

Emmanuelle DEMEY, Emie DURIGHELLO, Marie COUZINIÉ, Séga NDIAYE et Joëlle VINH  
EPCI ParisTech CNRS USR3149 - SMBP: 10 rue Vauquelin 75231 Paris cedex 05

La digestion des protéines [1, 2] a connu ces dernières années une avancée importante par sa combinaison avec la spectrométrie de masse. Cependant la préparation des échantillons reste un facteur limitant dans l'identification à grande échelle, lors de la quantification de protéines sensibles, notamment dans les études de quantification ou d'interaction protéique. Les étapes clés de la protéomique bottom-up est la digestion protéique. Klimek [3] utilise pour la préparation d'un mélange standard de 18 protéines, la digestion conventionnelle (incubation à 37°C entre 2 et 16h), et la digestion par ultrasons [2], à l'aide d'un sonde ultrasonique. La digestion par micro-ondes, existe depuis plus de trente ans. Depuis quelques années, de nouvelles techniques de digestion impliquant les micro-ondes ont fait leur apparition, allant du séquençage par hydrolyse [4] à la digestion enzymatique [5]. Ainsi, l'usage des micro-ondes induit un processus de rotation des molécules, basé sur leur moment dipolaire [6] : l'échauffement ainsi généré induit une accélération des réactions chimiques et une efficacité accrue. Cependant de nombreuses mises au point sont nécessaires pour adapter les conditions les plus adaptées.

## MATERIEL & METHODES

### But de l'étude

- Tester des trypsines d'origine différentes (porcine, bovine...) en digestion liquide, pour connaître leur efficacité et fixer certains paramètres opératoires.
- Évaluer l'influence du choix des consommables employés qui peut avoir une répercussion non négligeable sur les résultats.
- Optimiser les conditions opératoires afin de reproduire un résultat de digestion au moins équivalent au contrôle manuel et ce, pour des quantités très faibles de matériel biologique dans des temps réduits.

### Matériel biologique / Enzymes :

- Mise au point des conditions de travail réalisée sur différentes concentrations de protéine standard BSA (Sigma A3059)

- Trypsines utilisées :

Désignation (Code étude)	Espèce
Roche (1)	Bovine
Promega (2)	Porcine
Promega Gold (3)	Porcine
Sigma (4)	Porcine

**Digestion :** Précédée par une étape de réduction/alkylation réalisée manuellement (DTT 5mM final, 30min, 56°C / Iodoacétamide 25mM final 20min)

**Tubes :** 3 lots à disposition (spécificité : faible taux de rétention de peptides)

Conventionnel	Micro-ondes	Ultrasons	Code Etude	Fournisseurs
thermomixer TX	MO	US	Lot 1	Treff lab 1.5ml
2h / 37°C	15min / 55°C	30s / 4°C	Lot 2	Epp. Lobind 1.5ml
sous agitation douce	puissance par défaut de 50W	Puissance 75W	Lot 3	Axygen 1.5ml

### MALDI-TOF/TOF 4800 (Applera Applied)

Dépôt CHCA 4mg/ml et calibration externe de la plaque (standard - Proteomix Peptide mix4 Laserbiolab)  
- Acquisition automatique (mode positif / réflectron / tirs 4000/ laser 2500/ 700-4000 Da)  
- Cartographies peptidiques : GPS Explorer™ (Applied Biosystems)

### MALDI LTQ Orbitrap (Orbitrap XL ThermoFisher Scientific., USA)

- Dépôt CHCA 4mg/ml  
- FTMS Full scan 815-4000 Da / Energie laser 2000 mJ  
- AGC on (Automatic Gain Control)  
- Résolution 60000 / 5 Microscans / CPS on (Détection automatique des cristaux de matrice)  
- AS off (Filtre Automatique des spectres)

Cartographies peptidiques : GPS Explorer™ (Applied Biosystems)/ Mascot Distiller™ (Matrix Science)  
Recherches : MASCOT, 2 MC, précision MS: TOF 50ppm/ Orbi 2ppm  
Modifications partielles: Carbamidométhylation (C), oxydation (M)

