

Cytométrie en flux

Dans le cadre de ces travaux, la cytométrie a été utilisée afin d'estimer la viabilité des microorganismes et de les quantifier dans un échantillon, ainsi que pour estimer l'intensité du signal FISH au cours du cycle de croissance.

3.1 Principe

La **cytométrie en flux** (CMF) est une technique qui a vu le jour dans les années 50. Elle est définie comme l'étude de particules isolées (cellules, bactéries...) entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs :

- ✓ aux propriétés optiques intrinsèques des particules, qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à sa structure interne ou à l'auto fluorescence de certaines cellules comme les végétaux, le phytoplancton, etc.
- ✓ aux propriétés optiques induites de fluorescence, obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur.

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (un paramètre) ou de cytogrammes (deux paramètres), sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

Certains cytomètres en flux permettent de trier physiquement une ou deux populations cellulaires définies par leurs propriétés optiques. L'analyse multiparamétrique d'une suspension cellulaire hétérogène permet de définir des sous-populations qui peuvent être séparées physiquement de la population globale. Pour cela, des critères de séparation sont déterminés par l'utilisateur (définition des zones d'intérêt du tri) et toute cellule dont les caractéristiques seront comprises entre les valeurs choisies, sera isolée. Dans ce but, la veine liquide sera chargée électriquement, puis fractionnée en une succession de gouttelettes. La gouttelette contenant la cellule à isoler est déviée en passant dans un champ électrostatique et récupérée dans un tube collecteur. Si la cellule appartient à une sous-population non sélectionnée ou si la gouttelette formée ne contient pas de cellule, la veine liquide ne sera pas chargée et la gouttelette éliminée.

3.2 Protocole expérimental

3.2.1 Marquage cFDA

3.2.1.1 Principes

A différents moments lors de nos travaux, nous avons procédé à une quantification des microorganismes par cytométrie en flux. Avant analyse, les échantillons ont été marqués à l'aide de 5(6)-carboxyfluorescéine diacétate (cFDA).

Le cFDA est une molécule hydrophobe qui devient fluorescente sous sa forme cF (5(6)-carboxyfluorescéine) après hydrolyse des groupements acétate (cf. Figure 32). La membrane cellulaire est relativement perméable au cFDA. Une fois dans la cellule, les groupements acétate sont clivés par des estérases aboutissant à la formation de molécules de cF hautement

fluorescentes. Ces dernières restent dans les cellules du fait de leurs charges négatives. Le cFDA est un marqueur de viabilité, c'est-à-dire qu'il marque exclusivement les cellules vivantes. Il est le plus souvent utilisé afin d'étudier les mouvements de populations cellulaires, estimer la viabilité, et mesurer le pH intracellulaire. En effet l'intensité de la fluorescence est fonction du pH.

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du cFDA, ou plus exactement de sa forme cF, sont respectivement de 492 nm et de 516 nm.

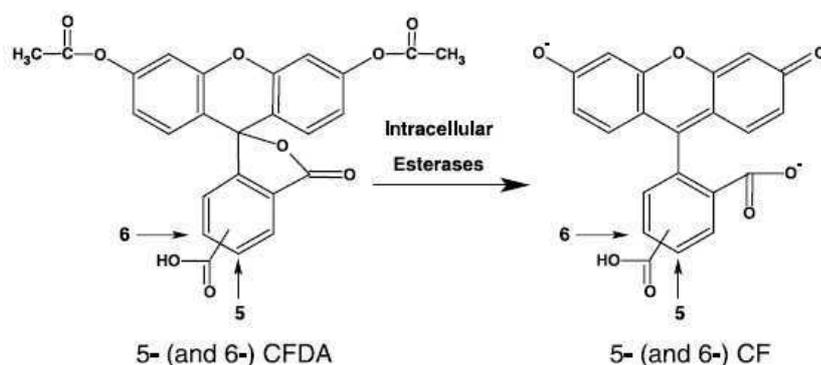


Figure 32 : Réaction d'hydrolyse de la 5(6)-carboxyfluorescéine diacétate en 5(6)-carboxyfluorescéine par les estérases intracellulaires. (Hoefel *et al.*, 2003)

3.2.1.2 Protocole

Le marquage au cFDA a été utilisé lors des suivis de réacteurs afin de déterminer la concentration des échantillons en microorganismes vivants.

Un prélèvement de 1 mL est centrifugé à 13 000 rpm pendant 1 minute. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 1 mL de tampon B4 (Chemsol), auquel sont ajoutés 10 μ L d'une solution de cFDA à 50 μ M. Le tube est ensuite agité, incubé 10 minutes à 40°C, puis à nouveau centrifugé 1 minute à 13 000 rpm. Le culot est repris dans 1 mL de tampon B4 et analysé au cytomètre en flux.

Le cytomètre utilisé pour la quantification et le test de viabilité est le BactiFlow multiparamétrique (Chemunex SA) équipé d'un laser argon émettant à 488 nm et refroidi par air. Il est équipé de 4 filtres différents, permettant d'analyser 4 paramètres simultanément :

- Un détecteur de taille (FSC : forward angle light scatter) : mesure la lumière diffractée dans l'axe du laser, combiné à un collecteur
- Un détecteur de granulosité (SSC : side angle light scatter), mesure la lumière diffractée à 90°C et donne des informations relatives à la granulosité des cellules.
- Un filtre de bande passante à 530 nm (515-545 nm), qui collecte la fluorescence verte de la carboxyfluorescéine.
- Un filtre de bande passante à 670 nm, qui collecte la fluorescence rouge.

