=3
100 µg d'extrait protéique de cellules de levure

Les protéines membranaires sont les plus difficiles à identifier du fait de leur faible solubilité dans les solutions aqueuses. L'annotation des protéines identifiées montre que le traitement sur puce a permis d'identifier 426 protéines membranaires et la méthode classique 299 ; 143 de ces protéines ont été exclusivement identifiées avec le traitement sur puce et 16 avec l'approche classique.

7.2 Vers l'intégration et l'automatisation du CPF

L'avantage de la miniaturisation est de pouvoir faire des réactions plus rapides mais aussi d'utiliser moins d'échantillons et de réactifs. Pour déterminer la sensibilité de notre dispositif miniaturisé, nous avons procédé à une diminution progressive de la quantité d'échantillon utilisé tout en surveillant le nombre de protéines identifiées.

7.2.1 Montage en ligne *ChipFilter*-LC pour optimiser les transferts

La diminution de la quantité d'échantillon s'est accompagnée d'une chute du nombre de protéines identifiées. En effet, en dessous de 10 µg d'échantillon, moins de 600 protéines sont identifiées. Ceci est en partie dû au volume d'élution élevé. En effet, éluer avec 70 µL quand la quantité d'échantillon injecté est uniquement de 10 µL entraîne une importante dilution des peptides générés. De plus, les étapes de préparation du volume élué avant l'injection en LC-MS peuvent entraîner des pertes d'échantillon non négligeables. La préconcentration des peptides générés et le couplage direct du *ChipFilter* permettraient d'améliorer la sensibilité.

La solution a été de coupler le *ChipFilter* directement à la LC pour le piégeage en ligne des peptides générés. Concrètement, la sortie du *ChipFilter* a été connectée à la vanne d'injection de la LC grâce à un capillaire en PEEK (Polyether ether ketone ou polyétheréthercétone)(Figure 45). C'est une vanne 6 voies qui fonctionnent selon 2 configurations : chargement et Injection. Elle est mise en mode chargement pour ainsi stocker les peptides issus de la digestion dans le *ChipFilter* dans la boucle d'injection. A la

fin de la digestion et de l'élution, elle bascule en mode injection et le contenu de la boucle est envoyé vers la précolonne C18 pour le piégeage des peptides générés.

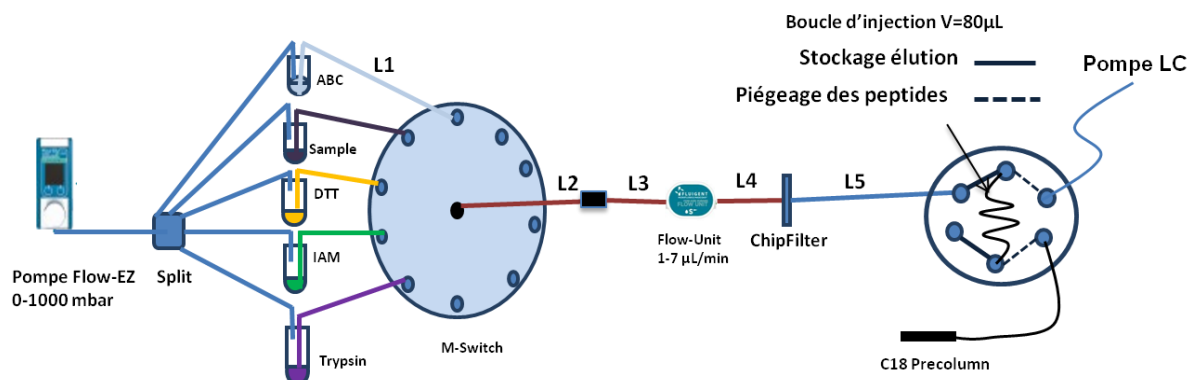


Figure 45 : Couplage du *ChipFilter* à une chaîne de chromatographie liquide pour le piégeage en ligne des peptides générés par la digestion dans le *ChipFilter*

Le couplage du *ChipFilter* à la LC a permis d'améliorer la sensibilité de la puce et d'analyser des quantités d'échantillon de l'ordre du microgramme. La sensibilité du *ChipFilter* a été comparée à celle du FASP. 1 µg d'extrait protéique de cellule de levure ont été réduits, alkylés (DTT 20 mM, IAM 50 mM, ABC 50 mM, pH 8, 30 minutes de réaction) puis digérés (ratio Enzyme/protéines 1:1, une heure de digestion 37°C) dans le *ChipFilter*. Les peptides générés sont directement piégés sur une précolonne C18 (300 µm d.i., 50 cm de longueur, Pepmap ThermoFisher Scientific). Une analyse LC MS/MS est ensuite réalisée avec 2 h de gradient (1-40% Acétonitrile). 1 µg et 10 µg d'échantillon du même extrait protéique ont été traités par FASP (20 mM DTT, IAM 200 mM, ABC 50 mM, pH 8) puis digérés par FASP aussi. La comparaison a été effectuée en triplicata. On observe alors que le *ChipFilter* offre une meilleure couverture du protéome avec dix fois moins d'échantillon et un protocole 8 fois moins long que la méthode FASP. Les résultats détaillés de la comparaison du traitement sur puce et la méthode FASP sont présentés en Annexe (Article 1).

