

Anne-Marie HESSE, Paulo MARCELO, Jean ROSSIER, Joëlle VINH

Spectrométrie de Masse Biologique et Neuroprotéome  
ESPCI UMR 7637 CNRS, PARIS, France, www.bio.espci.fr/spectro/  
anne-marie.hesse@espci.fr

La Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC/MS) est couramment utilisée pour l'identification et le séquençage de protéines et de peptides. Pourtant, certains composés sont connus pour interférer avec l'analyse des peptides ionisés par électrospray (ESI) connecté ou non avec des systèmes chromatographiques mono ou bidimensionnels (LC 1D ou 2D)<sup>1</sup>. Même si des solvants et des réactifs de grande qualité sont choisis avec attention, il est reconnu au sein de la communauté protéomique que certaines impuretés peuvent subsister et interférer avec les analyses. Certaines sont observées indépendamment de tout système LC et sont dues à des contaminants volatils dans l'air comme les polydiméthylsiloxanes (PMO), qui sont ainsi utilisés comme étalons internes. D'autres comme les polyéthylène glycols (PEGs) proviennent du système LC et sont élués à des temps de rétentions spécifiques. Ce sont ces contaminants qui doivent être éliminés en priorité. Dans ce but, nous avons modifié nos configurations LC 1D et 2D couplées à des spectromètres de masse de type FTMS alliant sensibilité, haute résolution, et haute précision de masse (LTQ-FT et LTQ Orbitrap). Nous avons d'abord tenté d'identifier la source de contamination puis d'éliminer ces contaminants en utilisant un système de piégeage en ligne auto régénérant. Cette modification simple et robuste nous a démontré que ces impuretés influent sur la qualité des analyses 1D- et 2D- LC-MS du fait d'un fort effet de suppression spectrale dans la mesure où ces polymères sont élués dans la même fenêtre de temps de rétention que les peptides tryptiques d'intérêt. Nous présentons ici une méthode simple, robuste et auto régénérante d'élimination en ligne de contaminants très communs observés dans les profils LC-MS.

## METHODES

**Échantillon standard** : 6 protéines de 11 kDa à 135 kDa (Cytochrome C, Lysozyme, Alcool deshydrogénase, Sérum albumine bovine, Sérotransferrine et  $\beta$ -Galactosidase, Dionex, Amsterdam, Pays Bas) digérées par la trypsi.

**Séparation LC 1D** : Séparation par polarité de phase inversée (RP-LC)

Systèmes chromatographiques : Ultimate 3000 (Dionex) et NanoLC 1200 (Agilent Technologies, CA, USA).

Précolonne : C18 PepMap100, 3  $\mu$ m, 300 $\mu$ m d.i., longueur 5 mm, Dionex (Zorbax 300SB-C18, 5 $\mu$ m, 300Å, 300 $\mu$ m d.i., longueur 5mm, Agilent Technologies) chargement 15 $\mu$ L solvant A

Colonne analytique : C18 PepMap100, 3  $\mu$ m, 100 Å, 75  $\mu$ m d.i., longueur 15 cm, Dionex (Zorbax, 300SB-C18, 3,5  $\mu$ m, 300 Å, 75  $\mu$ m d.i., longueur 15 cm, Agilent Technologies).

Gradient linéaire : 0 à 50% de B en 35min, débit 220nL/min (solvant A: H<sub>2</sub>O/ACN/AF, 98/2/0,1, v/v/v, solvant B: H<sub>2</sub>O/ACN/AF, 10/90/0,1, v/v/v).

Pour éliminer les contaminants, une cartouche de purification (C18 PepMap100, 5 $\mu$ m, 100 Å, 1 mm d.i., longueur 15 mm, Dionex) est placée entre la pompe de chargement et la vanne d'injection dans le système 1D (Figure 1). Après injection de l'échantillon, cette cartouche est nettoyée par du solvant B pendant 25min à 40 $\mu$ L/min (Figure 2).

**Séparation LC 2D** :

Système chromatographique : Dual Ultimate 3000 (Dionex)

Dimension 1 : Séparation par échange de cations

Colonne : BioBasic SCX 5 $\mu$ m, 300 Å, 0,32mm d.i., longueur 15cm (ThermoFisher Scientific, CA, USA)

Gradient multilinéaire de 0 à 100mM de formate d'ammonium pH=3, 5% ACN (v/v) composé d'une succession de 14 pentes différentes de 71min, débit 2  $\mu$ L/min. La vanne V2 permet de piéger alternativement les peptides élués de la colonne SCX sur la précolonne 1 ou 2. Une fois les peptides dessalés par du solvant A, la vanne V1 bascule pour mettre la précolonne en ligne avec la colonne analytique pour une séparation à polarité de phase inversée décrite ci-dessus (colonnes Dionex).