Une combinaison spécifique de FSC et SSC est utilisée afin de discriminer les bactéries du bruit de fond.

3.2.2 Analyses FISH par cytométrie en flux

Le cytomètre utilisé pour l'analyse FISH est le FAC-Scan (Becton-Dickinson). Ses caractéristiques sont identiques à celle du cytomètre précédent sauf qu'il dispose en plus d'un filtre de bande passante à 585 nm (564-606 nm), qui collecte la fluorescence jaune-orange.

4. Marquage cFDA/SE : suivi de division cellulaire.

4.1 Description

Le suivi de la division cellulaire lors de la filamentation a été effectué grâce au marquage des cellules à l'aide de la 5-(6)-carboxyfluorescéine diacetate succinimidyl ester (cFDA/SE). Cette molécule est la plus utilisée pour le marquage fluorescent des cellules vivantes. Elle diffère du cFDA par la présence d'un groupement succinimidyl ester (SE) ayant une forte affinité pour les amines libres ainsi que pour les groupements amines des protéines intracellulaires. Le cFDA/SE est, comme le cFDA, hydrolysé en une molécule fluorescente, le cF/SE, par les estérases intracellulaires (cf. Figure 33).

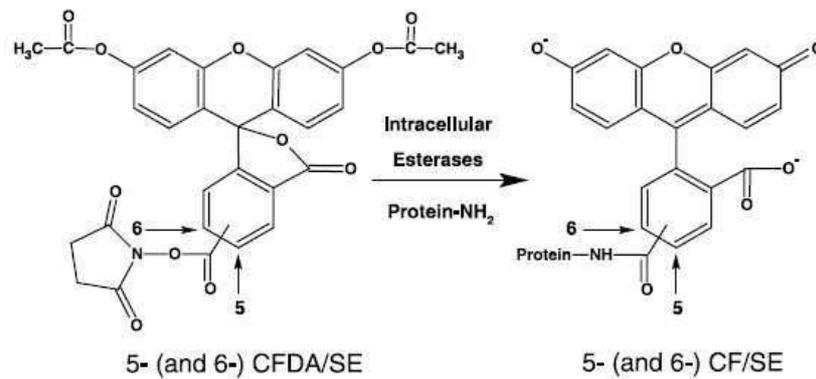


Figure 33 : Réaction d'hydrolyse de la 5(6)-carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester en 5(6)-carboxyfluorescéine succinimidyl ester, par les estérases intracellulaires. (Hoefel *et al.*, 2003)

Le marquage au cFDA/SE est également utilisé pour estimer la viabilité des bactéries (Fuller *et al.*, 2000). Le groupement SE permet à la molécule fluorescente (cF/SE) de s'ancrer dans la cellule. Ceci évite toute fuite ou expulsion de la molécule fluorescente par la cellule. On a de cette façon un marquage très stable dans le temps. Le cFDA/SE permet ainsi de suivre le déplacement des microorganismes dans des milieux complexes tels que des eaux souterraines (Fuller *et al.*, 2001). Il est également utilisé, de la même façon que dans les travaux ici décrits, pour suivre la division cellulaire des microorganismes (Ueckert *et al.*, 1997).

4.2 Protocole de marquage

Le protocole de marquage est identique à celui décrit par le cFDA.

4.3 Observation et acquisition des images

Les observations sont réalisées sur un microscope Leitz Laborlux S, équipé d'une lampe à mercure haute pression HBO de 50W. Il est équipé d'un oculaire de 12.5X et les observations ont été effectuées en utilisant les objectifs X40 et X100 sous immersion dans l'huile. Les acquisitions d'images sont effectuées à l'aide d'un appareil photographique numérique Nikon installé sur le microscope.

5. Protéomique

La partie protéomique de ces travaux consiste en une étude de l'expression protéique de *Sphaerotilus natans*, lors de sa croissance sous formes monocellulaire et filamenteuse.

5.1 Extraction des protéines

Le protocole d'extraction des protéines totales utilisé est très largement inspiré de la technique décrite par Laemmli (Laemmli, 1970). Elle consiste en une lyse des cellules et une solubilisation des protéines dans un tampon dénaturant.

Les extractions sont réalisées sur 2 mL de culture, soit environ 250 mg de biomasse. La suspension cellulaire est centrifugée à 13 400 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot est repris dans 1 mL de PBS. Cette étape de lavage est répétée 2 fois. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 500 μ L de tampon SSB.