7.2.2 Etude de la répétabilité du couplage *ChipFilter*-LC

La répétabilité du traitement sur puce couplée à la LC a été évaluée avec le traitement d'1 µg d'échantillon traité. L'analyse de la même quantité d'échantillon a été effectuée 3 fois avec à chaque fois un *ChipFilter* neuf. Plus de 1800 protéines ont été identifiées, 16459 peptides dont 1028 portant une cystéine. Comparé aux résultats obtenus avec 100 µg de protéine traitée, l'analyse du centième de cette quantité d'échantillon se traduit par environ 300 protéines identifiées en moins. Une quantification *LabelFree* a ensuite été effectuée pour évaluer la répétabilité du couplage *ChipFilter*_LC.

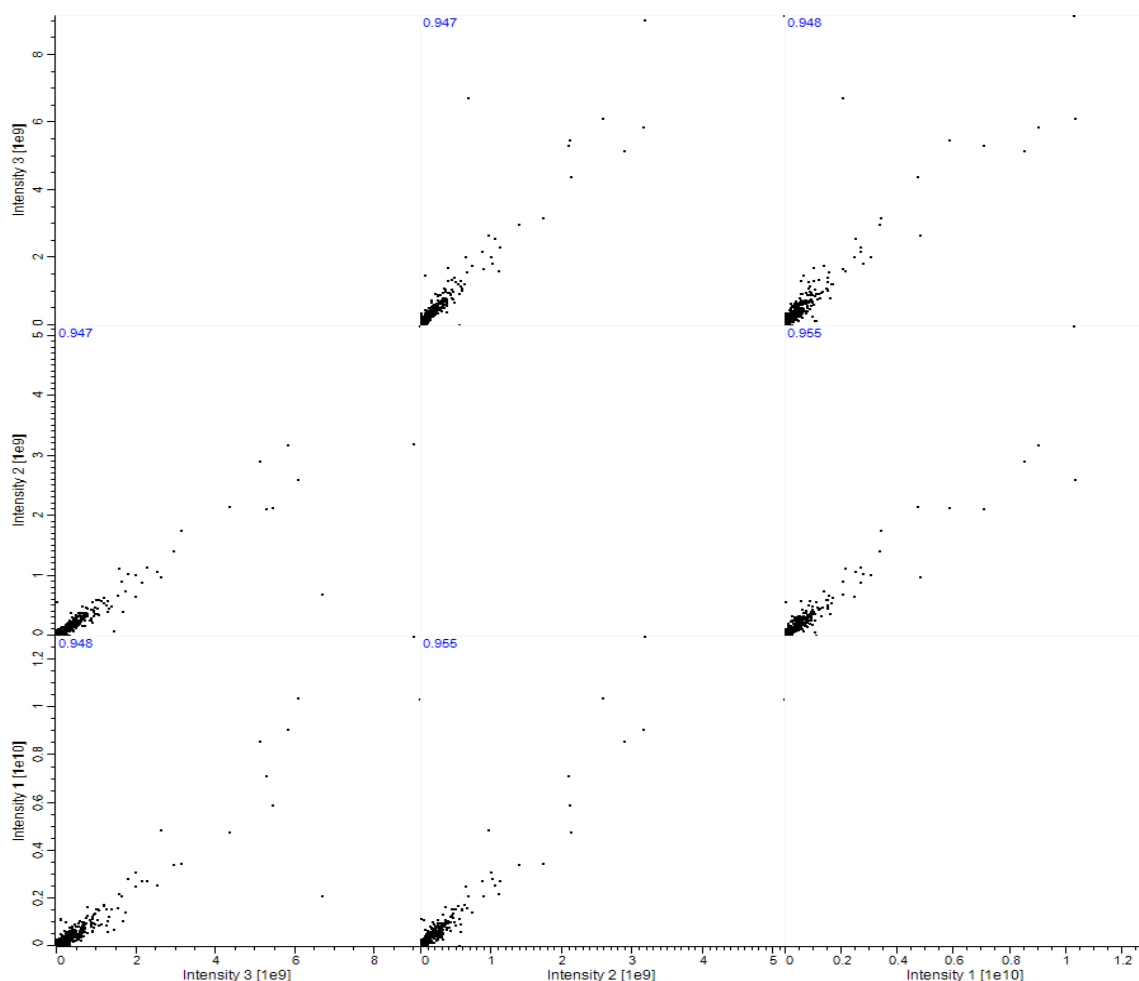


Figure 46 : MultiScatter Plot de 3 analyses d'1 μg d'échantillon sur le *ChipFilter*

