



HAL
open science

Détection et identification de sélénoprotéines par électrophorèse sur gel associée aux spectrométries de masse atomique et moléculaire

Guillaume Ballihaut

► **To cite this version:**

Guillaume Ballihaut. Détection et identification de sélénoprotéines par électrophorèse sur gel associée aux spectrométries de masse atomique et moléculaire. Chimie analytique. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2007. Français. NNT: . tel-00656273

HAL Id: tel-00656273

<https://theses.hal.science/tel-00656273>

Submitted on 3 Jan 2012

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.

N° ordre :

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

Ecole doctorale des Sciences exactes et de leurs applications

par **Guillaume BALLIHAUT**

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : Chimie analytique et environnement

Détection et identification de sélénoprotéines par électrophorèse sur gel associée aux spectrométries de masse atomique et moléculaire

Soutenue publiquement le 7 décembre 2007, après avis de :

Mme L. SABATIER	Pr, UMR 7178 ECPM Université de Strasbourg	Rapporteur
Mme M. MONTES-BAYÓN	Pr, Université d'Oviedo, Espagne	Rapporteur

Devant la Commission d'examen formée de :

Mme M. POTIN-GAUTIER	Pr, UMR 5254 CNRS UPPA	Président
Mme C. BERTHOMIEU	CR, UMR 6191 CNRS-CEA Aix-Marseille II	Examineur
M. R. ŁOBIŃSKI	DR, UMR 5254 CNRS UPPA	Directeur de thèse
M. R. GRIMAUD	MC, UMR 5254 CNRS UPPA	Co-directeur de thèse
M. C. PECHEYRAN	IR, UMR 5254 CNRS UPPA	Invité

REMERCIEMENTS

Je remercie Messieurs Olivier Donard et Robert Duran, Directeurs respectifs du Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (L.C.A.B.I.E.) et de l'Equipe Environnement et Microbiologie (E.E.M.) de l'Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux (I.P.R.E.M.) pour m'avoir accueillis dans leurs laboratoires.

Ma reconnaissance va tout d'abord à mon directeur de thèse, Ryszard Łobiński, Directeur de Recherche au L.C.A.B.I.E. Je te remercie sincèrement pour m'avoir permis d'intégrer une équipe de recherche très dynamique et cosmopolite dans laquelle j'ai pu m'épanouir grâce aux diverses discussions très enrichissantes que nous avons eues.

Ma profonde reconnaissance va également à mon co-directeur de thèse, Régis Grimaud, Maître de Conférences dans l'E.E.M., qui m'a accordé sa confiance depuis mon D.E.A. Je te remercie vivement pour avoir guidé mes premiers pas dans la recherche avec autant de passion, de patience et de professionnalisme. Bien sûr, je garde d'excellents souvenirs de nos surfs olympiques sur le Goulet et des discussions suscitées par nos esquimautages de la dernière chance dans les eaux glacées du gave de Pau !

Je remercie chaleureusement Christophe Pécheyran, Ingénieur de Recherche au LCABIE pour m'avoir initié à la technique d'ablation laser et pour son vif intérêt dans cette collaboration. Ton professionnalisme et tes précieux conseils ont été de réels moteurs pour le bon déroulement de ce travail.

Je tiens également à remercier très sincèrement Sandra Mounicou, Chargée de Recherche au LCABIE, pour son aide essentielle à la réalisation de cette thèse. Tes qualités professionnelles et humaines ont été très appréciables lors de ces dernières années de thèse. En tant qu'ami, je te remercie pour les très bons moments partagés tant dans le laboratoire que sur les terrains de squash ou de pelote ... ou encore sur les routes de Toques et Clochers.

Merci infiniment à Fanny Claverie et Suzanne Cany, lazeristes d'or, pour leur constante bonne humeur malgré ces longues journées de travail.

Je suis très reconnaissant à Laurence Sabatier, Professeur à l'Université de Strasbourg et à María Montes Bayón, Professeur à l'Université d'Oviedo, d'avoir accepté de rapporter ce travail. Je remercie sincèrement Catherine Berthomieu, Chargée de recherche au CEA de Cadarache et Martine Potin-Gautier, Professeur à

l'Université de Pau des Pays de l'Adour pour me faire l'honneur de participer à ce jury. Enfin je remercie l'ensemble des membres de la commission d'examen.

Ces années universitaires m'ont permis de faire des rencontres très enrichissantes et des amitiés durables. Je tiens donc à les remercier ici très sincèrement. Mes remerciements vont tout d'abord à Laure Tastade avec qui j'ai travaillé ces 4 années et partagé colloques, soirées sportives ou autres péripéties avec grand plaisir. Merci à mon compère Sylvain B. pour avoir marqué ces années de gueuletons, sorties parisiennes ou escapades champêtres. Je remercie Romain B. l'équarriseur de ses plaines, pour ces sorties montagnes souvent très fructueuses... émaillées de bons repas du terroir. Merci Loudo pour ta contribution musicale aux soirées sur Billère (ah cette chaîne) et surtout pour avoir agrémenté cette fin de thèse de diverses soirées chaleureuses, belote et repas au Berry entre autres.