Composition du tampon SSB :

- ✓ 125 mM de Tris-HCl pH 6,8
- ✓ 2% de SDS
- ✓ 10% de glycérol
- ✓ 0,02% de bleu de bromophénol
- ✓ 100 mM de DTT
- ✓ 1 mM de PMSF

Le DTT (Dithiothreitol) est un agent permettant la réduction des ponts disulfures. Le SDS est un détergent anionique fort qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives. Ces charges vont se repousser et déplier les chaînes polypeptidiques. Le SDS confère une densité de charges constante le long de la chaîne polypeptidique, ce qui autorise une séparation selon la masse moléculaire apparente dans un champ électrique. Le PMSF (phénylméthanesulphonyl fluoride) est un inhibiteur de protéase.

La suspension cellules+SSB est alors passée aux ultrasons 3 fois 30 secondes dans la glace, incubée 5 minutes au bain-marie à 100°C, puis centrifugée 10 minutes à 13 400 rpm. Le surnageant, contenant maintenant les protéines solubles, est recueilli et conservé à -20°C.

Les protéines ainsi obtenues sont :

- Dénaturées : elles ont perdu leur structure tridimensionnelle
- Sous forme monomérique : conséquence de la rupture des ponts disulfures.

5.2 Dosage des protéines

La concentration des extraits protéiques est déterminée, comme pour l'ADN et l'ARN, à l'aide du système Qubit (Invitrogen-Molecular Probes) et du kit Quant-iT™ Protein Assay (Invitrogen-Molecular probes). Ce kit comprend le marqueur spécifique des protéines, le tampon de réaction et les échantillons standards de BSA nécessaires à la calibration de l'appareil.

5.3 Analyses SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

On parle aussi d'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes. Cette dernière a également été décrite par Laemmli et est à ce jour une des références les plus citées dans la littérature scientifique.

Ce type d'électrophorèse sur gel d'acrylamide a pour but de permettre la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente. Le gel est dit réticulé et est obtenu par polymérisation d'acrylamide, qui forme des chaînes, et de bis-acrylamide, qui pontent les chaînes d'acrylamide. Plus la concentration en acrylamide est élevée et plus la densité des chaînes est importante, et moins les protéines volumineuses vont pouvoir migrer dans le gel (cf. Tableau 10).

Pourcentage en acrylamide du gel	Gamme de séparation (en kDa)
7,5	45-400
10	22-300
12	13-200
15	2,5-100

Tableau 10 : Gammes de séparation des protéines sur gels dénaturant d'acrylamide en fonction de la concentration en acrylamide.

Lors de nos expériences, nous avons utilisé des gels concentrés à 10% en acrylamide, en utilisant le système Mini-PROTEAN II (Bio Rad) (cf. Figure 34).

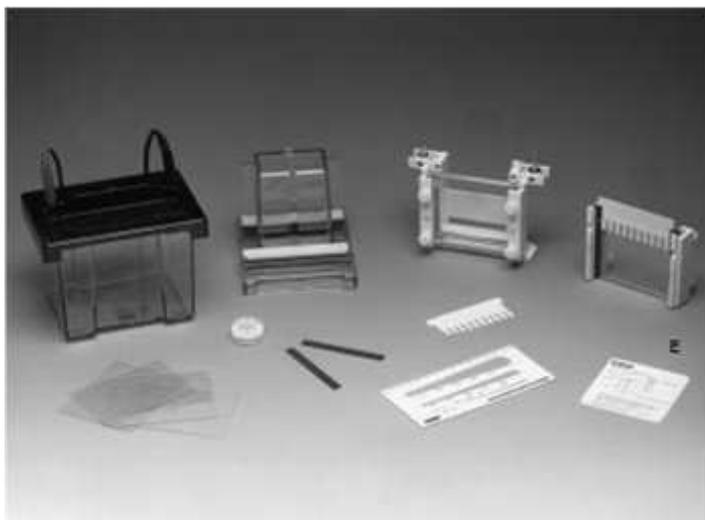


Figure 34 : Système d'électrophorèse Mini-PROTEAN II de Bio Rad.

Composition du gel dénaturant de polyacrylamide (pour 2 gels) :

- 40 % Acrylamide/Bis solution, 37,5: 1 (2,6% C).....3,2 mL
- Tris3M1,25 mL
- Eau MilliQ5,5 mL
- SDS 20%.....50 μ L
- TEMED.....5 μ L
- Persulfate d'ammonium.....50 μ L

Le gel est coulé, à raison de 3,8 mL par gel, entre des plaques de verre espacées dans notre cas par des barres en plastique d'une épaisseur de 0,75mm et monté sur un support. Sa surface est ensuite recouverte d'eau, ceci permet d'éviter tout contact entre le gel et l'air. En effet l'oxygène inhibe la polymérisation du gel.

La réaction de polymérisation est initiée par des radicaux libres formés grâce au persulfate d'ammonium, et elle est catalysée par le TEMED. Cette réaction de polymérisation nécessite une heure pour être complète.

L'eau recouvrant la surface du gel est complètement éliminée. Un gel de concentration est alors coulé à la surface du gel précédent.

Composition du gel de concentration :

- 40 % Acrylamide/Bis solution, 37,5: 1 (2,6% C).....1,34 mL
- Tris 0,5M.....2,5 mL
- Eau MilliQ.....6,11 mL
- SDS 20%.....50 µL
- TEMED.....5 µL
- Persulfate d'ammonium.....50 µL

Un peigne est enchâssé entre les plaques, dans le gel de concentration avant que celui-ci ne polymérise. Après au moins 45 minutes, le peigne est retiré. Les gels et leurs supports sont placés dans la cuve à électrophorèse qui a préalablement été remplie au quart de tampon de migration dilué 10 fois (1X). L'électrophorèse s'effectue sous l'action d'un champ électrique de 120 V et 150 mA.