La Figure 46 montre la corrélation des intensités des protéines identifiées dans chaque traitement sur puce. Chaque point représente une protéine identifiée avec en abscisse l'intensité obtenue pour le traitement 1 et en ordonnées celle obtenue avec le traitement 2 par exemple. On observe une nette amélioration par rapport au traitement sur puce non couplée à la LC (Figure 35). La corrélation obtenue (Coefficient de Pearson $> 0,94$) montre que traitement sur puce couplée à la chromatographie liquide a une répétabilité plutôt satisfaisante.

7.2.3 Intégration de la lyse cellulaire

La lyse cellulaire consiste à détruire la membrane de la cellule pour libérer son contenu. C'est la première étape du protocole d'analyse des protéines par spectrométrie de masse. C'est une étape cruciale car elle détermine la quantité et la diversité des protéines à analyser. L'intégration de cette étape permettrait d'améliorer l'extraction des protéines et la réduction des pertes d'échantillon en réduisant la manipulation manuelle de l'échantillon. Le concept de Lab-on-chip en protéomique passe par la miniaturisation et l'intégration de l'ensemble des étapes d'une analyse protéomique, y compris la lyse cellulaire. Plusieurs dispositifs microfluidiques ont donc été proposés pour la miniaturisation de la lyse cellulaire. Cependant, la plupart de ces dispositifs s'arrêtent à l'extraction des protéines et n'intègrent les autres étapes du protocole d'analyse¹¹³. Après

avoir testé le *ChipFilter* pour la préparation et la digestion d'échantillon protéique complexe, nous avons étudié la possibilité de réaliser la lyse cellulaire directement dans le *Chipfilter*.

La lyse cellulaire par voie chimique a été choisie car elle est compatible avec le *ChipFilter* et ne nécessitait pas la modification de ce dernier. Cependant, une action mécanique (friction billes de silice) est requise pour la lyse des cellules de levure utilisées jusqu'ici. La lyse cellulaire par voie chimique dans le *ChipFilter* a donc été appliquée à des cellules épithéliales humaines (HepG2). Elle consiste à charger les cellules directement dans le *ChipFilter* et ensuite d'utiliser une solution acide (TCA 10%, 1 μ L/min, 40 minutes) pour détruire les membranes cellulaires. Les protéines sont ensuite rincées avec une solution tampon avant de commencer le traitement chimique et enzymatique des protéines selon le protocole présenté au Tableau 7. Une quantité d'1 μ g de trypsine a été ajoutée pour la gestion. La réalisation de la lyse cellulaire dans le dispositif microfluidique permet d'utiliser un faible nombre de cellule pour une analyse protéomique par criblage. En effet, quand l'extraction des protéines est réalisée dans le *ChipFilter*, toutes les étapes du protocole de préparation d'échantillon sont intégrées : de la lyse cellulaire aux piégeage des peptides sur précolonne.

Avec la réalisation de la lyse cellulaire dans le *ChipFilter*, la quantité d'échantillon de départ est exprimée en nombre de cellule et pas en quantité de protéines. Dans un premier temps, le traitement de 300 000 cellules (extraction des protéines, traitement chimique et enzymatique) dans le *ChipFilter* couplé à la LC pour le piégeage en direct des peptides (dans une précolonne C18) a entraîné l'annulation de l'acquisition en MS du fait d'une quantité d'échantillon trop grande. Le nombre de cellule utilisé a donc été diminué progressivement. L'utilisation de moins de 30 000 cellules (environ 27 000) dans cette configuration a permis de générer une quantité de peptide (directement piégé sur une précolonne) non excessive pour une acquisition MS. Cette analyse constitue le premier exemple d'un échantillon dont la totalité du traitement est réalisée grâce au *ChipFilter* couplé à la LC : de l'extraction des protéines au piégeage des peptides dans une précolonne C18. L'analyse des peptides piégés a permis d'identifier 2750 protéines pour un total de 13950 peptides. Parmi ces peptides, 2868 portent une cystéine. La digestion s'est faite sur 2 heures, près de la moitié des peptides identifiés portent 1 ou 2 sites de coupure manqués.

