

Analyse protéomique de tissus fixés au formaldéhyde

V. Labas, P. Ducrocy, N. Royer, J. Rossier, J. Vinh,

Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire, CNRS/ESPCI UMR 7637,

10, rue Vauquelin, F75231 Paris Cedex 05

INTRODUCTION

Notre objectif est de mettre en œuvre de nouveaux protocoles permettant l'analyse directe de tissus ou cellules fixés utilisant conjointement les technologies d'imagerie par microscopie, les techniques séparatives électrophorétiques et chromatographiques ainsi que l'ensemble des systèmes de caractérisation et d'identification utilisant la spectrométrie de masse. Les échantillons biologiques sont dans la quasi totalité des cas traités pour fixer les divers constituants des tissus ou des cellules et éviter une trop grande dégradation des préparations. Ces traitements, parce qu'ils fixent les tissus en liant entre eux les constituants moléculaires de l'échantillon, impliquent des modifications chimiques des protéines. Ces modifications chimiques induisent des modifications de masse des molécules qui les subissent. Or la masse est précisément la caractéristique majeure sur laquelle s'appuie l'identification de nos espèces, que ce soit par cartographie peptidique ou par séquençage par l'approche MS/MS. Il faut donc auparavant déterminer quelles sont les modifications induites par de tels traitements du point de vue chimique. Cependant les modifications chimiques induites par ces techniques de fixation sont encore à ce jour très mal définies et caractérisées. Les protéines sont les principaux éléments biologiques impliqués dans cette fixation par la formation d'un réseau tridimensionnel covalent permettant ainsi de conserver nombre d'autres molécules. Les aldéhydes comme le formaldéhyde réagissent préférentiellement sur les protéines avec les fonctions -NH₂, libres des acides aminés pour former des ponts méthylènes intra et inter moléculaires. Ces réactifs peuvent aussi interagir avec des cystéines, histidines et tyrosines¹. Le temps et les conditions de fixation semblent être des éléments importants pour l'obtention des différents niveaux de modifications allant de l'addition d'un monomère d'aldéhyde jusqu'à la formation de ponts méthylènes.

SEPARATION SDS-PAGE ET CARACTERISATION DE PROTEINES STANDARDS FIXEES EN SOLUTION AU PARAFORMALDEHYDE 4%

Préparation des échantillons :

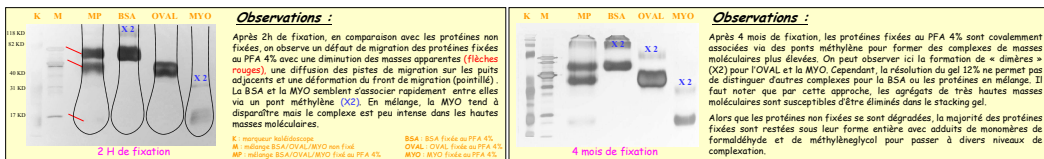
Trois protéines standards telles que le Sérum Albumine Bovine (BSA), l'Ovalbumine (OVAL) et la Myoglobine (MYO) ont été utilisées pour étudier le comportement des protéines en présence de paraformaldéhyde 4% (PFA). Les solutions protéiques (1 µg/µL) sont diluées ou dans une solution de PFA 8% (25 mL PBS 0.01M + 10 gouttes NaOH 1N) ou dans l'eau (témoin). Les protéines isolées ou en mélange (0.5 µg/µL total) sont fixées à l'ambiance pendant 2h, 4 mois et 8 mois.

Gel SDS-PAGE 12%

2µg de protéines isolées ou en mélange sont déposés dans un gel de polyacrylamide (4% stacking gel et 12% running gel, migration 60V pdt 20 min puis 100 V, tampon Tris-Glycine 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, pH 8.3 (Bio Rad), coloration au nitrate d'argent (Amersham Pharmacia Biotech).

Gel SDS-PAGE en gradient

2µg de protéines isolées ou en mélange sont déposés dans un gel à gradient linéaire 4-20% (Bio Rad), migration 60V pdt 20 min puis 100 V, tampon Tris-Glycine 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, pH 8.3 (Bio Rad), coloration au nitrate d'argent (Amersham Pharmacia Biotech).