Composition du tampon de migration à 10X :

- SDS1%
- Tris250 mM
- Glycine.....1,92 M
- Eau MilliQ.....qsp 1L

Le pH est ajusté à 8,3 à l'aide d'HCl.

La migration complète est accomplie en 45 à 60 minutes. Le gel est alors démoulé et plongé dans une solution de bleu de Coomassie pendant 5 minutes sous agitation. Il est ensuite transféré pendant 1 heure et sous agitation dans une solution composée à 50% de méthanol et 10% d'acide acétique, puis enfin 1 nuit dans une solution composée 5% de méthanol et 10% d'acide acétique. Ces solutions vont avoir pour effet d'éliminer l'excès de bleu de Coomassie du gel, seul celui fixé aux protéines sera retenu. Mais elles vont également permettre de fixer les protéines sur le gel en les dénaturant de façon irréversible dans les mailles du gel.

La révélation est réalisée sur Gel Doc (Bio Rad). La visualisation ne nécessite pas l'emploi d'UV et c'est pourquoi un filtre est placé sur le transilluminateur afin de transformer les UV en lumière blanche.

Un marqueur de taille est déposé sur le gel en même temps que les échantillons protéiques afin de pouvoir estimer visuellement la masse moléculaire des protéines de l'échantillon.

5.4 Analyses protéiques par LC-MS/MS

Des analyses en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ont été menées sur les échantillons protéiques totaux extraits des cultures de *Sphaerotilus natans*, ainsi que sur des bandes découpées à partir de gels de protéines (SDS-PAGE) afin d'identifier des protéines différemment exprimées lorsque la bactérie adopte l'une ou l'autre des deux morphologies.

5.4.1 Présentation de la technique de LC-MS-MS

5.4.1.1 Historique

La spectrométrie de masse est une technique qui tire son principe des découvertes de Sir J.J. Thompson, physicien britannique de la fin du XIX^{ème} et début du XX^{ème} siècle qui découvrit l'électron. Il inventa un spectrographe de masse et obtint les premiers spectres de masse de gaz, N₂, O₂ et CO entre autres. Il reçut le prix Nobel en 1906. Le premier spectromètre de masse fut construit en 1918 par A.J. Dempster. La technique a connue de nombreuses améliorations, notamment à la fin des années 1980 où deux méthodes, permettant la désorption-ionisation douces des macromolécules biologiques pour une analyse en spectrométrie de masse ont vu le jour. Ces dernières ont valu à leurs inventeurs, l'américain J.B. Fenn et le japonais K. Tanaka, l'obtention du prix Nobel de Chimie en 2002.

5.4.1.2 Principes généraux de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse permet une mesure précise et sensible de la masse de biomolécules telles que les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les sucres ou les lipides. Cette méthode détermine des rapports masse sur charge, m/z , de molécules ionisées^e.

Il existe différents types de spectromètre de masse. Chacun peut être divisé schématiquement en quatre parties distinctes :

^e m correspond à la masse du composé et z à sa charge.

- **Une source d'ions** : enceinte au sein de laquelle des ions sont formés à partir de l'échantillon vaporisé.
- **Un analyseur** : dont l'objet consiste à mesurer pour chacune des espèces issues de la source d'ions, le rapport entre sa masse (m) et son nombre de charge (Z). L'analyseur sépare donc les molécules en fonction de leur rapport m/z en modifiant leur trajectoire au sein de l'analyseur.
- **Un détecteur** : il convertit en grandeurs électriques le signal correspondant aux ions l'ayant atteint. Il compte les ions en leur associant leur rapport m/z .
- **Un enregistreur** : permet l'acquisition, le traitement et l'enregistrement du signal ainsi que la visualisation des spectres.

Différents types d'analyseurs de masse tels que le TOF (temps de vol), le quadripôle, la trappe à ions, et la cellule ICR peuvent être associés entre eux : on parle alors de spectromètre de masse en tandem. Cette combinaison d'analyseurs permet de fragmenter des molécules et d'analyser les fragments produits.

5.4.1.3 Principe de la source electrospray

La première étape de l'analyse consiste à introduire les molécules à analyser. Il existe différents modes d'ionisation. Seul le mode d'ionisation utilisé dans le cadre de ces travaux sera décrit. Il s'agit d'une ionisation de type ESI ou "Electrospray Ionisation" (cf. Figure 35). Le principe de ce mode d'ionisation (Fenn, 1984; Fenn *et al.*, 1989) repose sur l'introduction de composés en solution via un capillaire fin porté à un potentiel de quelques kilovolts. La tension présente au niveau du capillaire crée des charges dans la solution, formant alors un spray, ou nébulisa de fines gouttelettes, évaporées progressivement par un flux d'azote à contre courant. Les gouttelettes vont traverser simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse, produisant des ions en phase gazeuse portant plusieurs charges. Les ions sont transférés de la source, opérant à pression atmosphérique, à l'analyseur opérant sous un vide plus ou moins poussé selon l'analyseur de masse utilisé.