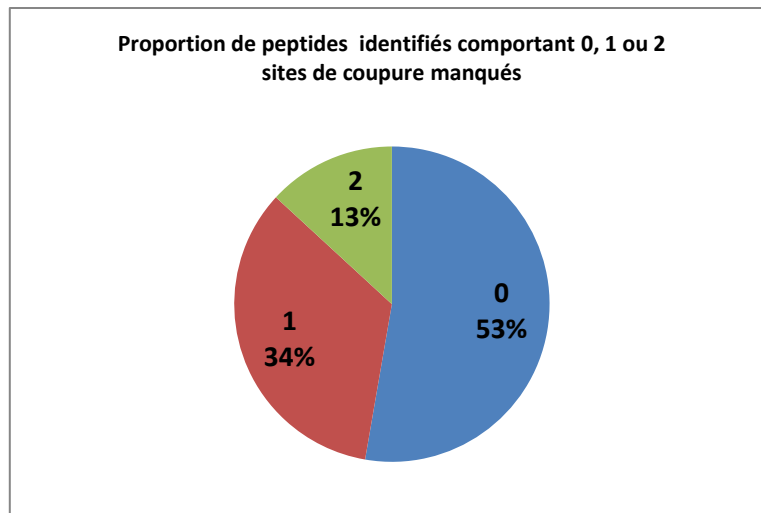


Figure 47 : Proportion des peptides portant 0, 1 ou 2 sites de coupure
27 000 cellules épithéliales HepG2 lysées et traitées dans le *ChipFilter*

7.2.4 Enrichissement en ligne

Une autre étape à intégrer est le fractionnement par affinité. Ce point a tout d'abord été évalué sur un échantillon standard bien caractérisé d'extrait de protéine de levure

L'analyse d'1 µg d'extrait protéique de levure dans *le ChipFilter* couplé à la LC (n=3) n'a permis d'identifier qu'un faible nombre de peptide portant une cystéine. Le nombre de peptides portant une cystéine et identifiés sur les 3 traitements est en moyenne de 600 peptides par analyse, ce qui est faible, comparée au nombre identifié avec l'approche classique. Le protocole OcSILAC, grâce au marquage et au fractionnement, permet d'identifier environ 3000 peptides portant une cystéine (Tableau 10). Le traitement sur puce n'intègre pas d'étape de fractionnement de l'échantillon visant à retenir spécifiquement les peptides marqués avec la biotine. Il est donc nécessaire d'ajouter un module de fractionnement de l'échantillon au *ChipFilter* couplé à la chaîne LC. Cette étape est nécessaire pour la quantification de l'oxydation des cystéines qui est basée principalement sur l'identification des peptides portant une cystéine.

Un module d'enrichissement des peptides marqués avec la biotine, composé de billes magnétiques fonctionnalisées avec la streptavidine a été mis au point. Cependant, l'enrichissement escompté n'a pas été obtenu. Très peu de peptides portant ont été identifiés dans la phase enrichie. Ceci peut s'expliquer par le fait que le protocole utilisé est différent de celui recommandé par le fournisseur. En effet, le protocole recommandé était assez complexe à mettre en œuvre et n'était pas adapté au fonctionnement du *ChipFilter*. Ce point doit donc être encore optimisé.

7.3 Application biologique

L'analyse protéomique d'un échantillon biologique requiert, lorsqu'un protocole classique en traitement en solution est appliqué, entre 1 et 3 millions de cellules. Pour le protocole OcSILAC classique par exemple, 3 millions de cellules par échantillon sont utilisés pour les applications biologiques. Les protéines dont la modification, la sous ou

surexpression sont directement liées à l'état physiologique et/ou à l'environnement cellulaire sont généralement présentes en faible concentration et donc difficile à identifier. L'utilisation d'une grande quantité d'échantillon ne rend pas leur détection plus simple, bien au contraire. Le traitement sur puce avec la lyse cellulaire intégrée détaillé dans le paragraphe précédent pourrait donc être d'une aide précieuse pour l'identification de ces protéines. En effet, l'identification de plus 2700 protéines avec moins de 30 000 cellules, sans fractionnement de l'échantillon, permet l'utilisation d'un nombre de cellules bien plus faible, comparé au traitement en solution (Figure 47).

Dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe du laboratoire des Biomolécules de l'ENS et le SMBP, nous avons appliqué notre CFP à l'étude de l'activité antioxydante d'une molécule synthétique mime de SOD appelé Mn1 sur cellules épithéliales intestinales HT29-MD2. L'analyse protéomique de ces cellules a pour but d'identifier les protéines sensibles au stress oxydatif induit par le lipopolysaccharide (LPS) dans un premier temps. Dans un second temps, l'expression et l'oxydation de ces protéines sont évaluées dans le cas où les cellules sont présentes dans un milieu contenant à la fois du LPS (pour induire le stress oxydatif) mais aussi le Mn1 dont l'effet antioxydant doit être évalué.

L'idéal aurait été de réaliser le protocole OcSILAC sur le ChipFilter couplé à la LC sur environ 30 000 cellules mais il se trouve qu'une étape de fractionnement est nécessaire dans cette étude. Au vu des résultats des tests d'enrichissement en ligne qui ne sont pas suffisamment performants, nous avons décidé de ne pas la mettre en œuvre dans cette première étude. L'étape d'enrichissement sera donc faite ici en mode *offline*, comme dans le protocole OcSILAC classique mais toutes les étapes précédentes seront réalisées dans le *ChipFilter*, ce qui nous permet de travailler avec bien moins de matériel de départ. Au lieu des 3 millions de cellules normalement requises, seulement 150 000 cellules ont donc été utilisées pour prendre en compte la perte d'échantillon qui pourrait survenir lors de cette étape réalisée en dehors du *ChipFilter*.

On dispose de 3 séries d'échantillon : i) des cellules contrôle, n'ayant subi aucun traitement ii) des cellules ayant été exposées à un stress oxydatif iii) des cellules exposées à un milieu de stress oxydatif mais traitées avec l'agent antioxydant Mn1. Chaque série est composée d'une version lourde et d'une version légère du même type de cellule. La version légère est celle qui est traitée dans les 3 cas et la version lourde n'est jamais traitée, et est utilisée comme contrôle. Pour l'analyse protéomique en CFP, 150 000 cellules de chaque version (lourde et légère) d'une série sont donc mélangées avant traitement dans le *ChipFilter*.

Après chaque analyse, la distribution des rapports d'abondance des protéines issues de chaque version d'une série est étudiée. La comparaison des protéines identifiées est ici aussi illustrée dans les diagrammes de Venn qui suivent. Dans ces trois figures sont rassemblés les comparaisons des identifications de protéines identifiées à partir de la fraction non retenue sur streptavidine (ne contenant donc pas de protéines oxydées) et de la fraction retenue (où se retrouvent les peptides oxydés biotinylés) Ces résultats sont

comparés pour les trois séries d'échantillons. Les distributions sont centrées sur 0 ce qui signifie dans tous les cas que les deux échantillons lourds et légers des deux fractions sont en abondance équivalente.

Echantillon contrôle : Il faut constater un léger biais entre les versions lourde et légère du contrôle. La version légère semble légèrement plus riche en identifications que la version lourde.