### MICRO-ONDE DISCOVER™ System Single-Mode (CEM)

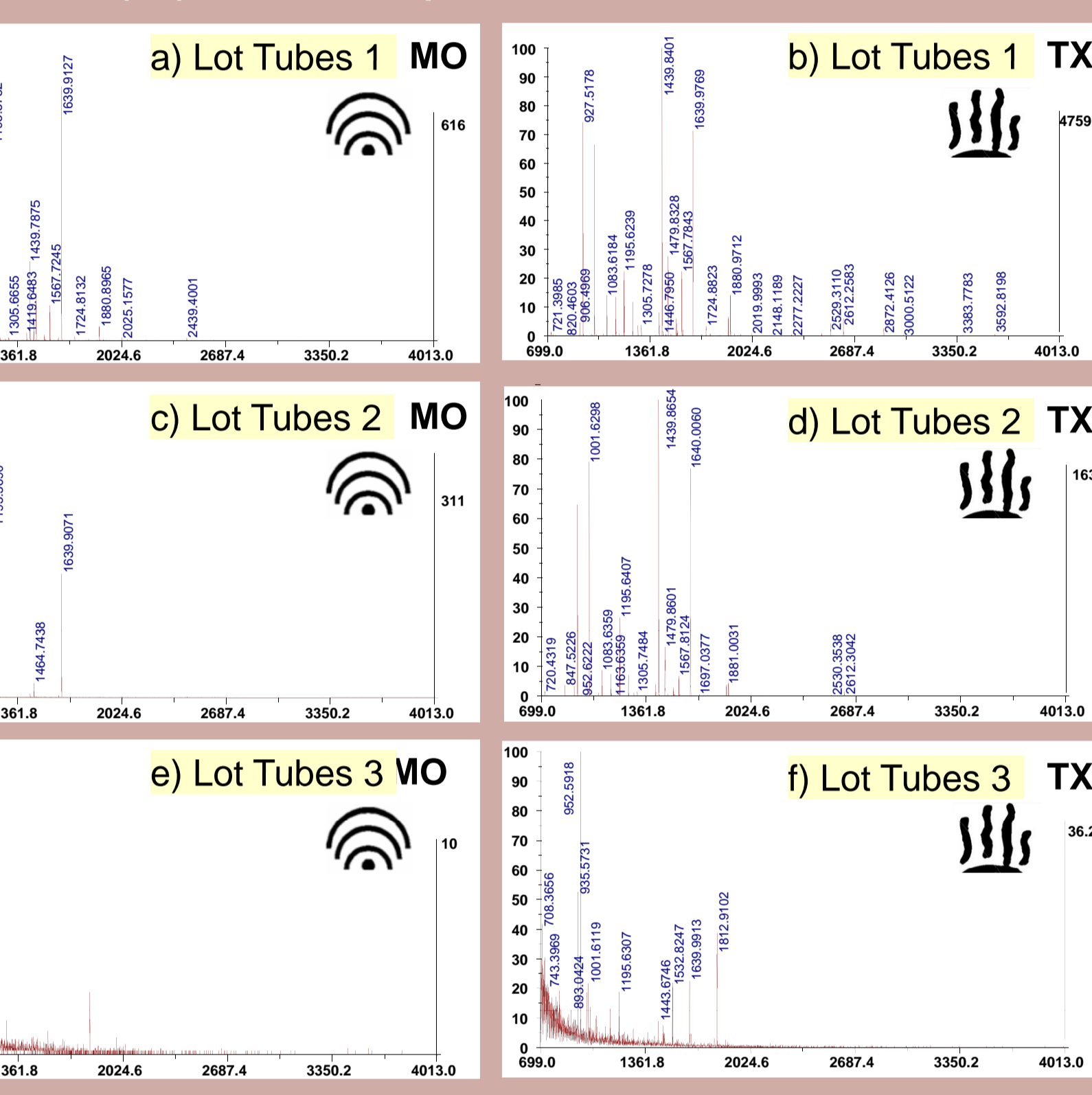
de type réacteur ouvert, température contrôlée par une sonde fibre optique et régulée par air comprimé

### MICROSON Ultrasonic Cell disruptor (model XL2007)

## PARTIE 1 : CHOIX DES CONSOMMABLES

La stabilité des tubes (relargage de polymères, perte de matériel...) doit être testée vis à vis des ultrasons et des micro-ondes. Nous avons testé 3 types de microtubes en polypropylène dédiés à l'analyse des protéines (moins de rétention), sur un volume de 100µl, puis 20µl, pour reproduire les conditions de digestions fréquemment rencontrées au laboratoire. Les digestions sont analysées par MALDI-TOF/TOF.

### Comparaison digestion Micro-ondes (MO) vs Thermomixer (TX) BSA 25fmol/µl sur 3 lots de tubes



Les résultats des spectres e) et f) nous conduisent à abandonner le lot3. La faible intensité des peptides de BSA retrouvés pour tous les modes de digestion peut être due à une perte de peptides accentuée par la nébulisation engendrée par les micro-ondes.

L'aspect visuel des tubes montre également une différence d'opacité (lot1 translucide/ lot2 légèrement opaque) et d'épaisseur (lot1 plus fin). La nature du plastique peut influencer sur le passage des ondes électromagnétiques et donc modifier la qualité de la digestion.

Le traitement même du tube et sa nature peuvent jouer un rôle non négligeable sur les phénomènes d'adsorption des peptides à la surface du tube. Cependant pour les lots 1 et 2 l'intensité des peptides des spectres n'est jamais équivalente aux spectres témoins TX.

L'autre paramètre qu'il nous reste à tester est donc la trypsine elle-même qui pourrait être altérée par les ondes, réduisant ainsi sa capacité enzymatique.