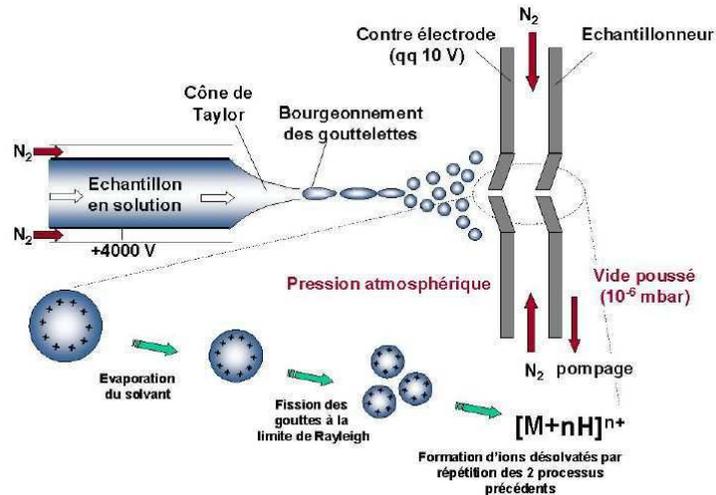


Figure 35 : Schémat du principe d'ionisation des molécules par Electrospray (ESI). Illustration extraite de (Vinh, 1999)

5.4.1.4 La spectrométrie de masse en tandem

Dans un premier temps, les ions formés dans la source entrent dans l'analyseur. Un ion particulier, appelé ion précurseur, et issu de la source, est sélectionné en fonction de son rapport m/z . Il est ensuite transféré dans une cellule de collision où il est fragmenté par collision contre des molécules de gaz inerte : dans notre cas de l'Hélium. Les nouveaux ions ainsi formés sont appelés ions "fragments" ou "fils". Leurs rapports m/z sont ensuite analysés par le second analyseur.

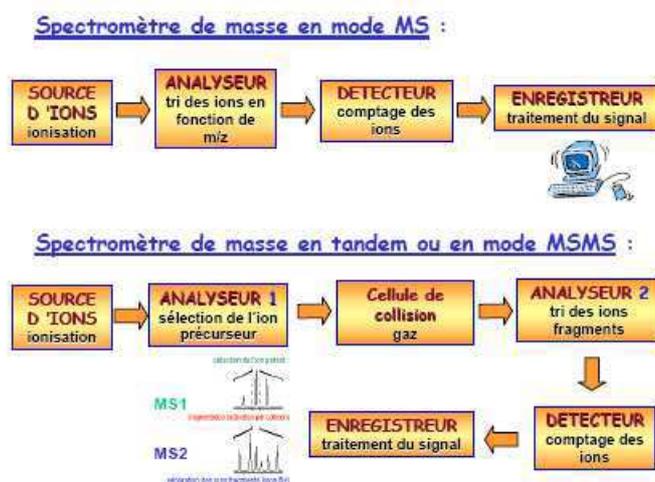


Figure 36 : Schéma du principe des spectromètres de masse en mode MS et MSMS.

Dans ce type de spectromètre les différentes étapes que sont l'isolement, la fragmentation et l'analyse des fragments, sont réalisées dans des parties distinctes de l'instrument. (cf. Figure 36).

5.4.1.5 Trappe ionique et MS/MS

Il existe également un type d'analyseur dans lequel l'ensemble du processus est réalisé dans un même endroit, la trappe à ions. Dans ce cas l'isolement de l'ion précurseur, son excitation, sa fragmentation et l'analyse des fragments s'effectuent successivement au sein du piège, suivant une séquence temporelle.

Activité au sein d'une trappe ionique :

Au sein d'un piège quadripolaire de type trappe d'ions, l'analyse en tandem se réalise dans un premier temps par sélection d'ions dont la valeur m/z est choisie. Ces ions piégés vont ensuite se fragmenter par collision (acquisition d'énergie interne et excitation vibrationnelle) à l'aide d'une tension de radiofréquence (RF) correspondant à leur fréquence de résonance. Les ions formés sont à leur tour piégés. Une éjection sélective en masse des ions produits (fragments) peut alors être réalisée en vue de leur analyse. L'obtention d'ions de générations supérieures est possible par simple renouvellement du processus (sélection d'un ion produit, fragmentation, sélection d'un ion produit de 2^e génération, fragmentation, etc.). Cette séquence est appelée MS^n , n étant le nombre de générations d'ions.

Dans l'étude réalisée, le spectromètre possède une trappe ionique linéaire LTQ (Linear Trap Quadrupole) (THERMO Electron). Dans le cas du LTQ, la trappe ionique se présente sous forme linéaire, on parle de piège 2D (cf. Figure 37).