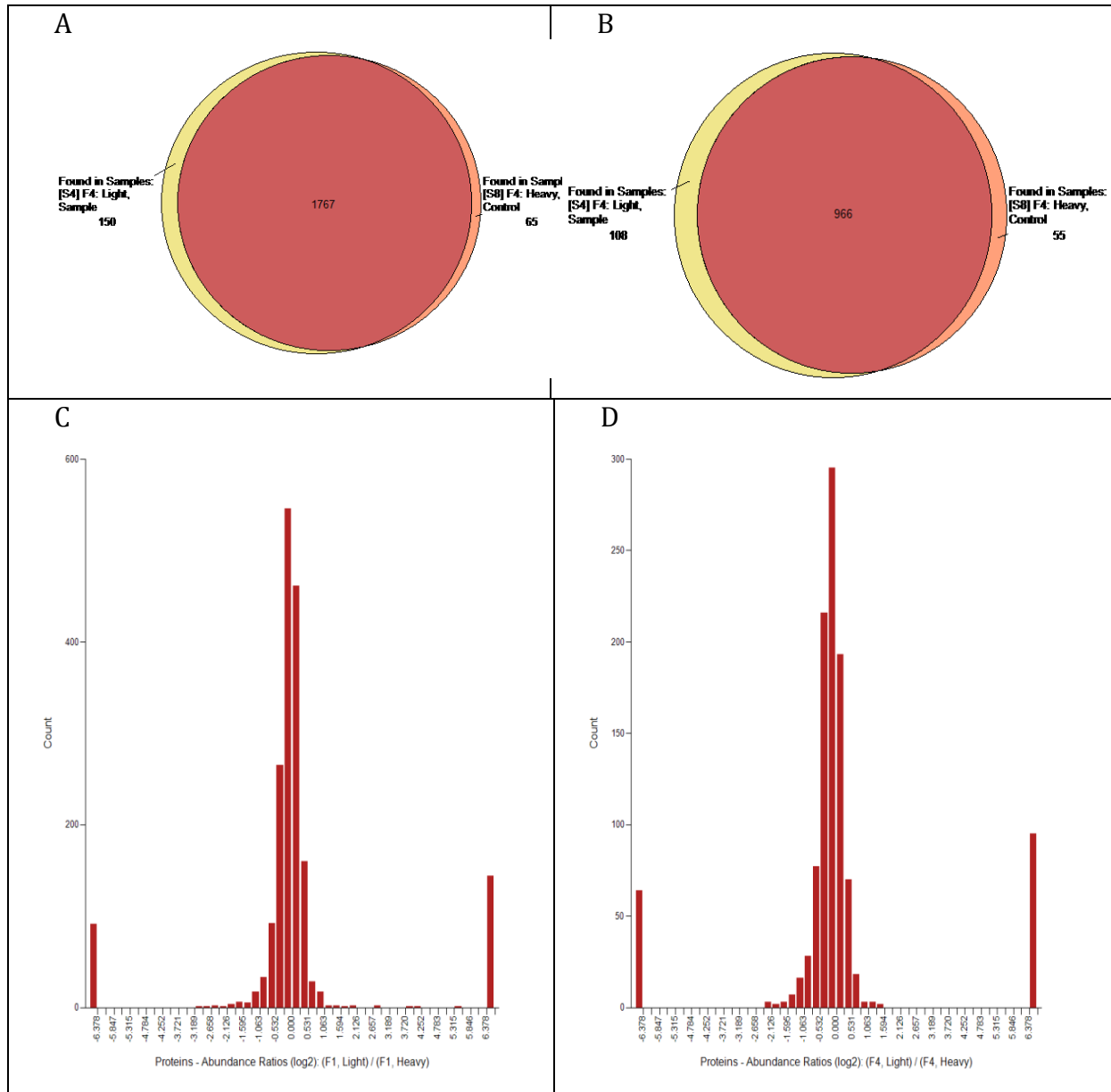


Figure 48 Echantillon contrôle : comparaison de la distribution des protéines identifiées (A,B) et des ratios d'abondance (C,D) en se basant sur les peptides issus des fractions non retenus (à gauche) et retenus (à droite).

Echantillon LPS :

Ici comme illustré dans les diagrammes de Venn ci-dessous, l'échantillon léger et l'échantillon lourd contiennent un nombre de protéines relativement comparable dans la fraction non retenue, c'est-à-dire celle contenant les espèces sous leur forme réduite et non biotinylée, en revanche il y a beaucoup plus de protéines retenues sur streptavidine, et donc oxydées, identifiées dans l'échantillon traité LPS. Ce qui signifie qu'il y a plus d'espèces identifiées sous forme oxydée dans l'échantillon LPS ce qui est attendu. En revanche les distributions des rapports d'intensité des formes oxydées identifiées dans les deux échantillons traité et non traité sont cependant décalées vers des ratios léger/lourd inférieurs à 0 en ce qui concerne la fraction retenue et donc oxydée (en bas à droite), ce qui signifie que, pour les protéines simultanément identifiées dans les deux échantillons, les espèces oxydées sont plus abondantes dans l'échantillon contrôle.

