



HAL
open science

Développement d'une méthode de caractérisation de peptides plasmatiques

Delphine Centeno, Viala Didier, Hafnaoui Nordine, Sayd Thierry, Pinguet Jérémy, Bich Claudia, Estelle Pujos, Christophe C. Chambon

► **To cite this version:**

Delphine Centeno, Viala Didier, Hafnaoui Nordine, Sayd Thierry, Pinguet Jérémy, et al.. Développement d'une méthode de caractérisation de peptides plasmatiques. SFSM 2011, Sep 2011, Avignon, France. hal-03665703

HAL Id: hal-03665703

<https://hal.science/hal-03665703>

Submitted on 12 May 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

CENTENO Delphine¹, VIALA Didier¹, HAFNAOUI Nordine², SAYD Thierry³, PINGUET Jérémy⁴, BICH Claudia¹, PUJOS-GUILLOT¹ Estelle, CHAMBON Christophe¹
¹ Plateforme d'Exploration du Métabolisme (PFEM), ² UNMP, ³ QuaPA INRA Clermont-Ferrand-Thiez
⁴Laboratoire de Pharmacologie, 58 Rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand

Introduction

Dans le cadre d'un projet Européen, une étude doit être réalisée pour savoir si le peptidome plasmatique d'un animal peut varier en fonction de son régime alimentaire (ex carnée, laitier ou à base de fruits et/ou légumes). A ce jour, aucune étude n'a permis de mettre en évidence par spectrométrie de masse des peptides présents dans le sang dont l'origine directe est la digestion. Ainsi pour pouvoir répondre à cette question scientifique, il est nécessaire en premier lieu de développer une méthode simple et rapide de purification et de caractérisation de peptides plasmatiques.

Le cahier des charges imposant une méthode simple (nombreux échantillons à tester), nous avons retenu trois méthodes: **la précipitation à l'acétonitrile, l'ultrafiltration avec un cut off à 10kDa et une méthode de purification sur billes (MCM 41, Sigma).**

Chaque méthode de purification est évaluée sur la base (1,4) de la qualité de la déplétion en protéines et de la concentration en peptides après purification, (2, 3) du nombre de peptides détectables et identifiables en spectrométrie de masse, (5) de la capacité de récupération de peptides témoins ajoutés dans le plasma de départ. Enfin, la méthode la plus performante a été testée, avec (6) un logiciel de quantification Label-Free LCPgenesis qui permet d'évaluer la répétabilité sur la base de peptides « typiques » endogènes au plasma ou ajoutés mimant, dans le cas de peptides de caséines une réabsorption de peptides issus d'un régime à base de matrice laitière.

Partie Expérimentale



Précipitation des protéines : méthode Acétonitrile	Purification sur phase solide : méthode MCM41	Purification par Ultrafiltration : méthode UF
500 uL plasma + 1000uL ACN (-20° C) Vortex 3 mn Centrifugation 4000 rpm, 4° C, 15 mn	10 mg billes MCM41 + 1.5 ml glycine (100mM pH 2.5) + 500uL Plasma, Incubation 2h, puis lavages 3 x 1 ml Elution : 500µl ACN 80% Centrifugation 4000 rpm, 20° C, 3 mn	100µl de plasma + 400µl H ₂ O Passage sur VIVASPIN 500 – 10 kD Centrifugation 15000 rpm, 4° C, 30 mn
Evaporation du surnageant au SpeedVac (1H) et reprise dans 100 µl H ₂ O/ACN/FA (95/5/0.5)		

⇒ 500 µl plasma x 3 par méthode

⇒ Gels SDS-PAGE (1),
Analyse MALDI (2)

⇒ Analyse LC MS/MS (3, 5)

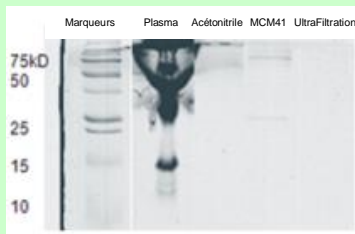
⇒ Dosage Acides aminés (4)

⇒ Quantification Label Free (6)

(2) MALDI-TOF MS (Voyager DE-Pro, Perseptive Biosystems), (3,5) nano-LC-MS/MS LTQVelos (Thermo Fisher Scientific), (4) Analyseur d'Acides Aminés (HPLC – Kontron Instruments), (6) Quantification Label Free (*ProGenesis LC-MS, Nonlinear Dynamics*)