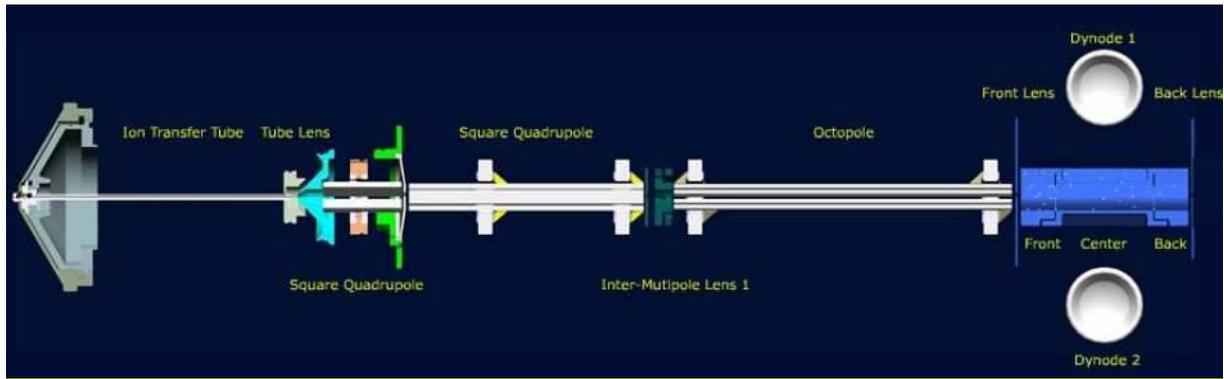


Figure 37 : Représentation schématique du spectromètre de masse en tandem LTQ (Thermo Electron) et de sa trappe d'ions linéaire (2D).

Les applications de la MS/MS sont multiples en biologie. Elle est notamment employée pour l'identification des protéines ainsi que pour la recherche de leurs modifications post traductionnelles. Ce sont en générales les peptides générés par trypsinolyse des protéines qui sont étudiés en spectrométrie de masse. Dans notre cas, les échantillons ont été digérés par la trypsinase, aboutissant à la formation de peptides se terminant, à leur extrémité C-terminale, par une Arginine (R) ou une Lysine (K). L'hydrolyse par cette enzyme est la plus répandue car au vue de l'abondance en arginine et lysine dans les protéines, les peptides générés sont majoritairement d'une taille optimale pour être ionisés et fragmentés en CID. Dans le cas de l'étude de peptides, les ruptures se font essentiellement au niveau de la liaison peptidique (cf. Figure 38). Cette fragmentation a été bien étudiée et répertoriée. La fragmentation des peptides peut produire 3 types d'ions fils qui contiennent l'amine terminal du peptide (nommés a, b, c), et 3 types d'ions qui contiennent le carboxyle terminal du peptide (nommés x, y, z). Avec une faible énergie de collision les ions b et y sont les plus fréquemment observés.

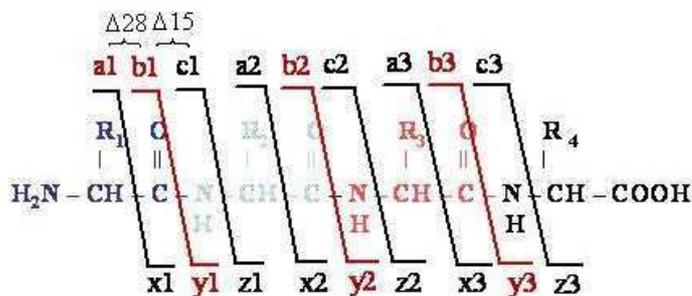


Figure 38 : Différentes possibilités de fragmentations pour un térapeptide. (Bieman, 1990)

Les profils de fragmentation obtenus donnent des informations de structure. Dans notre cas, les séquences peptidiques sont déduites des données de fragmentation après extraction et analyse de la masse du peptide précurseur sélectionné et de ces ions fragments associés. (cf. Figure 39).

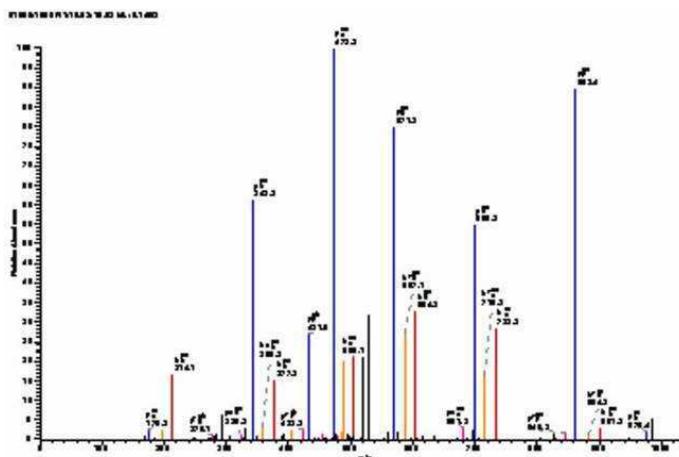


Figure 39 : Exemple de spectre MS/MS d'un peptide bi-charge produit sur LTQ

La fragmentation sur LTQ par collision contre l'hélium (CID = collision induced dissociation) est particulièrement efficace sur des peptides de masse comprise entre 600 et 2 500 Daltons. Des mélanges protéiques complexes peuvent être ainsi analysés, qu'il s'agisse d'extraits protéiques, de spots d'électrophorèse bidimensionnelle, ou encore comme dans notre cas de bandes issues de gel SDS-PAGE.