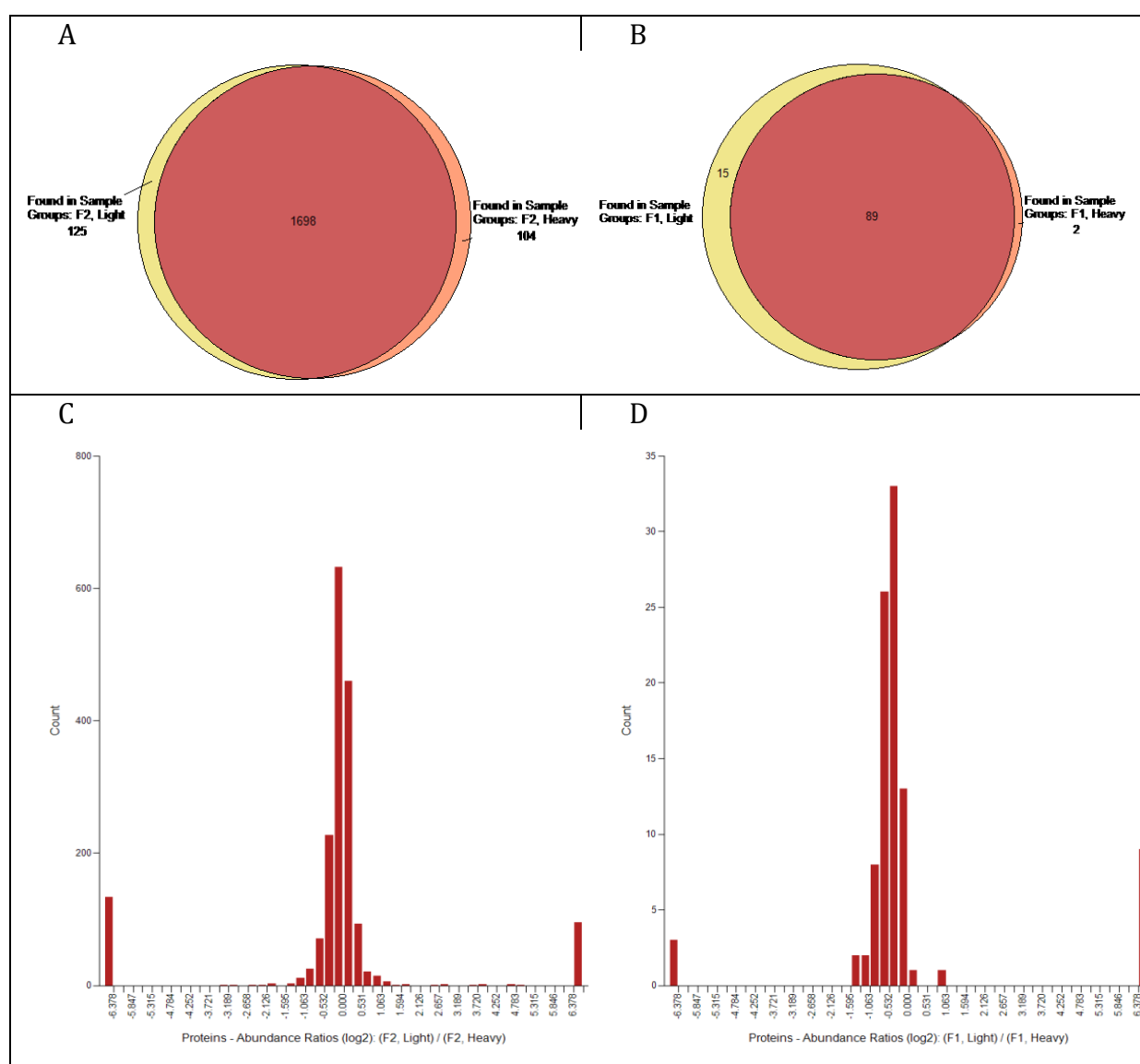


Figure 49 : Echantillon LPS : comparaison de la distribution des protéines identifiées (A,B) et des ratios d'abondance (C,D) en se basant sur les peptides issus des fractions non retenus (à gauche) et retenus (à droite).

Echantillon LPS-Mn1 :

Malgré le biais constaté entre les contrôles lourd et léger, les diagrammes de Venn montrent ici que l'échantillon lourd contrôle contient plus de protéines dans la fraction non retenue et donc réduite (en haut à gauche). Le nombre de protéines dans la fraction oxydée (en haut à droite) est comparable dans la fraction retenue sur streptavidine ce qui signifie que les espèces oxydées sont en nombre comparable dans le contrôle et dans l'échantillon réduit. On peut donc émettre l'hypothèse que le Mn1 a bien effet anti-oxydant puisqu'il corrige la tendance observée dans l'échantillon LPS.

Les distributions des protéines sous forme réduite sont centrées sur 0, ce qui implique que l'abondance des protéines réduite est comparable dans ces deux échantillons alors que la distribution des espèces retenues est décalée vers les faibles rapports léger/lourd ce qui renforce l'hypothèse d'une plus faible abondance des espèces oxydées dans l'échantillon traité LPS-Mn1 en comparaison au contrôle.