Conclusion :

Le formaldéhyde a joué son rôle de conservateur en évitant la dégradation des protéines en solution et son rôle de fixateur en associant les protéines entre elles, agrégats très visibles ici après 4 mois de fixation. Ceci confirme que la réaction de fixation des protéines entre elles par la formation de ponts méthylènes est extrêmement lente. Il est très clair que le PFA interagit avec l'environnement électrophorétique limitant ainsi sa résolution. De plus, la technique de gel SDS-PAGE 12% ne permet pas d'observer suffisamment les effets de la fixation sur des protéines.

Digestion dans le gel et analyses MALDI-TOF

Les bandes sont découpées et digérées dans le gel par la trypsine bovine modifiée (Roche) selon la méthode décrite par Shevchenko et al². Après digestion des protéines, les extraits peptidiques sont dessalés par ZipTip C18 (Millipore). L'échantillon est déposé sur la cible selon la méthode de la goutte séchée (v/v: 1:1) utilisant une solution de diméthylsulfoxyde (DMS) dans 10% CH₃CN/TFA aqueux à 0,1%. Les cortices peptidiques sont alors obtenus à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF Voyager DE-STR (Applied Biosystems, Framingham, MA), en mode réflectron positif avec une tension d'accélération de 20 kV, une extraction retardée de 210 ns et environ 250 impulsions laser par acquisition. L'analyse et le traitement des données sont effectués par le logiciel Data Explorer (Applied Biosystems). Tous les spectres obtenus sont étalonnés, d'une part automatiquement en externe et d'autre part en interne sur les produits d'autodigestion de la trypsine. Une erreur de précision de masse inférieure à 0.1 Da est tolérée pour les recherches dans les banques de données non redondantes (NCBI), par l'intermédiaire du logiciel ProteoDiscover.

Observations :

Le gel en gradient permet de visualiser de nombreuses bandes correspondant aux différents complexes protéiques. A 2h de fixation (gel 1), on observe des bandes distinctes avec la fixation de 2 à 5 molécules de MYO (X = nombre d'unités protéiques), 2 molécules d'OVAL et de 2-4 ou plus molécules de BSA. Au cours du temps (8 mois, gel 3), l'intensité de ces bandes diminue pour laisser place à un smear et à une augmentation d'agrégats dans les puits. Par ailleurs, les bandes correspondant aux protéines unitaires restent très intenses. L'augmentation du nombre d'adduits de formaldéhyde étire ces bandes vers les hautes masses moléculaires. Chaque bande du gel 2 (4 mois de fixation) est numérotée, découpée, traitée puis analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF afin d'être caractérisée.

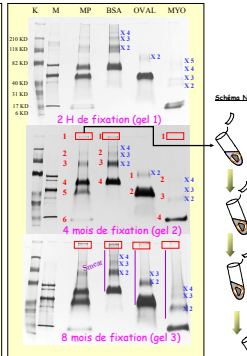


Schéma N°1 :

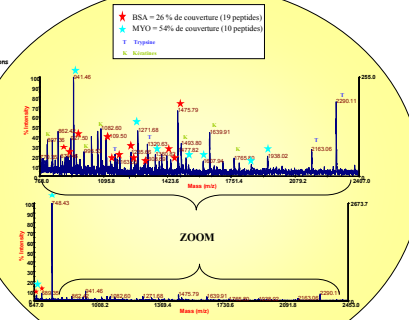
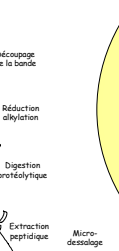


Tableau N°1 : Résultats des recherches d'identification des protéines à 4 mois de fixation

Table with 6 columns: Bande n°, Modification, Nbre de molécules fixées, % de couverture, Nbre de peptides. Rows include BSA, MYO, and OVAL at various fixation times (2h, 4 months, 8 months).