Mes remerciements vont d'une manière générale à toutes les personnes que j'ai côtoyées au laboratoire pour ces rencontres très riches. Tout d'abord, un grand merci à Mari Sol pour m'avoir chaleureusement accueilli dans son bureau et m'avoir conseillé durant mes années de thèse « bio ». Merci aux anciens étudiants Aurélie, Cédric, Pauline, Stéphane, Anthony, Magalie, Odile de Montpellier, Christina, Benji, Pierre, Steph Betelu, Seb ; aux moins anciens Johann, Sandrine, Pierre Jo, Isabelle dit Zézette, Hélène, Julien M., Julien H., Sylvain Bouchet ; aux plus jeunes Judith, Annie, Marion, Lionel... et aux inclassables Luis Ma, Jaime, Jean et ces rhums maisons ... pour tous les repas et supers moments qui ont jalonné cette thèse. Pour toutes les discussions scientifiques ou autres merci aux divers membres du labo Christine, Béa Lauga, Philippe G., Jean-Philippe, Pat, Solange, Christiana, Rémy G., Gilles, Hugues Pr., Dirk, Brice, David A., Joanna, Hervé P. et son kayak-sous-marin blanc ; aux post doc ou assimilés Luis, Aude, Pablo, Béa, Esther, Gilles M., Laurent, Oscar, Shona aux UT2Aistes Hugues Pa., Christelle, Damien, Véro-fan-de-Grande-musique, ... et bien sûr à Marlène. Un grand merci également au secrétariat : Yvette, Marie-Jo, Christine et Sophie pour leur aide et sympathie.

Merci aux coloc : Jérôme, Suzanne, Julien, Seb, Rodolphe et Laure pour ces bons moments de vie commune.

Je finirai ces remerciements par mes proches. Je remercie mes amis de longue date : les très vieux Préchacquais et Layais, Fabien Mir., Fred, Marie, Céline, la Marie-Laure, Jannick (rien de tel qu'Herri Urrats pour se changer les idées) et les moins vieux Luis, Steph, Flo, Guillaume, Mathieu, Isa et Yannick pour tous ces moments passés, présents et futurs en votre compagnie. Merci à toute ma famille pour m'avoir soutenu et supporté physiquement et moralement. Je remercie plus particulièrement mon frère, mes parents, mes oncles, mes tantes et mes grand-parents pour toute leur affection et pour m'avoir laissé libre et soutenu dans mes choix.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTE DES TABLEAUX	10
LISTE DES FIGURES.....	11
INTRODUCTION GENERALE	15
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
1 : Le sélénium : propriétés chimiques, biologiques et environnementales.....	17
1.1. Propriétés chimiques du sélénium	17
1.2. Le sélénium dans l'environnement.....	18
1.2.1. Cycle biogéochimique du sélénium.....	18
1.2.2. Rôle des microorganismes dans le cycle biogéochimique du sélénium.....	21
1.2.3. Sources anthropiques et utilisation	21
1.3. Le sélénium : les deux facettes toxique et essentiel	22
1.3.1. Toxicité du sélénium	22
1.3.2. Essentialité du sélénium	23
1.4. Métabolisme du sélénium.....	25
1.4.1. Incorporation non spécifique d'acide aminés séléniés.....	26
1.4.2. Incorporation spécifique de la séléncystéine	27
2 : Les sélénoprotéines	28
2.1. Biosynthèse de la séléncystéine et incorporation dans les protéines	28
2.2. Les familles de sélénoprotéines découvertes expérimentalement	32
2.2.1. Les sélénoprotéines bactériennes.....	32
2.2.1.1 Les formiate déshydrogénases	32
2.2.1.2 Les hydrogénases	32
2.2.1.3 La sélénoprotéine D	33
2.2.1.4 Les sélénoprotéines des complexes réductase.....	33
2.2.1.5 La sélénoperoxirédoxine.....	33
2.2.2. Les sélénoprotéines archaebactériennes	33
2.2.3. Les sélénoprotéines eucaryotes.....	34
2.2.3.1 La sélénophosphate synthétase SPS2.....	34
2.2.3.2 La famille des glutathions peroxydases	34

2.2.3.3 La famille des désiodases.....	34
2.2.3.4 Les thiorédoxines réductases	34
2.2.3.5 La sélénoprotéine P.....	35
2.2.3.6 La sélénoprotéine R.....	35
2.3. Recherche <i>in silico</i> des gènes codant pour les sélénoprotéines et définition des sélénoprotéomes procaryotes et eucaryotes.....	36
2.3.1. Les approches bioinformatiques.....	36
2.3.2. Le sélénoprotéome procaryote.....	38
2.3.3. Le sélénoprotéome eucaryote.....	41
2.3.3.1 Le sélénoprotéome mammifère.....	41
2.3.3.2 Les nouvelles familles de sélénoprotéines eucaryotes.....	41
2.3.4. Limites des approches bioinformatiques.....	43
2.3.5. Les sélénoprotéines non prédites à découvrir : l'exemple des sélénoprotéines de <i>Desulfococcus multivorans</i>	43
3 : Principes de l'analyse des protéines par électrophorèse sur gel.....	45
3.1. Préparation de l'échantillon.....	45
3.1.1. Lyse des cellules, protection contre la protéolyse et fractionnement.....	47
3.1.2. Précipitation et élimination des espèces interférentes.....	48
3.2. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel.....	49
3.2.1. Principe des électrophorèses de protéines sur gel de polyacrylamide.....	49
3.2.1.1 Focalisation isoélectrique (IEF).....	49
3.2.1.2 Electrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE).....	50
3.2.1.3 Electrophorèse bidimensionnelle de protéines sur gel de polyacrylamide (2D –SDS-PAGE).....	52
3.2.2. Détection de protéines dans les gels de polyacrylamide.....	53
3.3. Techniques de spectrométrie de masse pour l'identification des protéines séparées par électrophorèse sur gel.....	55
3.3.1. Spectrométrie de masse à ionisation MALDI.....	55
3.3.1.1 Technique d'ionisation laser assistée par matrice (MALDI).....	55
3.3.1.2 Les analyseurs de type temps de vol (TOF).....	56
3.3.1.3 Expérience de fragmentation en mode « Post Source Decay ».....	57
3.3.1.4 Performances de la technique MALDI-TOF MS.....	58
3.3.2. Spectrométrie de masse à ionisation électrospray et couplages associés.....	59
3.3.2.1. Instrumentation et principe de l'électrospray MS.....	59
3.3.2.2. Spectrométrie de masse en tandem en ESI Q-TOF.....	61
3.3.2.2.1 Fonctionnement en mode MS/MS (spectrométrie de masse en tandem).....	61
3.3.2.2.2 Règles de fragmentation en spectrométrie de masse MS/MS.....	62