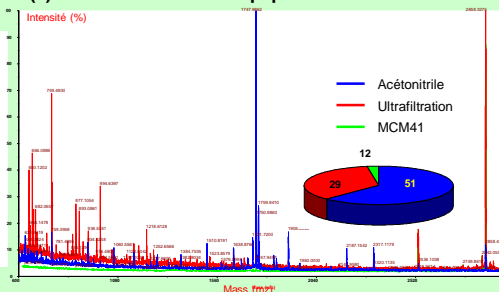
Résultats

(1) : Gel SDS-PAGE des Surnageants



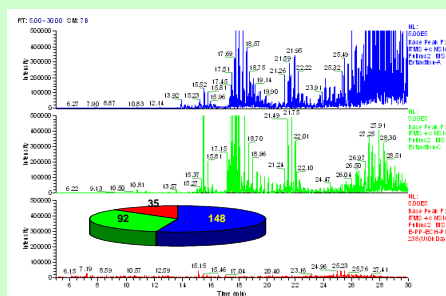
La déplétion en protéines est moins efficace dans le cas de la chromatographie sur bille (MCM41)

(2) Détection MALDI des peptides



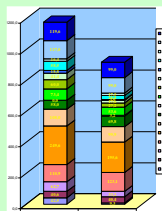
La détection MALDI des peptides est meilleure avec la méthode Acétonitrile

(3) Nombre de peptides identifiés par LC MS/MS (Mascot, FDR < 1%)



Le nombre de peptides identifiés est plus important dans la méthode Acétonitrile

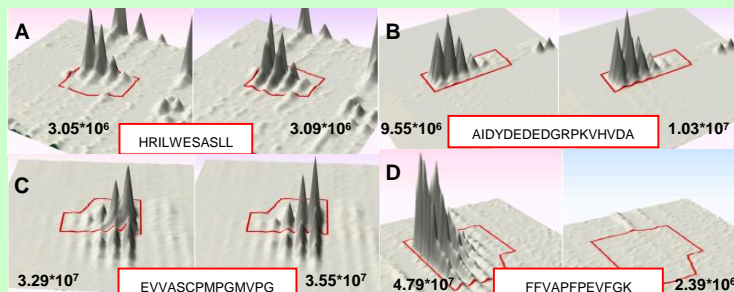
(4) Dosage des acides aminés peptidiques



Le dosage des acides aminés peptidiques (Fraction liée) montre une concentration la plus élevée dans l'acétonitrile (1200 µM versus 990 µM dans MCM41). La concentration en peptides dans l'ultrafiltration est sensiblement équivalente à celle dans MCM41 (Résultats non montrés).

(6) Evaluation de la répétabilité de la méthode Acétonitrile

N°	Accession	Peptides	Scores	Description
A	gi 120127	2	122,44	RecName : Full=Fibrinogen beta chain; Contains : RecName : Full=Fibrinopeptide B
B	gi 1588326	2	101,36	inter-alpha-trypsin inhibitor
C	gi 311248626	2 (1)	66,08	PREDICTED : zinc finger protein 653 [sus scrofa]
D	gi 159793209	16 (8)	959,17	alpha S1 casein [bos taurus]



La comparaison des signaux de masse de deux analyses LCMS/MS « Acétonitrile », montre que pour des peptides endogènes du peptidome, le signal est très proche. Cela montre une bonne répétabilité de la méthode précipitation. De plus, lorsque l'on regarde les signaux de masse de peptides exogènes (ici, de spike de caséines), la sensibilité est bonne entre l'échantillon spiked et l'autre non (c'est vrai aussi pour les 7 autres peptides de caséine s détectables (résultat non montré)).

(5) Détection des peptides ajoutés au plasma,

Protein name	Accession	Séquence	ACN	MCM41	UF 10kDa
Alpha-S1-casein OS=Bos taurus (CAS1_BOVIN)	P02562	FRQLPQEVNENLLR			
		SPHNSVQGLNLYPFELPR			
		FEVAPFVEVFGK			
Alpha-S2-casein OS=Bos taurus (CAS2_BOVIN)	P02563	ALNEINQFYQK			
		PPQYLQYLQGGPILAPWDQVK			
Beta-casein OS=Bos taurus (CASB_BOVIN)	P02566	DMPRLQMLLYQEPVLPVPR			
Kappa-casein OS=Bos taurus (CASK_BOVIN)	P02568	SPAQLQWQLSNTVPAK			
		SPHNSVQGLNLYPFELPR			

Le nombre de peptides de caséines détectés est correct dans l'acétonitrile alors que la récupération est plus faible voire très faible (1 seul pour la filtration) pour les deux autres méthodes.

CONCLUSION

Les résultats obtenus montrent que la méthode classique de précipitation des protéines par acétonitrile est la plus performante pour, à la fois éliminer la « gangue » des protéines présentes dans le plasma mais aussi pour permettre la détection et l'identification des peptides. La quantification des acides aminés liés confirme la plus grande quantité de peptides dans le cas d'une précipitation à l'acétonitrile. De plus, la récupération de peptides de caséines est bien meilleure avec cette méthode qu'avec les deux autres méthodes testées. Enfin, cette méthode, montre une bonne répétabilité lorsque l'on compare les signaux peptidiques inter-runs. Les signaux MS des peptides de caséines, additionnés avant la précipitation, sont bien au dessus de la limite de quantification de la méthode.