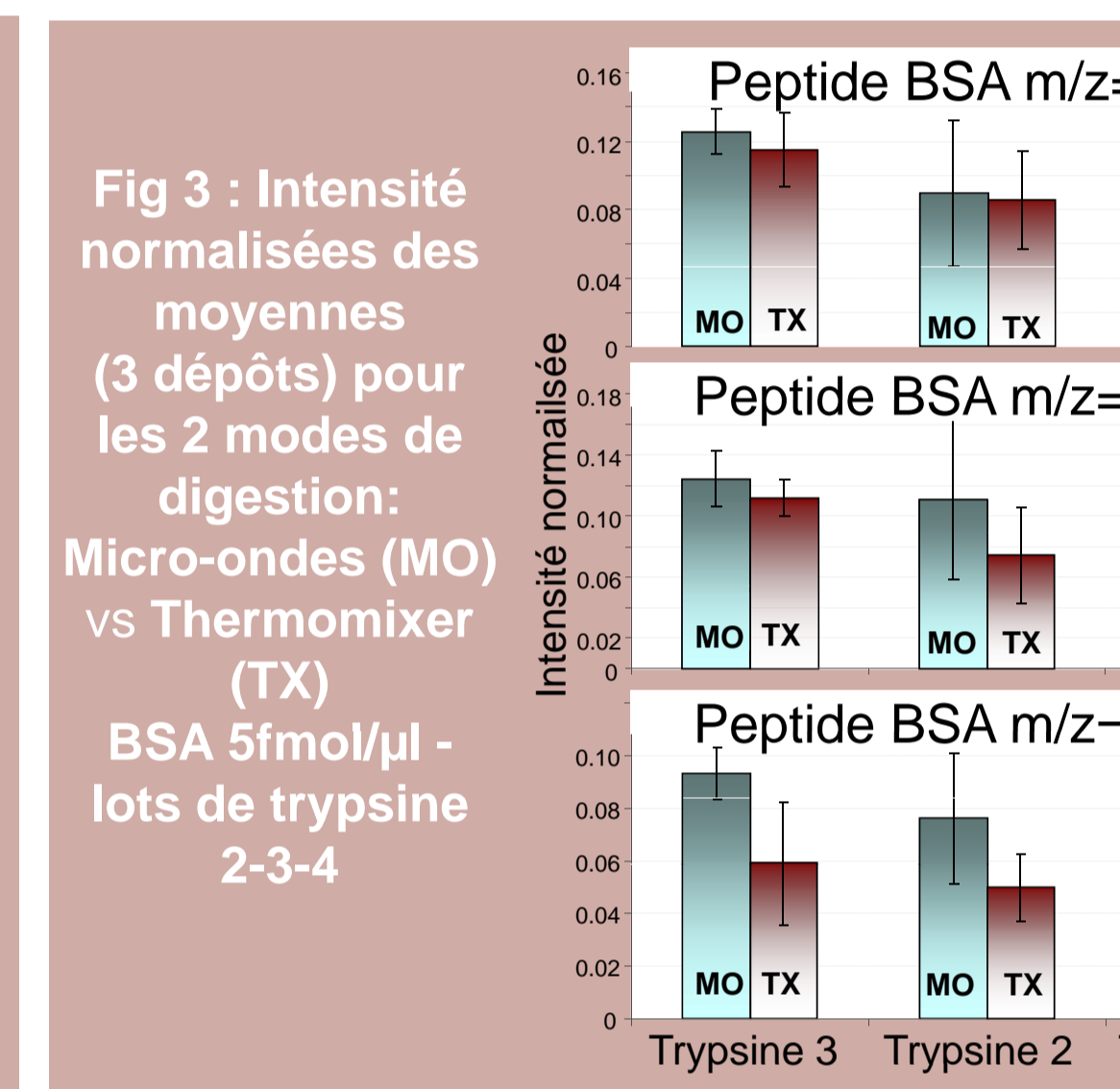
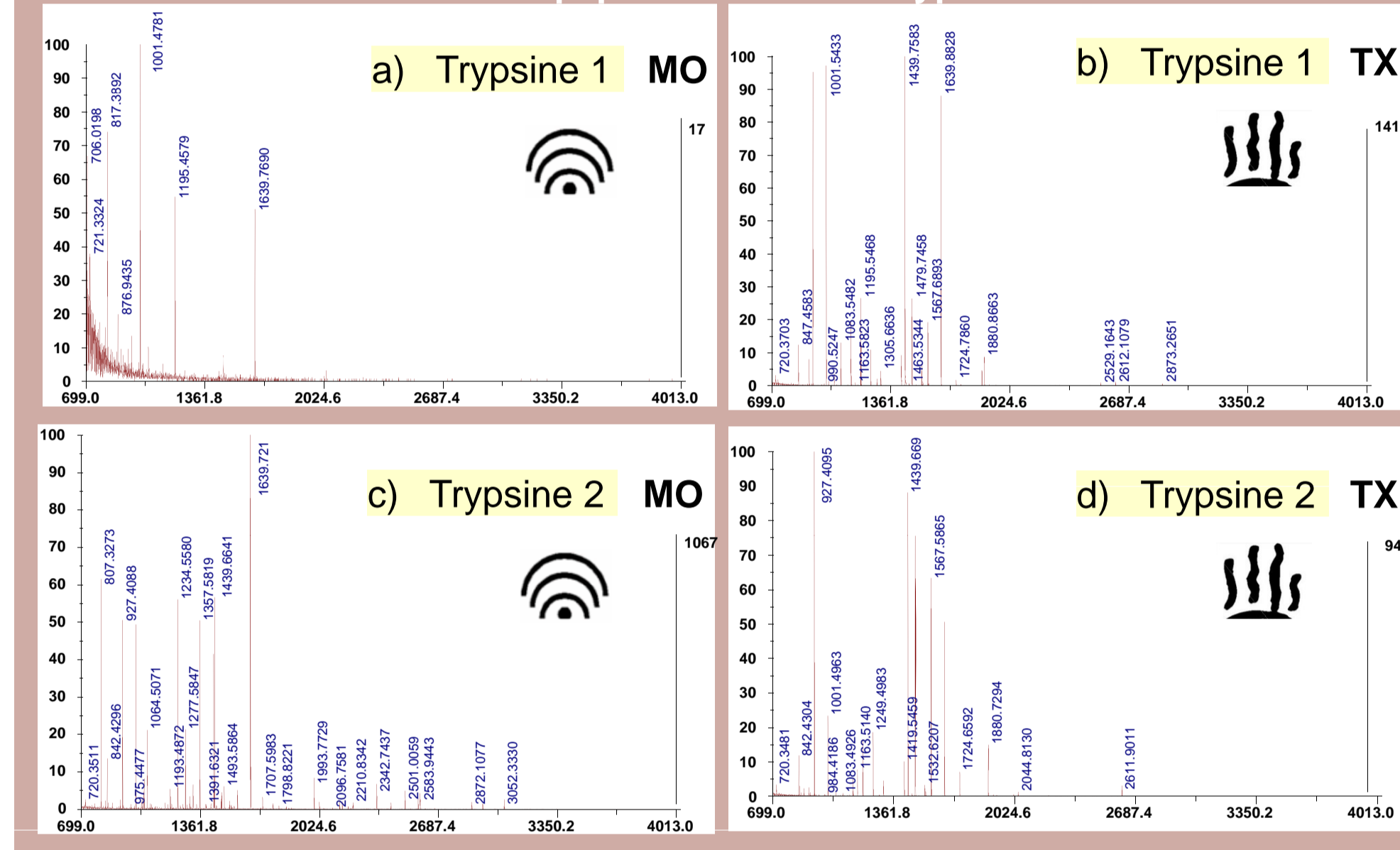
## PARTIE 2 : ETUDE DE LA STABILITE ENZYMATIQUE