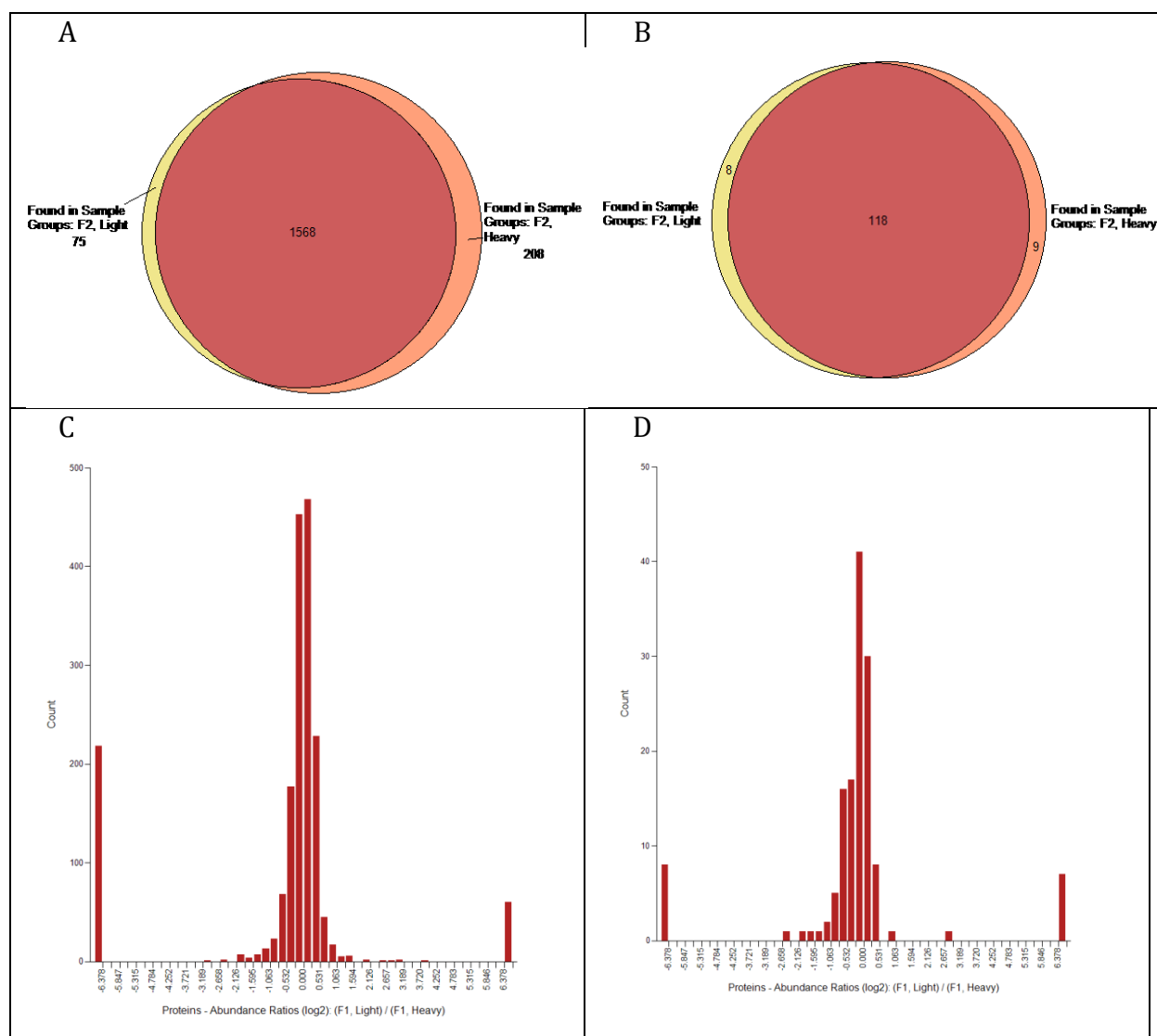


Figure 50 : Echantillon LPS_Mn1 : comparaison de la distribution des protéines identifiées (A,B) et des ratios d'abondance (C,D) en se basant sur les peptides issus des fractions non retenus (à gauche) et retenus (à droite).

En conclusion, le CFP appliqué à l'étude du traitement LPS et LPS-Mn1 sur les cellules épithéliales intestinales HT29-MD2 a permis de montrer que après un traitement au LPS l'abondance des protéines oxydées augmente, et que l'application de l'anti-oxydant Mn1 permet de réduire les protéines redox, et ce vraisemblablement avec un effet réducteur suffisamment important pour que l'état redox global des protéines soit décalé vers un état réduit plus important que les conditions basale du contrôle.

Il sera nécessaire de répéter cette étude pour pouvoir réaliser un traitement statistique plus avancé afin de conclure. Les études sont en cours pour finaliser ce point et font l'objet d'une thèse actuellement au laboratoire.

La sensibilité du dispositif permet d'envisager des analyses sur répliques biologiques plus nombreuses car il nécessite un nombre de cellules 20 fois plus faible ce qui est très important pour les designs expérimentaux de cette étude. Encore une fois l'intégration de l'étape de fractionnement streptavidine-biotin serait un atout supplémentaire pour minimiser les pertes d'échantillon et augmenter la couverture du protéome de nos échantillons.