5.4.1.6 Séparation chromatographique des peptides

Très souvent, et comme cela a été le cas pour les travaux réalisés, le spectromètre de masse est couplé à une chaîne chromatographique. On parle dans ce cas de LC-MS/MS. L'étape chromatographique a pour objet d'opérer une séparation préalable du mélange de peptide avant son introduction dans le spectromètre de masse. Classiquement, la séparation des peptides est réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec une nano-colonne à polarité de phase inversée de type C18.

Cette configuration présente de nombreux avantages pour l'analyse des peptides.

- ✓ une concentration du peptide

- ✓ un couplage direct entre la chaîne de chromatographie et le spectromètre de masse par une source nano-électrospray.
- ✓ une analyse efficace de mélanges de peptidiques complexes : chaque peptide élué à un temps de rétention donné, est analysé en fournissant des informations de séquence, conduisant à l'identification des protéines distinctes.

Dans certains cas, essentiellement sur des génomes séquencés, il est possible d'analyser l'ensemble des protéines exprimées par une cellule (Yates 3rd *et al.*, 1999). Pour cela, des systèmes chromatographiques multidimensionnels (MDLC) en ligne sont utilisés et combinent en général au moins deux principes séparatifs distincts. Généralement une première séparation des peptides est réalisée sur colonne échangeuse de cations, suivi d'une séparation sur colonne à polarité de phase inversée. On parle dans ce cas de chromatographie multidimensionnelle de type 2DLC-MS/MS.

5.4.1.7 Analyse des données de spectrométrie de masse

L'analyse des spectres de fragmentation (MS/MS) dépend du type de spectromètre de masse et plus particulièrement de la résolution et de la précision obtenue sur la masse des ions fils. Cette analyse de données peut être réalisée par différents types de logiciels spécialisés qui conduisent à valider la présence de protéines au sein d'un échantillon. Il existe donc différentes procédures qui conduisent à l'identification des protéines et ce systématiquement contre une base de données. Certains modes d'analyses des données permettent d'identifier un peptide en s'affranchissant de l'étape d'attribution des ions fils du spectre de fragmentation. D'autres approches nécessitent une interprétation complète ou partielle d'un spectre de fragmentation, afin de le traduire en séquences primaires d'acides aminés. Dans notre cas, nous avons utilisé la suite logiciel Bioworks Browser 3.3 (SEQUEST, Thermo Electron) qui est basée sur la comparaison de liste de masses. Cette approche ne nécessite pas d'étape d'interprétation du spectre de fragmentation. Le logiciel classe les peptides et les protéines identifiés à l'aide de différents scores. Le programme SEQUEST procède en plusieurs étapes : la première consiste à filtrer les spectres trop peu informatifs car pauvres en ions fils pour fiabiliser les identifications et traiter rapidement plusieurs milliers de spectres successivement. L'étape suivante consiste à pré-sélectionner dans une base de données des séquences peptidiques candidates ayant une masse proche des ions précurseurs sélectionnés. Pour chacune des séquences pré-sélectionnées, le logiciel crée une liste de fragments b et y

théoriques et la compare à la liste des fragments expérimentaux (cf. Figure 40). L'analyse de corrélations croisées s'exprime par un score, XCor, qui est dépendant de l'état de charge du peptide avant fragmentation.

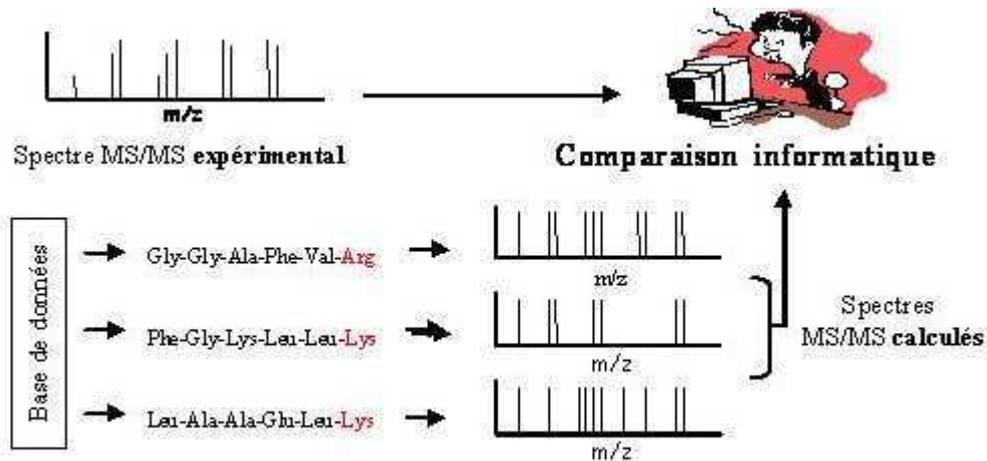


Figure 40 : Comparaison d'un spectre expérimental MS-MS avec des spectres théoriques de peptides sélectionnés dans les bases de données, d'après (Tabb *et al.*, 2001).