L'incidence des micro-ondes/ultrasons sur la qualité de digestion (en fonction de l'origine et/ou des ses modifications...) est un paramètre crucial. Les digestions sont analysées par MALDI-TOF/TOF.

**Test 1:** Les conditions de digestion par défaut: en solution, protocole du laboratoire (thermomixer TX), et pour la digestion au micro-ondes, protocole constructeur (micro-ondes MO). Il s'agit de comparer les enzymes employées.

**Test 2:** Comparaison de trois trypsines porcine par suivi de l'intensité relative de 3 peptides majoritaires issus de la digestion de la BSA.

### Fig 2 : Comparaison digestion Micro-ondes (MO) vs Thermomixer (TX) BSA 5fmol/µl pour les lots de trypsine 1 et 2



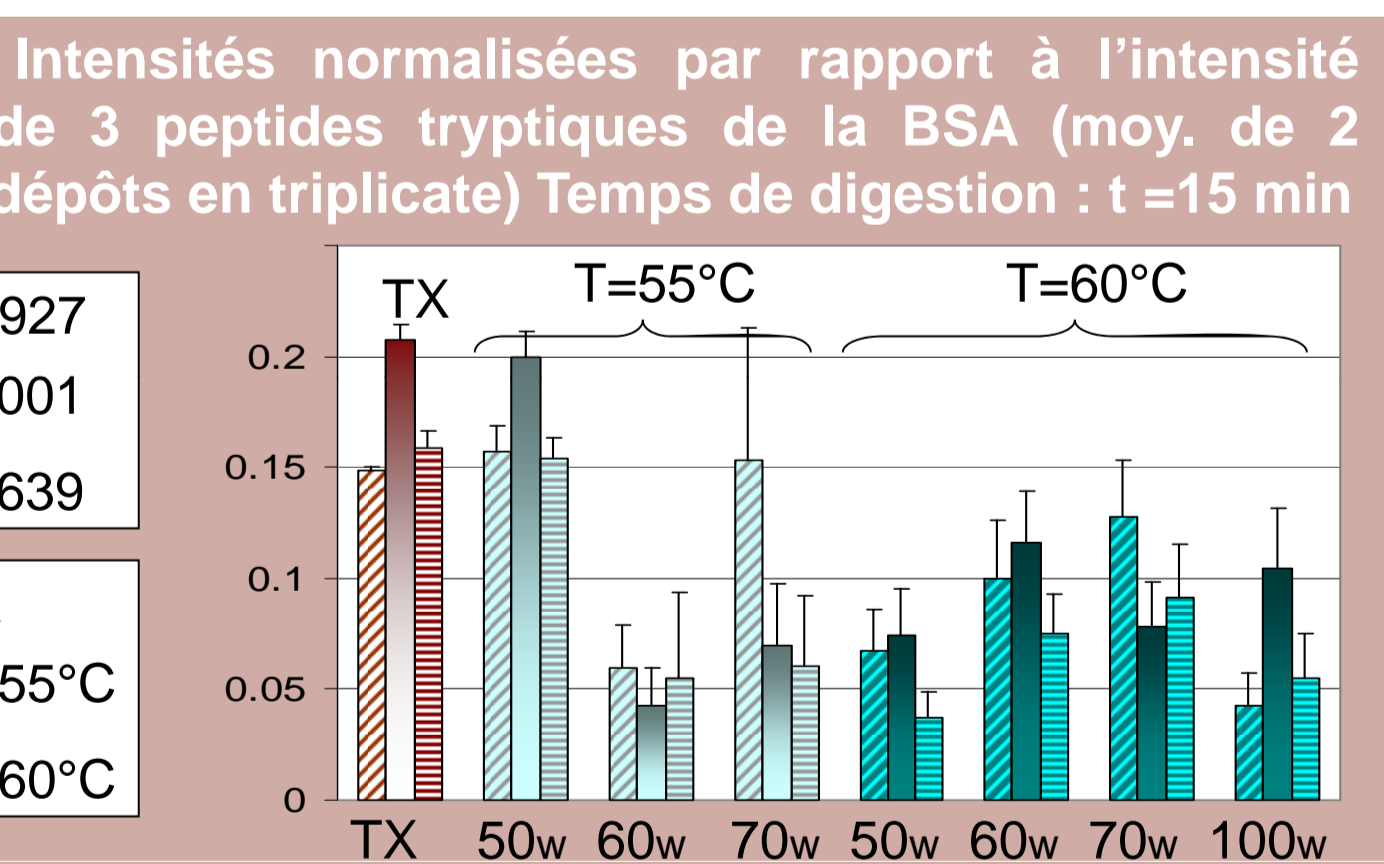
La digestion micro-ondes (fig2-a) avec trypsine 1, ne donne que 5 des peptides les plus intenses de la BSA (voir spectre TX contrôlé), pour des temps de digestion de 15, 25, 30 ou 40min. La trypsine bovine modifiée n'est pas adaptée à la digestion micro-ondes dans les conditions fixées ici. L'expérience est étendue à 2 autres enzymes (porcine, test 2) à disposition au laboratoire, en conservant le lot2 pour comparaison. La trypsine 3 est conservée pour la suite.