Observations :

Le traitement des différentes bandes protéiques selon le schéma n°1 permet d'obtenir des cartographies peptidiques pour les protéines standards fixées, isolées ou en mélange, entraînant leur identification sans ambiguïté. Il est très important de noter qu'une modification induite par le fixateur n'est visible dans les spectres. Après traitement et analyse de l'agrégat resté dans le puit MP, correspondant au mélange des 3 protéines fixées pendant 4 mois (spectre n°1), il est possible d'identifier la BSA avec 26% de couverture avec 19 peptides, la MYO avec 54% de couverture avec 10 peptides, les kératines et la trypsine. Tous les pics du spectre ont ainsi été attribués. Seule l'OVAL n'a pas été mise en évidence dans cet échantillon. Cependant, il semblerait que les caractéristiques bio- et physicochimiques de cette protéine favorisent ses modifications induites par le formaldéhyde tel que le pont méthylène, limitant ainsi la présence de l'OVAL dans les hautes poids moléculaires. D'après le tableau n°1, après une période de 4 mois de fixation, il est possible d'identifier toutes les protéines sous le forme dégradée, de 2 à 4 monomères associés ou sous forme unitaire, avec des % de couverture et un nombre de peptides attribués observés habituellement pour des protéines n'ayant subi aucun traitement de fixation au préalable.

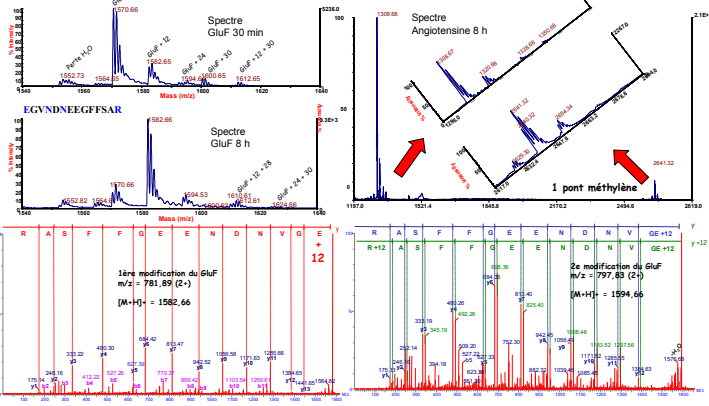
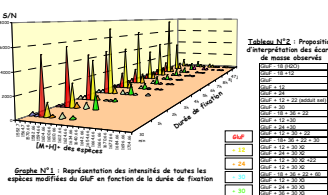
Conclusion :

L'utilisation de gels de polyacrylamide en gradient linéaire 4-20% a permis de mettre en évidence de nombreuses modifications protéiques induites par le formaldéhyde (jusqu'à 5 ponts méthylènes pour la MYO) après 4 à 8 mois de fixation seulement. La formation de complexes multiprotéiques est donc une réaction lente. L'analyse protéomique par cartographie peptidique a révélé que les peptides non modifiés sont les seules espèces utiles pour les identifications et sont majoritaires dans les spectres. Ceci permet d'envisager une approche classique de caractérisation protéique. Les outils classiques de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) ont donc été utilisés pour l'identification des protéines d'intérêt fixées en solution au PFA et séparées par SDS-PAGE, et sans nécessairement prendre en compte d'autres modifications particulières à intégrer dans les logiciels de recherches dans les banques.

CINETIQUE DE FIXATION SUR DES PEPTIDES STANDARDS FIXES AU PFA 4% ET MISE EN EVIDENCE DES MODIFICATIONS

Cinétique de fixation et analyses MS

Angiotensine I (Novabiochem - séquence : DRVYIHPFHL) et GluI-Fibrinopeptide (Sigma - séquence EGVNDNEEGFSAR) sont préparés à 0,5 nmol/µL dans une solution de PFA 4%. Chaque solution peptidique est conservée à l'ambiance, sans agitation, pdt 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h et 47 jours. La réaction de fixation est arrêtée par congélation à -20°C. Après décongélation, 1µL de ces solutions est dilué au 1/10 après sonication dans le liquide formique 1% puis dessalés sur phase C18 Zip Tip (Millipore). Les peptides sont déposés avec un même volume de DHB 3 saturée (CH₃CN/0,1%TFA eq. 1:9) pour analyse MALDI-TOF (Voyager DE-STR, Applied Biosystems, Applied). Pour tous les temps de fixation du GluI et pour chacune des espèces peptidiques modifiées, le rapport signal sur bruit (S/N) est reporté dans le graphique n°1.



Analyses MS/MS

Les analyses MS/MS ont été réalisées sur les peptides GluI et Angiotensine après 2h de fixation. Les peptides dessalés et élués dans une solution CH₃CN/acide formique 1% 8:2 sont directement analysés en infusion directe en nanoESI (aiguilles Proxeon, Odense, DK) en mode MS/MS avec un spectromètre de masse hybride QToF2 (Waters, Manchester, UK) avec une énergie de collision de l'ordre de 10 à 40 eV. Les analyses MS/MS sont réalisées sous argon sur les espèces bichargées uniquement.