3.3.2.3. Le couplage NanoHPLC ESI-MS/MS	63
3.3.2.3.1. NanoHPLC des peptides et adaptation des systèmes chromatographiques	63
3.3.2.3.2. Miniaturisation de la source électrospray : la source nanospray	64
3.4. Approches d'identification des protéines	66
3.4.1. Les banques de données	66
3.4.2. Cartographie des digestats peptidiques sur la base de la masse exacte (PMF et PFF).....	67
3.4.3. L'approche Peptide Sequence Tag	69
3.4.4. Les approches par séquençage de novo	69
4 : Analyse des protéines sélénées par électrophorèse sur gel	70
4.1. Caractérisation des protéines sélénées sur gel par spectrométries de masse MALDI et ESI	70
4.2. Détection de protéines sélénées dans des gels d'électrophorèse	72
4.2.1. Détection sur gel après marquage des protéines au traceur isotopique ⁷⁵ Se	72
4.2.2. Détection élémentaire « off-line » (après découpage des gels).....	73
4.2.2.1. Analyses par activation neutronique	73
4.2.2.2. Détection par spectrométrie atomique	74
4.2.2.2.1 Spectrométrie de fluorescence atomique avec introduction par génération d'hydrures (HG-AFS)	74
4.2.2.2.2 Spectrométrie de masse ICP à vaporisation électrothermique (ETV-ICP-MS)	74
4.2.3. Détection in situ par spectrométrie de rayons X : XRF, PIXE μSRXRF et EXAFS	76
4.2.4. Détection élémentaire on-line : technique d'ablation laser ICP-MS	77
4.2.4.1 Principe de l'ablation laser ICP-MS (LA-ICP-MS).....	77
4.2.4.2 Processus d'ablation laser et choix du laser.....	78
4.2.4.3 Plasma à couplage induit (ICP).....	81
4.2.4.4 Le spectromètre de masse	82
4.2.4.5 Applications de l'ablation laser ICP-MS	84
4.3. Identification des protéines sélénées en cap/nano HPLC ESI-MS/MS assisté par ICP-MS.....	85
4.3.1. L'intérêt de la détection en parallèle par l'ICP-MS et l'ESI-MS/MS.....	85
4.3.2. HPLC ICP-MS à débits réduits.....	85
Conclusions de la partie bibliographique - Présentation du sujet de thèse.....	88
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	89
1 : Solutions et échantillons	89
1.1. Produits chimiques et enzymes	89
1.2. Souches bactériennes et sélénoprotéines	89
2 : Instrumentations.....	89

2.1. Chromatographies préparatives	89
2.2. Électrophorèses sur gel.....	90
2.2.1. 1D SDS-PAGE	90
2.2.2. 2D SDS-PAGE	90
2.3 Systèmes d’ablation laser	90
2.3.1. Laser ALFAMET	90
2.3.2. Laser Cetac LSX-100	91
2.4. Rugosimétrie	91
2.5. Spectrométries de masse à ionisation par couplage induit ICP-MS	92
2.6. Chromatographies analytiques	92
2.6.1. HPLC d’exclusion stérique.....	92
2.6.2. HPLC capillaire.....	92
2.6.3. NanoHPLC	92
2.7. Couplages des chromatographies analytiques à l’ICP-MS.....	93
2.8. Spectrométrie de masse à ionisation MALDI.....	93
2.9. Spectrométries de masse à ionisation électrospray.....	94
3 : Procédures et conditions expérimentales.....	95
3.1. Préparation de l’étalon sélénié.....	95
3.1.1. Surexpression de la calmoduline séléniée.....	95
3.1.2. Purification de la calmoduline séléniée	95
3.2. Préparation des milieux de culture en anoxie.....	96
3.2.1. Milieu de culture d’Escherichia coli pour l’expression de la formiate déshydrogénase	96
3.2.2. Milieu de culture de Desulfococcus multivorans DSM 2059 pour l’expression de sélénoprotéines	96
3.3. Préparation des extraits protéiques bruts.....	98
3.3.1. Expression de la formiate déshydrogénase chez Escherichia coli et préparation des extraits cellulaires .	98
3.3.2. Conditions de culture de Desulfococcus multivorans DSM 2059 pour l’expression de sélénoprotéines et préparation des extraits.....	98
3.4. Préparation de la sélénoprotéine glutathione peroxydase.....	99
3.4.1. Stabilisation de la sélénoprotéine glutathion peroxydase par alkylation	99
3.4.2. Digestion tryptique de la GPx alkylée en solution.....	99
3.5. Quantification du sélénium par ICP-MS	99
3.6. Électrophorèses sur gel.....	100
3.6.1. 1D SDS-PAGE	100
3.6.2. 2D SDS-PAGE	100
3.7. Ablation laser ICP-MS	101
3.8. Spectrométries de masse à ionisation électrospray et MALDI de protéines entières	103
3.9. Digestion enzymatique des protéines séléniées dans le gel.....	105