## PARAMETRES OPERATOIRES

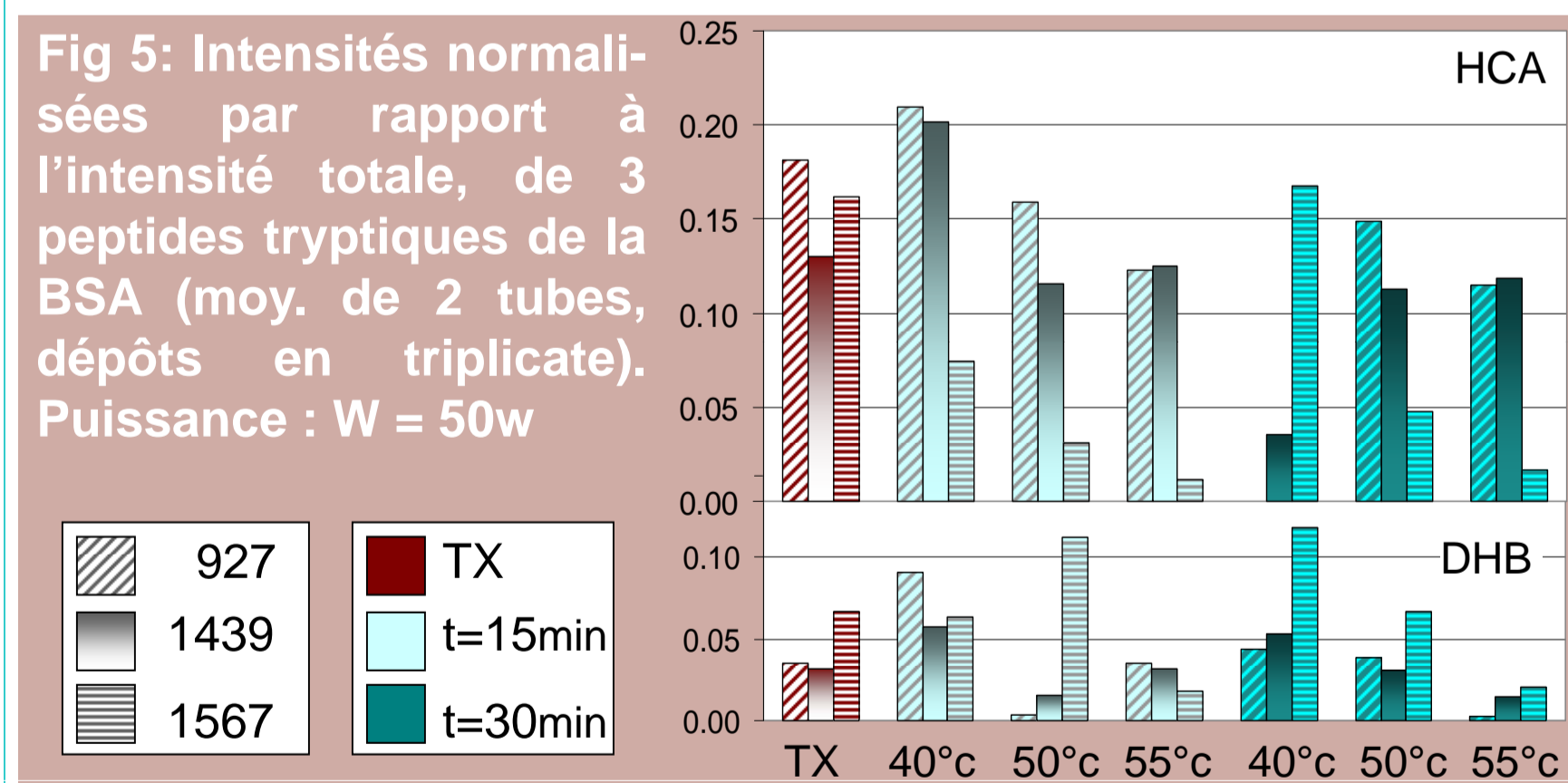
### PARTIE 3 : PARAMETRES DE DIGESTION

Les paramètres consommables et enzymes étant posés, une série d'analyses croisées est réalisée en faisant varier les paramètres de la digestion (température T, temps de digestion t, puissance W). Des peptides spécifiques de la digestion tryptique sont sélectionnés comme marqueurs de digestion, après analyse des digestions par MALDI-TOF/TOF.

Intensités de 3 peptides tryptiques de la BSA, selon les valeurs de puissance et de température, pour une digestion de 15min.



**Test 2 :** Influence de la température pour des temps de 15 et 30min (pour les temps de 5 et 10min, il n'y a pas de signal observé et au delà des 30min, on perd l'intérêt du procédé, c'est à dire le gain de temps). Les digestions sont déposés avec 2 matrices différentes (HCCA-DHB).



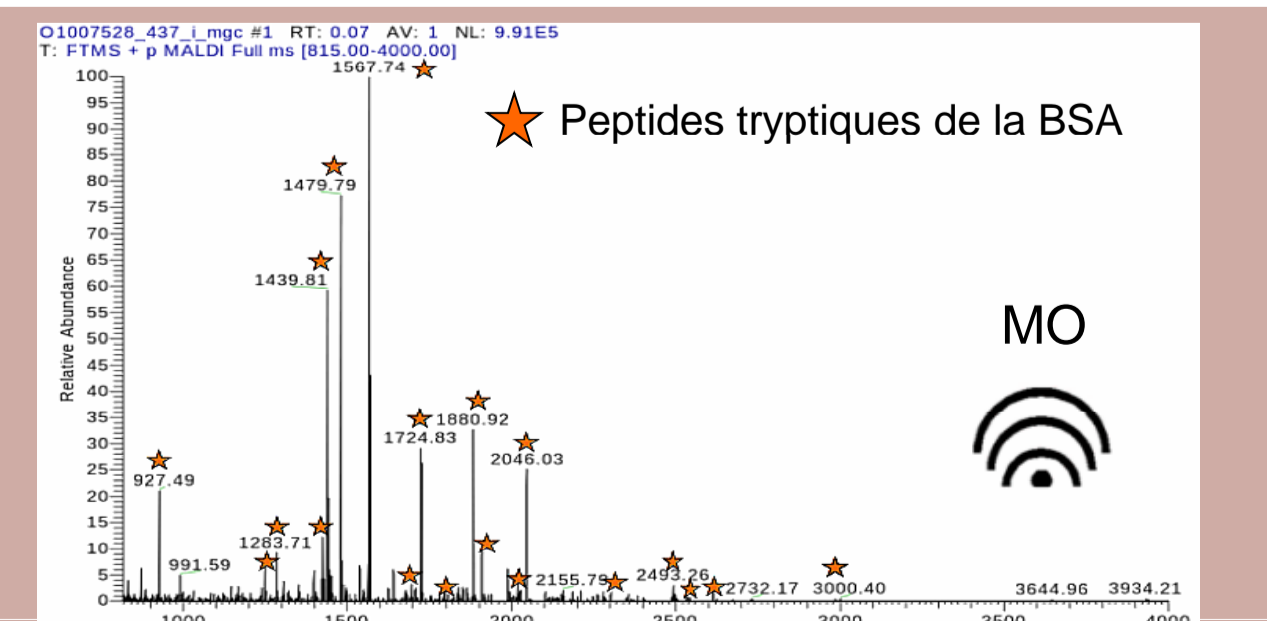
À un temps de digestion réduit de 15min, aucune dégradation n'est observée après augmentation des valeurs de puissance ou de la température ou la puissance du micro-onde.