Conclusion :

Il a déjà été décrit dans la littérature¹ que le formaldéhyde a la capacité de réagir avec les groupements aminés des résidus N-terminaux mais également avec les chaînes latérales des résidus Lys, Arg, His et Cys et autres groupes. D'après l'étude cinétique, la fixation du formaldéhyde sur les peptides est relativement lente. La proportion des espèces peptidiques totale dans le temps pour atteindre des formes de plus en plus modifiées jusqu'à la disparition totale des peptides intacts. De nombreuses combinaisons de modifications sont observées avec un nombre croissant de monomères d'aldéhyde fixé (Δm = +12Da, +24Da, +36Da, etc) ou de groupements méthyle glycol (Δm = +30Da, +60Da, etc) pour enfin former un ou plusieurs ponts méthyle. Cependant, différents niveaux de fixation sont observés en fonction de la séquence peptidique. L'étude de la fixation du formaldéhyde par MS/MS sur les peptides GluI et Angiotensine montre que les premières modifications induites (Δm = +12Da, +24Da) par l'aldéhyde portent systématiquement sur le N-terminal et les résidus Arg. Cependant, il semble beaucoup plus difficile d'appliquer une règle pour les résidus suivants. De plus, pour une masse peptidique avec un Δm donné, il n'est pas rare d'observer la modification à des sites variables.

CONCLUSION

Ces études préliminaires ont permis de mieux comprendre les difficultés rencontrées lors d'une analyse protéomique de protéines et peptides fixés en solution par le formaldéhyde. Ce fixateur joue un très bon rôle de conservateur en limitant la dégradation des échantillons biologiques tout en modifiant, tant les protéines que les peptides, mais de façon relativement lente. Ces études montrent que l'analyse protéomique de fluides biologiques conservés en présence de formaldéhyde, pendant plusieurs mois, peut être appliquée par une approche SDS-PAGE et LC-MS/MS. En effet, après 4 mois de fixation, la formation de ponts intra et intermoléculaires entre la BSA, MYO et OVAL et de modifications diverses n'entraînent pas leur identification. Par la possible réversion des modifications induites par le fixateur lors des étapes de réduction/alkylation-digestion, nous sommes en mesure d'employer des outils de spectrométrie de masse classique de type MS, MS/MS et/ou LC-MS/MS pour une caractérisation protéomique sur des tissus entiers. L'absence de peptides modifiés après traitement des échantillons permet ainsi des identifications protéiques dans les banques de données, sans avoir à intégrer de modifications particulières dans les logiciels de recherche. En revanche, l'analyse directe de peptides fixés semble beaucoup plus difficile. La fixation de méthyle glycol Δm = +30Da (formaldéhyde aqueux) est extrêmement labile et ne permet pas de visualiser les sites de liaison. Forme intermédiaire avant le raménagement par l'aldéhyde avec Δm=+12Da, le méthyle glycole multiplie le nombre d'espèces ioniques observables pour un peptide donné. Les premières modifications stables (Δm=+12Da et +24Da) s'effectuent systématiquement sur le N-ter de tous les peptides puis sur les Arg (pour le GluI et l'Angiotensine) et les Lys¹. Les autres modifications sont en cours de caractérisation mais il est déjà clair que la séquence en acides aminés est un facteur important pour définir leur nombre mais plus particulièrement pour la formation de pont méthyle. En effet, pour un nombre équivalent de sites potentiels de modifications, l'Angiotensine présente un pont méthyle après 8h de fixation alors que le GluI n'en présente aucun au bout de 47 jours de fixation.

REFERENCES

1. Metz B, et al. Identification of Formaldehyde-induced Modifications in Proteins. J Biol Chem. 2004 Feb 20;279(8):6235-43.
2. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem. 68 : 850-858.
3. Redeker V, Toullez JV, Vinh J, Rossier J, Soyez D. 1998. Combination of Peptide profiling by MALDI-TOF mass spectrometry and Immunodetection on Single Glial Cells. Anal Chem. 70 : 1805-1811.