3.10. Analyse en chromatographies d'exclusion stérique-ICP-MS des protéines et peptides sélénisés	106
3.11. Analyse en capillaire LC-ICP-MS et nanoLC-ICP-MS des peptides sélénisés	106
3.12. Analyse en nanoLC-ESI MS/MS des peptides sélénisés.	107
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	109
1 : Le problème de disponibilité des étalons protéiques sélénisés.....	109
1.1. La calmoduline sélénée	110
1.1.1 Choix	110
1.1.2 Biosynthèse et purification de la calmoduline sélénée (SeMet–CaM)	110
1.1.3. Pureté de l'étalon protéique et confirmation de son identité SeMet–CaM par ESI-MS	111
1.1.4. Electrophorèse sur gel en conditions dénaturantes SDS-PAGE de l'étalon calmoduline séléné.....	113
1.2. La thiorédoxine réductase de rat.....	113
1.2.1. Surproduction de la sélénoprotéine thiorédoxine réductase TrxR	113
1.2.2 Caractérisation de l'échantillon de thiorédoxine réductase fourni.....	114
1.3. Caractérisation de la glutathion peroxydase commerciale par spectrométries de masse ESI et MALDI	116
2 : Ablation laser ICP-MS pour la détection du sélénium protéique après électrophorèse sur gel.....	118
2.1. Développement méthodologique avec la calmoduline sélénée	118
2.1.1. Optimisation des conditions d'analyses.....	118
2.1.2. Analyse par ICP-MS à ablation laser de la SeCaM après électrophorèse sur gel.....	118
2.1.3. Performances analytiques de la méthode : Gamme de linéarité et sensibilité	119
2.2. Applications sur les sélénoprotéines.....	121
2.2.1. Détection du sélénium de la thiorédoxine réductase après électrophorèse sur gel	121
2.2.2. Détection du sélénium de la glutathion peroxydase après électrophorèse sur gel	121
2.3. Etude de l'incorporation non spécifique du sélénium dans les protéines : l'exemple de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	123
2.4. Détection de sélénoprotéines dans des échantillons protéiques bruts après électrophorèse sur gel : l'exemple de la sélénoprotéine formiate déhydrogénase chez <i>E. coli</i>	125
3 : Développement de l'ablation laser ICP-MS pour une détection sensible de sélénoprotéines après électrophorèse sur gel.	126
3.1. Ablation par balayage bi-dimensionnel à haute cadence de tirs et acquisition du signal	126
3.2. Effet de l'ablation laser par balayage bi-dimensionnel à haute cadence de tirs sur la réponse ICP-MS	128
3.2.1. Reproductibilité de la détection ICP-MS.....	128
3.2.2. Profondeur d'ablation	129
3.2.3. Gamme de linéarité et sensibilité de la détection en ICP-MS.....	131
3.3. Détection de protéines contenant du sélénium à partir de cellules en culture	133
3.3.1. Détection de protéines sélénées après incorporation non spécifique du sélénium : l'exemple d' <i>E. coli</i> 133	

3.3.2. Détection de sélénoprotéines à partir de cellules en culture	134
3.3.2.1. Contrôle de l'expression de la formiate déhydrogénase chez E. coli.....	134
3.3.2.2. Détection de sélénoprotéines chez Desulfococcus multivorans.....	136
4 : Identification de sélénoprotéines dans des gels d'électrophorèse	138
4.1. Cartographie des peptides sélénés par spectrométrie de masse moléculaire à ionisation MALDI : l'exemple de la calmoduline sélénée.....	138
4.2. Identification de sélénoprotéines après électrophorèse sur gel par nanochromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem à ionisation électrospray (nanoHPLC-ESI-MS/MS) assistée de l'ICP-MS ...	141
4.2.1. Mise au point sur la calmoduline sélénée	141
4.2.2. Application sur la sélénoprotéine thioredoxine réductase	144
4.3. Procédure de stabilisation du résidu sélénocystéyl d'une sélénoprotéine et caractérisation des produits de réaction : l'exemple de la glutathion peroxydase GPx	147
4.3.1. Analyses ESI-MS et MALDI-MS de la GPx stabilisée	147
4.3.2. Analyse du contenu sélénié dans la préparation de GPx stabilisée.....	149
4.3.3. Digestion tryptique de la GPx carboxyméthylée en solution et focalisation sur le sélénopeptide.....	151
4.3.4. Electrophorèse sur gel de la GPx carboxyméthylée suivie de son identification par nanoLC-ESI-MS/MS assistée d'une détection des sélénopeptides en ICP-MS.....	155
CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	157
1. Conclusions	157
2. Perspectives d'études	161
CHAPITRE 5 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	167
ANNEXES : PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	179