Le temps de digestion doit être au minimum de 15min (pas de signal observé à 5 et 10min) sans dépasser 30min (perte de signal et de l'avantage de la digestion aux micro-ondes: gain de temps)

Les échantillons des analyses précédentes sont analysés sur MALDI LTQ Orbitrap. Cet appareil nous permet d'obtenir des cartographies peptidiques avec une tolérance de masse de 2ppm, ce qui lève certaines ambiguïtés sur l'attribution de peptides.

### Cartographies peptidiques sur MALDI Orbitrap Digest BSA 10fmol/µl

Même si tous les peptides de la BSA n'ont pas pu être pointés sur ces spectres, cependant, l'analyse manuelle des spectres suggère que la digestion au micro-ondes permet d'obtenir des spectres plus riches en peptides tryptiques.



Une étude plus approfondie montre que les peptides qui "apparaissent" lors des digestions aux micro-ondes, sont essentiellement des peptides à 1 "miss-cleavage" (MC). Cette augmentation de la proportion de peptides à 1 MC, ne réduit pas pour autant le nombre de peptides à 0 MC (à l'exception de 1 à 2 peptides). La réduction du temps de digestion présente donc un double avantage, puisque qu'elle combine gain de temps et augmentation de la couverture de séquence, résultant des peptides supplémentaires à 1MC qui sont identifiés.

Publications bibliographiques :  
- Proteomics, 1995 Jul;16(7):1090-4. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. Wasinger VC. et al.  
- Proteomics, 1999 Aug;20(11):2149-59. Diagnosis of cellular states of microbial organisms using proteomics. VanBogelen RA. et al.  
- Journal of Proteome Research 2008, 7, 96-103, J. Klimek et al.  
- Biotechnol. 2004 Oct;22(10):1291-6. Protein sequencing by mass analysis of polypeptide ladders after controlled protein hydrolysis. Zhong H. et al.  
- Cell Proteomics. 2006 Apr;5(4):769-76. Microwave-assisted protein preparation and enzymatic digestion in proteomics. Sun W. et al.  
- Publishing: Matthews. NC. 2002; 11. In Microwave Synthesis. Hayes BL (ed). Collins MJ.

### PARTIE 4 : DIGESTION AUX ULTRASONS

#### Tests de sensibilité (Fig 7 et 8)

Les concentrations étudiées sont 1 pmol/µl, 100 fmol/µl et 10 fmol/µl. Pour chaque concentration, 3 échantillons sont préparés de manière conventionnelle, et 3 échantillons sont préparés avec la digestion par ultrasons. Les dépôts sont analysés avec le MALDI-TOF/TOF. Sont comparés: les taux de couverture de séquence, le nombre de peptides obtenus en fonction des méthodes et des concentrations. Pour les concentrations de 100 fmol/µl et 10 fmol/µl une étape de dessalage est ajoutée avant le dépôt sur la plaque MALDI.

→ Lorsque la concentration en protéine diminue (100 fmol/µl), le taux de couverture de séquence est plus important avec la méthode conventionnelle. Lorsque la concentration diminue encore (10 fmol/µl) on obtient un taux de couverture de séquence équivalent avec les deux méthodes. On peut attribuer la différence de résultats entre les fortes et les faibles concentrations en protéines au phénomène de « collage » des peptides sur les parois des tubes qui pourraient être accentué avec la méthode des ultrasons.

#### Couvertures de séquence (Fig 9)

De meilleures couvertures de séquence sont obtenues par ultrasons. Il y a plus de MC avec la méthode des ultrasons. Ce nombre plus important de MC permet d'avoir accès à des séquences de peptides de masses inférieures à la limite de détection fixée sur le MALDI-TOF/TOF. Par conséquent, un meilleur taux de couverture de séquence peut être atteint.