Ce type d'approche est particulièrement bien adapté à l'exploitation de nombreux spectres MS/MS. Cependant, elle présente certaines limites et ne peut aboutir à une identification dans certains cas :

- ✓ Quand le peptide est modifié : la masse du précurseur étant différente, la séquence ne peut pas être attribuée correctement.
- ✓ Quand la séquence du peptide est absente de la base de données

Les peptides validés sont ensuite associés à différentes protéines dont ils sont potentiellement issus.

5.4.2 Protocole expérimental et données techniques

Les protéines extraites suivant la procédure décrite par Laemmli (1970), sont séparées comme décrit précédemment sur un gel dénaturant SDS-PAGE. Le gel est coloré à l'aide de Bleu de Coomassie (Sigma-Aldrich France). Les régions du gel étudiées ont été découpées et lavées deux fois à l'aide d'une solution de NH_4HCO_3 50 mM et acétonitrile 50%. Les morceaux de gel sont séchés à température ambiante. Ils sont ensuite digérés par 0,1 μg de

Trypsine (Promega) durant une nuit à 37°C puis resuspendus dans une solution de NH_4HCO_3 50 mM. Les peptides libérés dans le tampon sont regroupés avec les peptides issus de 3 étapes additionnelles d'extraction des peptides du gel :

- Une avec 25 μL de NH_4HCO_3 50 mM
- Une avec 25 μL d'une solution contenant 1% d'acide formique et 50% d'acétonitrile
- Une avec 25 μL d'une solution contenant 1% d'acide formique et 90% d'acétonitrile

Les peptides sont ensuite séchés à l'aide d'un Speed-Vacuum pendant 1 heure puis solubilisés dans 25 μL d'une solution contenant 0,08% d'acide trifluoroacétique et 2% d'acétonitrile. Puis 4 μl du mélange peptidique sont ensuite injectés et analysés par nanoLC-MS/MS.

La séparation des peptides sur nanoLC a été réalisée avec une chaîne Ultimate 3000 (Dionex), connectée par une source d'ionisation nanoélectrospray au spectromètre de masse LTQ (Thermo Fisher). Le mélange de peptides tryptiques, injecté à 20 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, est piégé sur une précolonne PepMap C18 (0,3x5 mm, 3 μm , 100A; Dionex). Après 4 minutes, la précolonne a été connectée à une nanocolonne de séparation Pepmap C18 (0,075 x 150 mm, 100A, 3 μm , Dionex). Les peptides sont principalement séparés par un gradient linéaire de 2 à 36% de tampon B (0,1% acide formique, 80% acétonitrile) en 90 minutes à 0,3 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. La durée totale du gradient est de 145 minutes. L'établissement du spray a été réalisé par application d'une différence de potentielle de 1,3 kiloVolts au moyen d'une jonction liquide sur un capillaire non-coaté (PicoTip EMITER 10 μm tip ID ; New objective). Les peptides ionisés sont ensuite analysés au niveau du spectromètre de masse par une méthode 'data dépendante' que l'on peut décomposer en trois étapes :

- 1) Balayage en MS sur la gamme de masse 300-1500
- 2) Balayage en masse lent avec une plus grande résolution (ZoomScan des 3 ions majoritaires) qui permet de définir l'état de charge de l'ion précurseur sélectionné nécessaire au calcul de sa masse
- 3) Fragmentation : MS/MS sur les 3 ions les plus intenses, précédemment sélectionnés.

Les peptides sont fragmentés par application d'une énergie normalisée de collision fixée à 40% sur les ions mono, di et tri chargés uniquement.

L'identification des protéines a été réalisée à l'aide du logiciel Bioworks 3.3 (Thermo Fisher) en confrontant automatiquement les spectres à une base de données regroupant toutes les séquences protéiques de β -protéobactéries déposées dans GenBank. Cette base de données établie le 8/07/2007 et comprenant 203003 séquences protéiques, a été au préalable clustérisée, ou condensée, à 95% à l'aide du programme CD-HIT. Ceci permet d'éliminer une partie de la redondance en regroupant les protéines présentant 95 à 100% d'homologie sous une seule référence.

Les paramètres de confrontation en base de données utilisés sont pour les peptides :

- d'être spécifiquement issus d'une hydrolyse trypsique avec au maximum un seul clivage manqué
- de présenter comme modification variable une oxydation pour la méthionine
- d'avoir une tolérance de masse fixée à 1,4 Da pour la masse précurseur
- et une tolérance de masse de 0,5 Da pour les fragments produits expérimentaux

Les résultats de la recherche sont également filtrés pour ne garder que les séquences peptidiques les plus fiables :

- Avec un filtre à seuils multiples appliqué aux Xcorr de 1,7, 2,5 et 3,0 respectivement pour les peptides mono-, di- et tri-chargés,
- Une probabilité pour les peptides inférieure à 0,01,
- Un ΔC_n supérieur à 0,1.

Une évaluation de l'abondance peut être réalisée en comptant le nombre de spectres de masse attribué à une protéine identifiée, ou méthode dite de "spectral counting" (Zybailov *et al.*, 2005). Cette première ébauche d'étude comparative ne peut être réalisée que si les échantillons ont été analysés dans des conditions opératoires rigoureusement identiques du point de vue de la séparation en chromatographie, de l'acquisition et du traitement des données produites en spectrométrie de masse.