LISTE DES ABREVIATIONS

1D ns LA : ablation par balayage monodimensionnel avec un laser à impulsion nanoseconde
2D fs LA : ablation par balayage bidimensionnel avec un laser à impulsion femtoseconde
AMP : Adénosine monophosphate
ARN_m : Acide ribonucléique messager
ARN_t : Acide ribonucléique de transfert
ARN_t^{SeC} : Acide ribonucléique de transfert sélénocystéine
ATP : Adénosine 5'-triphosphate
CaM : Calmoduline
Da : Daltons
DNase : Désoxyribonucléase
EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique
ES QqTOF MS : Spectromètre de masse hybride quadripôle/temps de vol à source d'ionisation par électrospray
ESI-MS : Spectrométrie de masse à ionisation par électrospray
ETAAS : Spectromètre d'absorption atomique par vaporisation électrothermique
EXAFS : Spectroscopie de structure fine d'absorption étendue des rayons X
fs : femtoseconde **ns** : nanoseconde
FAAS : Spectromètre d'absorption atomique de flamme
GTP : Guanosine triphosphate
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance/pression
ICP-MS : Spectromètre de masse à source d'ionisation par plasma induit par haute fréquence
IEF : Iso-électrofocalisation
INAA : Analyse par activation neutronique instrumentale
IPTG : Isopropyl thio-galactoside
LA-ICP-MS : Ablation laser couplée à la spectrométrie de masse à source d'ionisation par plasma induit par haute fréquence
LC : Chromatographie liquide
MALDI-TOF MS : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry
MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
min : minute
Nano-ESI : Nano-Electrospray
NCBI : National Center for Biotechnology Information
nm : nanomètre
RNase : Ribonucléase
RP : Phase inverse
SEC : Chromatographie d'exclusion stérique
SeC : Résidu sélénocystéyl
SeMet-CaM : Calmoduline séléniée
SDS-PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate
SECIS : Sélénocystéine insertion séquence
TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylène diamine
TFA : Acide trifluoroacétique
Tris : Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
UGA : Uracile, Guanine, Adénine
UV : Ultraviolet, **VIS** : Visible

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Abondance des isotopes naturels du sélénium.	17
Tableau 2 : Principales formes chimiques des composés naturels du sélénium.	19
Tableau 3 : Apports conseillés en sélénium par le Conseil supérieur d'hygiène publique de France pour les différentes classes d'âges (40).	24
Tableau 4 : Sélénoprotéines procaryotes caractérisées expérimentalement.	39
Tableau 5 : Nouvelles sélénoprotéines prédites en bioinformatique.	40
Tableau 6 : Le sélénoprotéome eucaryote.	42
Tableau 7 : Méthodes générales de lyse cellulaires.	47
Tableau 8 : Principales méthodes de coloration des protéines après électrophorèse sur gel.	54
Tableau 9 : Principaux lasers utilisés pour le couplage avec l'ICP-MS.	79
Tableau 10 : Caractéristiques des systèmes d'ablation laser utilisés.	91
Tableau 11 : Chromatographies analytiques utilisées et leurs caractéristiques.	93
Tableau 12 : Conditions expérimentales d'ablation laser.	101
Tableau 13 : Conditions expérimentales de l'ICP-MS à ablation laser.	103
Tableau 14 : Conditions analytiques pour l'analyse de protéines entières par ESI MS.	104
Tableau 15 : Conditions analytiques pour l'analyse de protéines et peptides par MALDI TOF MS.	104
Tableau 16 : Conditions analytiques optimales des HPLC pour les différents couplages.	106
Tableau 17 : Conditions expérimentales de l'ICP-MS couplé à l'HPLC, la capHPLC ou la nanoHPLC.	107
Tableau 18 : Conditions expérimentales de la nanoLC ESI-MS/MS.	107

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle biogéochimique du sélénium dans les écosystèmes aquatiques (13).....	20
Figure 2 : Transformation du sélénium par les micro-organismes (21).	21
Figure 3 : Structures chimiques de la sélénométhionine, méthionine, de la cystéine et de la sélénocystéine.	25
Figure 4 : Incorporation spécifique et non spécifique du sélénium dans le métabolisme bactérien.....	26
Figure 5 : Biosynthèse et incorporation de la sélénocystéine chez les bactéries (3, 74).	29
Figure 6 : Eléments conduisant à l'insertion de la sélénocystéine dans les sélénoprotéines.....	30
Figure 7 : Modèles structuraux des ARN SECIS eucaryotes, archaebactériens et bactériens.....	37
Figure 8 : Autoradiogramme après SDS-PAGE d'extraits cellulaires de <i>Desulfococcus multivorans</i> cultivée sur un milieu de culture contenant du ⁷⁵ Se-sélénite (160).....	44
Figure 9 : Stratégie classique d'identification des protéines basée sur l'électrophorèse sur gel.	46
Figure 10 : Principe de la focalisation isoélectrique des protéines (164).	50
Figure 11 : Principe de l'électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (1D-SDS-PAGE).	51
Figure 12 : Exemple d'une électrophorèse bidimensionnelle sur gel de protéines en conditions dénaturantes (2D-SDS-PAGE).	53
Figure 13 : Principe de l'ionisation MALDI.....	56
Figure 14 : Schéma représentant le principe de fonctionnement d'un MALDI-TOF avec un réflecteur électrostatique et un système d'extraction retardée.	57
Figure 15 : Schéma de principe du spectromètre de masse à ionisation électrospray.....	59
Figure 16 : Schéma d'un spectromètre de masse hybride de type Q-TOF : le Q STAR [®] XL (Applied Biosystems).	61
Figure 17 : Mode de balayage « détection d'ions fils » en spectrométrie MS/MS	62
Figure 18 : Nomenclature de la fragmentation peptidique en spectrométrie de masse.	62
Figure 19 : Dispositif instrumental pour séparation en nanoHPLC avec préconcentration en ligne avant analyse ESI-MS/MS.	65
Figure 20 : Illustration de la stratégie d'identification des protéines par empreinte peptidique massique..	67
Figure 21 : Spectre PSD du sélénopeptide de la glutathion peroxydase.	71
Figure 22 : Électrophérogramme ⁸² Se de la GPx (257).	75
Figure 23 : Principe de l'analyse d'ablation laser ICP-MS.....	78
Figure 24 : Représentation schématique de la torche de l'ICP.....	81
Figure 25 : Interface entre ICP et spectromètre de masse	82