#### Conclusion & perspectives :

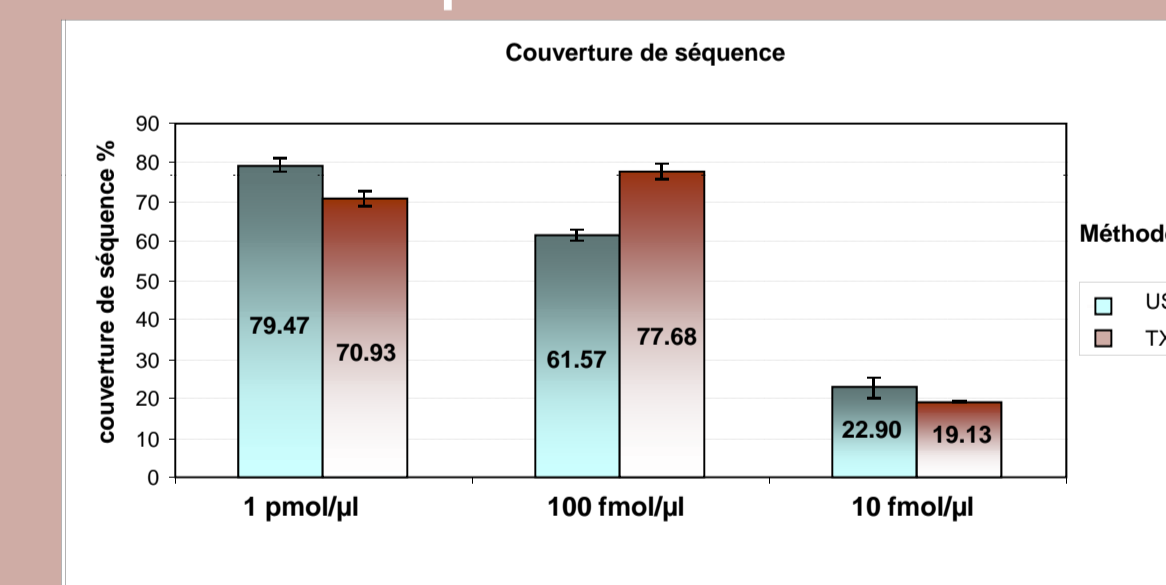
L'introduction de nouvelles techniques de digestion dans le domaine protéomique est prometteuse. Il est possible de diminuer les temps de traitement des échantillons tout en augmentant les couvertures de séquence. La propriété de certains matériaux comme le téflon par exemple, d'être transparent aux micro-ondes et d'avoir une bonne résistance chimique a permis de développer de nouveaux réacteurs qui, placés dans un carrousel, permettent de traiter de nombreux échantillons simultanément et plus rapidement que les digestions conventionnelles.

Les ultrasons permettent d'envisager des extractions et protéolyse combinées sur des échantillons biologiques non solubles.

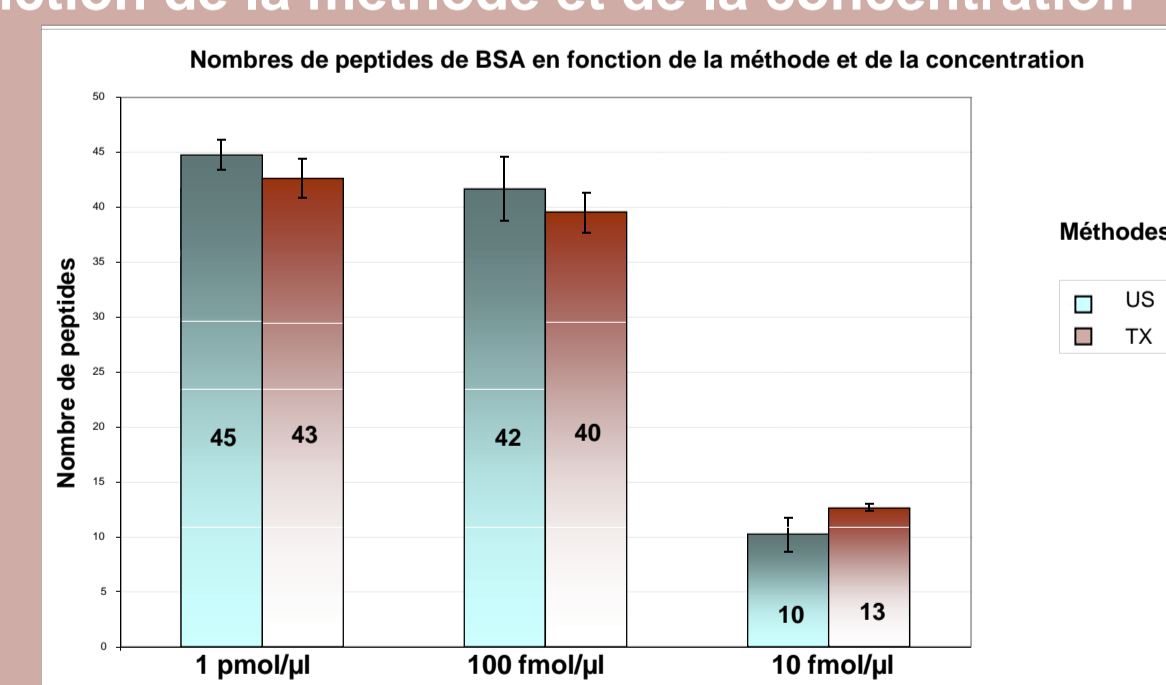
L'application à ce type d'échantillon complexe et non solubilisé est en cours au laboratoire.

Le choix des réactifs et tubes est toutefois particulier et peut totalement compromettre l'analyse si une validation n'est pas menée en préliminaire.

### Fig 7: Comparaison des taux de couverture de séquence en fonction des méthodes et des concentrations en protéines



### Fig 8: Comparaison du nombre de peptides de BSA en fonction de la méthode et de la concentration



### Fig 9: Comparaison des couvertures de séquence de BSA 1 pmol/µl en fonction de la méthode conventionnelle et de la méthode des ultrasons