Pour éliminer les contaminants, deux cartouches, précédemment décrites, sont insérées après la pompe de chargement 2 et la micro pompe (Figure 3). Ces cartouches sont régulièrement régénérées après nettoyage par un palier de solvant B à 40 $\mu$ L/min.

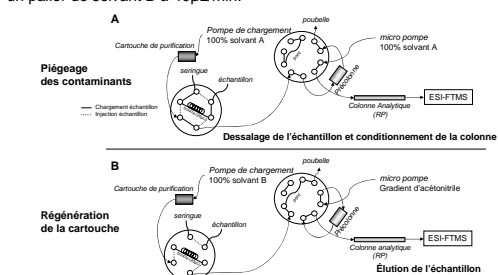


Figure 1 : Configuration du système LC 1D développé pour l'élimination des polymères

Analyse par spectrométrie de masse : LTQ-FT et LTQ-Orbitrap (ThermoFisher Scientific).

LTQ-FT : Alternance automatique entre les modes MS et MS/MS : un FTMS survey scan (gamme 500-2000Th) suivi de 3 FTMS SIM scan en parallèle de 3 MS/MS dans le LTQ<sup>2</sup>.

LTQ-Orbitrap : alternance automatique entre un FTMS survey scan (gamme 500-2000Th) avec 3 à 7 MS/MS dans le LTQ.

**Identification des protéines** : Recherches réalisées sur Mascot 2.2 (Matrix Science) dans UniprotSwissprot 9.6 ; critères : digestion tryptique, 2 *misscleavages*, carbamidométhylation, carboxyméthylation, déprotonation des cystéines, oxydation et dioxydation de méthionines, oxydation des histidines et des tryptophanes, déamidation des asparagines et des glutamines et carbamylation Nter, en modifications partielles. Critères de validation<sup>3</sup> : au moins deux peptides différents identifiés en premier candidat pour la protéine avec un score supérieur à 30. La tolérance de masse est fixée à 10ppm en MS et 1Da en MS/MS.

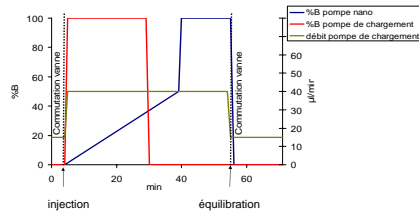


Figure 2 : Gradient utilisé en configuration 1D

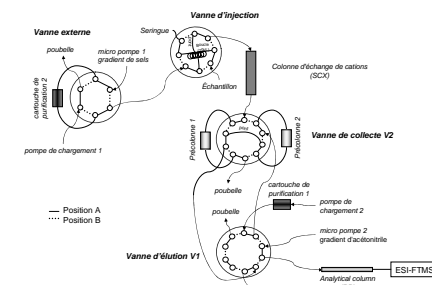


Figure 3 : Configuration du système LC 2D développé pour l'élimination des polymères

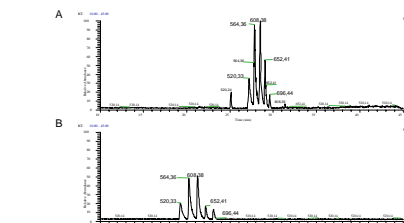


Figure 4 : Chromatogrammes sur les systèmes 1D Dionex (A) et Agilent (B) sans cartouche de purification (extraction des ions 520,3, 564,4, 608,4, 652,4, 696,4)

### RESULTATS

Polymère MH+	t <sub>r</sub> (min)	k	% acetonitrile	N (m-1)
520.333	27,2	1,95	36,2	405000
564.358	27,8	2,02	36,9	793000
608.385	28,5	2,09	37,8	750000
652.412	29,1	2,16	38,6	1080000
696.438	29,6	2,21	39,2	1260000
740.465	30,1	2,26	39,8	925000
784.491	30,6	2,32	40,5	1350000

Tableau 1 : Caractéristiques chromatographiques des pics de PEGs observés sur le système Dionex en configuration 1D-RP-LC

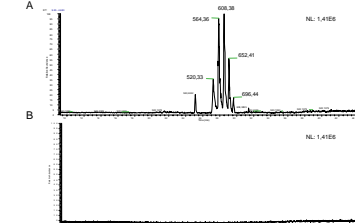


Figure 5 : Chromatogrammes sur le système 1D Dionex sans (A) et avec (B) cartouche de purification (extraction des ions 520,3, 564,4, 608,4, 652,4, 696,4)