Figure 26 : Schéma illustrant le principe de la cellule de collision / réaction.....	83
Figure 27 : Nébuliseur de nano-débits pour le couplage direct nanoHPLC ICP-MS.....	86
Figure 28 : Couplage nanoHPLC ICP-MS et ESI-MS avec cartouche de préconcentration.....	87
Figure 29 : Fiole conique utilisée pour la préparation et la distribution des milieux en anoxie.....	97
Figure 30 : Schémas des interfaces (connecteur et torche) entre la sortie laser et l'ICP.....	102
Figure 31 : Protocole de digestion enzymatique dans le gel.	105
Figure 32 : Séquence en acides aminés de la protéine calmoduline.....	110
Figure 33 : Purification de la calmoduline sélénée par HIC sur colonne phényl-resource.	111
Figure 34 : Spectre de masse électrospray de la fraction collectée après HIC.	112
Figure 35 : Pureté de la préparation de calmoduline sélénée en 1D SDS-PAGE.	113
Figure 36 : Analyses de l'échantillon thiorédoxine réductase en spectrométries de masse moléculaire ..	115
Figure 37 : Séquence en acides aminés de la glutathion peroxydase.....	116
Figure 38 : Analyses de la glutathion peroxydase commercialisée en spectrométries de masse moléculaire	117
Figure 39 : Analyse par ablation laser ICP-MS de l'étalon sélénié SeCaM après SDS-PAGE.	119
Figure 40 : Droite d'étalonnage d'une protéine sélénée sur gel par LA-ICP-MS.....	120
Figure 41 : Analyse de la sélénoprotéine thiorédoxine réductase par ICP-MS à ablation laser après électrophorèse sur gel.	121
Figure 42 : Analyse du contenu sélénié de la glutathion peroxydase.....	122
Figure 43 : Analyses du sélénium protéique chez <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 par ablation laser ICP- MS sur gel.....	124
Figure 44 : Test colorimétrique de la présence de la sélénoprotéine formiate déhydrogénase H dans une culture bactérienne.....	125
Figure 45 : Principe des ablations laser par balayage 1D avec une faible cadence de tirs et par balayage 2D avec une haute cadence de tirs.....	127
Figure 46 : Estimation de la reproductibilité de l'ablation laser 2D fs couplée à une détection du sélénium en ICP-MS.	128
Figure 47 : Analyses des sélénoprotéines en profondeur dans le gel de polyacrylamide par ablations laser successives couplées à une détection ICP-MS.	129
Figure 48 : Topographie des ablations par analyse de rugosimétrie	130
Figure 49 : Sensibilité et linéarité de la détection par ablation laser femtoseconde ICP-MS avec un balayage 2D à haute fréquence de tirs et comparaison à la détection par ablation laser nanoseconde ICP-MS avec un balayage 1D à faible fréquence de tirs.	132

Figure 50 : Etude de l'incorporation non spécifique du sélénium dans les protéines d' <i>Escherichia coli</i> MG1655 par 2D fs LA-ICP-MS.....	133
Figure 51 : Détection sur gel de la sélénoprotéine formiate déhydrogénase exprimée chez <i>E. coli</i>	135
Figure 52 : Analyse du sélénium chez <i>Desulfococcus multivorans</i> cultivée sur benzoate par chromatographie d'exclusion stérique (SEC ₂₀₀) couplée à une détection ICP-MS.	136
Figure 53 : Détection de sélénoprotéines de <i>Desulfococcus multivorans</i> DSM 2059 cultivée sur benzoate après électrophorèse sur gel.....	137
Figure 54 : Electrophorèse bidimensionnelle de la calmoduline sélénée suivie d'une analyse en MALDI-MS de son digestat tryptique : focalisation sur les peptides sélénés.	140
Figure 55 : Identification des peptides sélénés de la calmoduline sélénée après électrophorèse sur gel par nanoHPLC-ESI-MS/MS assistée par une détection du sélénium en nanoHPLC-ICP-MS.....	144
Figure 56 : Identification du sélénopeptide de la thiorédoxine réductase après électrophorèse sur gel par nanoLC-ESI-MS/MS assistée d'une détection du sélénium par nanoHPLC ICP-MS.....	146
Figure 57 : Spectres de masses ESI et MALDI de la GPx après stabilisation du résidu sélénocystéyl par carboxyméthylation.	148
Figure 58 : Analyse du sélénium dans la préparation de GPx stabilisée.....	150
Figure 59 : Analyse du sélénium (⁸⁰ Se) dans le digestat tryptique de la glutathion peroxydase stabilisée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC _{peptide}) avec détection ICP-MS	151
Figure 60 : Identification du sélénopeptide de la glutathion peroxydase stabilisée par nanoHPLC-ESI-MS/MS assistée d'une détection du sélénium par ICP-MS.....	154
Figure 61 : Séquences des sélénopeptides déterminées en nanoHPLC-ESI-MS/MS dans la préparation de GPx stabilisée.	154
Figure 62 : Identification du sélénopeptide de la GPx après électrophorèse sur gel par nanoHPLC ESI-MS/MS assistée d'une détection du sélénium en ICP-MS.	155
Figure 63 : Stratégie analytique employée pour détecter et identifier des sélénoprotéines.....	160
Figure 64 : Stratégie d'ablation laser ICP-MS pour l'analyse de sélénoprotéines séparées en électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide.	163