Au cours de toutes nos analyses RP-LC-MS/MS, différents pics contaminants élués à des temps de rétention reproductibles sur une gamme de temps d'environ 3 min (Tableau 1) ont été détectés. Ces pics dont les masses sont séparés de 44,026 Da présentent le motif bien connu des polyéthylène glycols et pouvaient atteindre jusqu'à 2000 de rapport S/B (Figure 5A). Ces contaminants ne sont pas directement détectables dans les solvants ou les produits chimiques ni dans les analyses sans précolonne. Différents systèmes LC (Ultimate 3000 Dionex et 1200 LC Agilent Technologies, Figure 4), différents acides (type, lot et fournisseur) ont été testés sans réel changement. Comme souligné par une récente étude<sup>4</sup>, nous avons observé que ces polymères disparaissaient quand nous enlevions la précolonne (non présente) et en avons conclu que ces polymères étaient enrichis sur la phase stationnaire de la précolonne. C'est pourquoi nous avons inséré une cartouche de purification entre la sortie de la pompe de chargement et la vanne d'injection pour éliminer continuellement la contamination de polymères. Pour éviter de saturer la cartouche, celle-ci est régénérée par un palier de solvant B à 40 $\mu$ L/min en parallèle du gradient analytique. Ainsi tous les contaminants sont éliminés. (Figure 5B).

Protéine	Numéro d'accession	Nombre de peptides		Score protéine	
		Sans cartouche	Avec Cartouche	Sans Cartouche	Avec Cartouche
Beta-galactosidase	P00722	1	11	58	270
Serum albumin precursor	P02769	12	20	538	524
Serumtransferrin	Q29443	7	25	323	728
Alcool dehydrogenase 1	P00330	4	7	148	193
Lysozyme C precursor	P00698	2	5	71	248
Cytochrome c	P00015	2	2	128	65

Tableau 2 : Identification de 20fmol de standard sans et avec cartouche de purification

Nous avons analysé un mélange standard de protéines (quantité protéique totale : 20 fmol) sur notre système LC 1D avec et sans cartouche de purification. Sans piégeage des polymères, l'identification de la  $\beta$ -galactosidase n'est pas validée et le cytochrome C et le lysozyme C ne sont identifiés que par deux peptides (Tableau 2). De plus, seuls 28 peptides différents sont validés pour l'ensemble des protéines. Après introduction de la cartouche de piégeage, toutes les protéines sont identifiées avec au moins deux peptides et 70 peptides différents sont validés. Ce test a été régulièrement répété afin de vérifier l'efficacité et la robustesse du système durant plusieurs mois.

Dans nos analyses LC 2D, les pics de contamination sont observés sur le chromatogramme de chaque fraction SCX (Figure 6A) avec un rapport S/B jusqu'à 1300. Nous avons utilisé une approche similaire à la LC 1D en insérant une cartouche de purification sur le circuit de phase inversée après la pompe de chargement 2 (Figure 3). Les pics de polymères sont toujours observés avec un rapport S/B de 300 (Figure 6B). Nous avons donc dû supprimer les contaminants sur le circuit de la première dimension : une seconde cartouche de purification a été insérée après la micro pompe 1. Afin de régénérer la phase C18, cette cartouche est rincée par un palier de solvant B à 40 $\mu$ L/min en parallèle de la dernière fraction SCX. Les pics de PEGs sont alors toujours observés mais avec un rapport S/B de 50 (Figure 6C), bien inférieur à l'intensité du bruit de fond généré par l'ion PMO de rapport m/z 536,170 Da (S/B 200). D'après une récente étude, la poudre de formate d'ammonium serait plus contaminée que l'acide formique<sup>5</sup>. En plus des deux cartouches de purification, nous préparons donc depuis notre tampon avec de l'acide formique 99-100%, de l'ammoniaque 25% et du TFA. Plus aucune trace de contamination n'est alors détectable (Figure 6D).

Nous avons démontré que les séries de polymères communément observés, le sont quel que soit le spectromètre de masse ou la chaîne LC utilisés, le lot ou le fournisseur de solvants et de produits chimiques employés. Ces contaminants peuvent être préjudiciables envers la qualité des analyses LC 1D ou LC 2D. Ce travail présente des solutions robustes et simples afin de réduire drastiquement et durablement ces impuretés en utilisant une purification en ligne de la phase mobile par des cartouches de purification avec auto régénération du système. Ainsi nos analyses de LC-MS sont significativement améliorées en termes de sensibilité, de gamme dynamique et de capacité de pics. Après validation sur des échantillons standards, nous avons modifié toutes les configurations LC de notre laboratoire de la même façon.

## REFERENCES

1 Emmett M. R. et al. (1994), J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 5  
2 Olsen J. V. et al. (2004), Mol. Cell. Proteomics. 3 (6)  
3 Kapp, E. A. et al. (2005), Proteomics 5 (13)  
4 Mihailova A. et al. (2006), J. Sep. Sci. 29 (4)

Remerciements : Nous remercions L'Oréal pour la bourse de thèse d'Anne-Marie Hesse ; le RNG et le FRRT pour leur soutien financier