INTRODUCTION GENERALE

Contexte de l'étude

L'image du sélénium a considérablement changé durant le siècle dernier. Connue dans un premier temps par sa toxicité, le sélénium a suscité un intérêt grandissant à partir des années 1950 lorsque ses effets essentiels et bénéfiques sur les organismes vivants ont été découverts (1, 2). A l'état de traces, le sélénium est un élément essentiel au bon développement de nombreux organismes vivants (mammifères, bactéries, archaeobactéries...) (3). En santé humaine, ses propriétés d'agent préventif dans une cinquantaine de maladies humaines (maladie du cœur, du poumon, certaines formes de cancer...) sont maintenant reconnues (4). Les recherches menées ces dix dernières années tendent à prouver que le sélénium serait biologiquement actif sous la forme de sélénoprotéines (4). Bien que leurs mécanismes de biosynthèse aient été élucidés et retrouvés chez la plupart des organismes vivants, peu de sélénoprotéines ont été identifiées à ce jour (5, 6).

La stratégie la plus performante de nos jours pour l'identification des protéines consiste à les séparer par des électrophorèses sur gel de polyacrylamide, à les détecter avec des colorations spécifiques et à les identifier en spectrométries de masse moléculaire (7). Cette analyse appelée 'analyse protéomique' est très performante pour l'identification des protéines majoritaires mais elle n'est pas adaptée à l'identification des sélénoprotéines très minoritaires dans les organismes.

Objectif et présentation de la thèse

L'objectif de cette thèse a été de développer des techniques analytiques de détection et d'identification permettant de compléter les informations obtenues par l'analyse protéomique sur les sélénoprotéines. Les performances de la spectrométrie de masse couplée à un plasma induit (ICP-MS) permettent maintenant la détection de niveaux de concentration de sélénium très faibles (de l'ordre du ng.mL^{-1}) dans des matrices complexes. Les travaux de cette thèse se sont donc basés sur l'utilisation de l'ICP-MS pour le développement de ces techniques. Différentes étapes ont ponctué ces travaux. La première a consisté à synthétiser un étalon protéique sélénié stable pour valider par la suite l'utilisation des nouvelles techniques d'analyse. Cet étalon a permis le développement d'une première méthode d'ablation laser nanoseconde couplée à l'ICP-MS pour la détection des protéines séléniées sur gel d'électrophorèse. Les performances analytiques en terme de reproductibilité d'analyse et de linéarité de la réponse ont été évaluées. Le problème de la détection des sélénoprotéines dans des échantillons biologiques où leurs quantités sont extrêmement faibles s'est ensuite posé. Pour cela, la technique d'ablation laser a été améliorée pour une détection beaucoup plus sensible en ICP-MS. Une technique d'identification des sélénoprotéines sur gel a enfin été élaborée en ciblant spécifiquement le sélénopeptide par nanoHPLC-ICP-MS avant son

séquençage en nanoHPLC-ESI-MS/MS. Les sélénopeptides étant très instables, une procédure de stabilisation du sélénium a été employée pour permettre leur analyse et l'identification des sélénoprotéines. Ces méthodes ont été développées avec l'étalon protéique sélénié stable et validées avec des sélénoprotéines. La méthode de détection ultrasensible a été appliquée à la recherche de nouvelles sélénoprotéines chez les bactéries.

Ce manuscrit est structuré en cinq chapitres. Le premier chapitre présente les connaissances actuelles sur le sélénium et les sélénoprotéines, ainsi que les principes des techniques d'analyse protéomique et des techniques d'analyses plus spécifiques des sélénoprotéines. Les outils analytiques, les procédures et les conditions expérimentales utilisés dans ce travail sont ensuite détaillés dans le deuxième chapitre. Les résultats obtenus et leurs interprétations font l'objet du troisième chapitre, subdivisée en quatre sous-chapitres. Au sein de ce chapitre, la biosynthèse de l'étalon protéique sélénié stable suivie de sa purification et de sa caractérisation sont exposées dans le sous-chapitre 1. Le développement de la technique d'ablation laser couplée à l'ICP-MS pour la détection de protéines contenant du sélénium sur gel est présenté dans le sous-chapitre 2. Le sous-chapitre 3 s'intéresse aux améliorations apportées en vue d'une détection sensible des sélénoprotéines dans les échantillons biologiques. Enfin, le quatrième sous-chapitre traite des méthodes permettant l'identification des sélénoprotéines grâce à l'utilisation en parallèle de l'ICP-MS pour la détection des sélénopeptides et de la spectrométrie de masse moléculaire pour leur identification. Les résultats obtenus après stabilisation du sélénium sur les sélénopeptides y sont également présentés. La conclusion générale sur ces travaux et les perspectives envisagées sont exposées dans le quatrième chapitre. Le cinquième chapitre regroupe les références bibliographiques citées dans ce manuscrit avant la présentation des publications scientifiques dont a fait l'objet ce travail (annexes).

Ces travaux de recherche ont été effectués au Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (L.C.A.B.I.E.) et au sein de l'Equipe Environnement et Microbiologie (E.E.M.) de l'Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux (I.P.R.E.M.) à Pau.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1 : Le sélénium : propriétés chimiques, biologiques et environnementales.

Le sélénium a été découvert par le chimiste suédois Berzelius en 1817. Cette découverte ayant eu lieu peu de temps après celle de l'élément tellurium, du latin *tellus* (terre), il l'appela du nom de la déesse grecque de la Lune, Selênê.

1.1. Propriétés chimiques du sélénium

Le sélénium (symbole Se, numéro atomique 34) est un métalloïde qui appartient au groupe des chalcogènes (oxygène, soufre, tellurium, polonium), colonne VIa de la classification périodique de Mendeleïev. Il ressemble étroitement au soufre (S) par sa taille atomique, ses énergies de liaison, ses potentiels d'ionisation et ses affinités électroniques (8). Sa masse atomique relative est de $78.96 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Il existe 6 isotopes naturels stables du sélénium dont les abondances isotopiques sont indiquées dans le Tableau 1 et 9 isotopes radioactifs artificiels. Le ^{79}Se , produit de fission nucléaire, émetteur β^- , fait partie de la liste des radionucléides à vie longue (RNVL, demi-vie : $1,1 \cdot 10^6$ ans) à surveiller. Le ^{75}Se (émetteur β^+ / γ , demi-vie : 120 jours) est utilisé en radiologie et pour les traçages.

Tableau 1 : Abondance des isotopes naturels du sélénium.

Isotope	Abondance relative
^{74}Se	0,87%
^{76}Se	9,02%
^{77}Se	7,58%
^{78}Se	23,52%
^{80}Se	49,82%
^{82}Se	9,19%

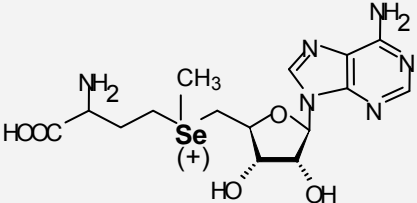
1.2. Le sélénium dans l'environnement

Le sélénium est un élément rare, le 69^{ème} élément en terme d'abondance dans l'écorce terrestre et le 29^{ème} dans l'eau de mer (9). Les sols ont des concentrations en sélénium comprises entre 0,01 et 2 mg par kg (10). Les sols pauvres en sélénium sont dits séléniprivés (< 0,1 mg par kg). On en trouve par exemple en Nouvelle Zélande, en Chine et en Finlande. A l'inverse des sols riches en sélénium avec des concentrations supérieures à 100 mg par kg sont trouvés en Irlande et aux Etats-Unis, ces sols sont dits sélénifères. Les concentrations en sélénium dans les eaux de surface, marines et continentales, en milieu non contaminé, sont rarement supérieures à 0,1 µg par litre (11). La concentration en sélénium dans l'atmosphère est en moyenne de 3 ng par m³ en milieu urbain et de 1,3 ng par m³ en milieu rural (12). Selon les zones géographiques, les sources anthropiques peuvent entraîner une augmentation de ces concentrations.

1.2.1. Cycle biogéochimique du sélénium

La spéciation du sélénium dans l'environnement est très complexe avec de nombreuses espèces séléniées (Tableau 2). La répartition entre ces différentes espèces séléniées dépend de plusieurs facteurs dont le potentiel électrochimique et l'activité biologique du milieu. Le cycle biogéochimique du sélénium, proposé par Fan *et al* en 2002 (Figure 1), présente les espèces séléniées et leur répartition dans les différents compartiments environnementaux (13). Dans les milieux naturels, le sélénium est retrouvé principalement sous forme inorganique à différents états d'oxydation (entre parenthèses) : H₂Se, HSe⁻, Se²⁻ appelés séléniure (-II), Se appelé sélénium élémentaire (0), H₂SeO₃, HSeO₃⁻, SeO₃²⁻ appelé sélénite (+IV) et H₂SeO₄, HSeO₄⁻, SeO₄²⁻ appelé séléniate (+VI). Du sélénium organique est également retrouvé sous forme de séléniure R₂Se (-II)(11). Les formes les plus communes des eaux de surface en conditions oxydantes à modérément oxydantes et des sols vont être sélénite SeO₃²⁻ (+IV) et séléniate SeO₄²⁻ (+VI). Ces formes anioniques sont très solubles, mobiles, biodisponibles et potentiellement toxiques (14). En conditions anaérobies, en milieu réducteur, et / ou dans les sols très acides et riches en matière organique, le sélénium élémentaire et le séléniure prédominent (15). Les formes organiques séléniées (-II) proviennent des réductions biologiques par méthylation du sélénium (diméthylséléniure, le diméthyldiséléniure...) ou par assimilation dans la biomasse (acides aminés séléniés sélénocystéine et sélénométhionine). Des métabolites séléniés comme la Se-adénosylméthionine, le γ glutamyl Se-méthylsélénocystéine, la Se-méthylsélénocystéine et Se-méthylméthionine ont également été mis en évidence chez les plantes (16).

Tableau 2 : Principales formes chimiques des composés naturels du sélénium.

Nom	Etat de valence	Formes chimiques
Formes inorganiques		
Séléniure	Se(-II)	H_2Se, HSe^-, Se^{2-}
Sélénium élémentaire	Se(0)	
Sélénite	Se(+IV)	$H_2SeO_3, HSeO_3^-, SeO_3^{2-}$
Séleniate	Se(+VI)	$H_2SeO_4, HSeO_4^-, SeO_4^{2-}$
Formes organiques Se(-II)		
<i>Acides aminés</i>		
Sélenocystéine		$HSe-CH_2CH_2NH_2COOH$
Sélenométhionine		$CH_3Se(CH_2)_2CHNH_2COOH$
<i>Formes méthylées</i>		
Diméthylséléniure		$(CH_3)_2Se$
Diméthyldiséléniure		$(CH_3)_2Se_2$
Diméthylsélénone		$(CH_3)_2SeO_2$
<i>Métabolites séléniés</i>		
Se-méthylsélenocystéine		$MeSeCH_2CHNH_2COOH$
Se-méthylsélenométhionine		$(CH_3)_2SeH(CH_2)_2CHNH_2COOH$
Se-adenosylméthionine		

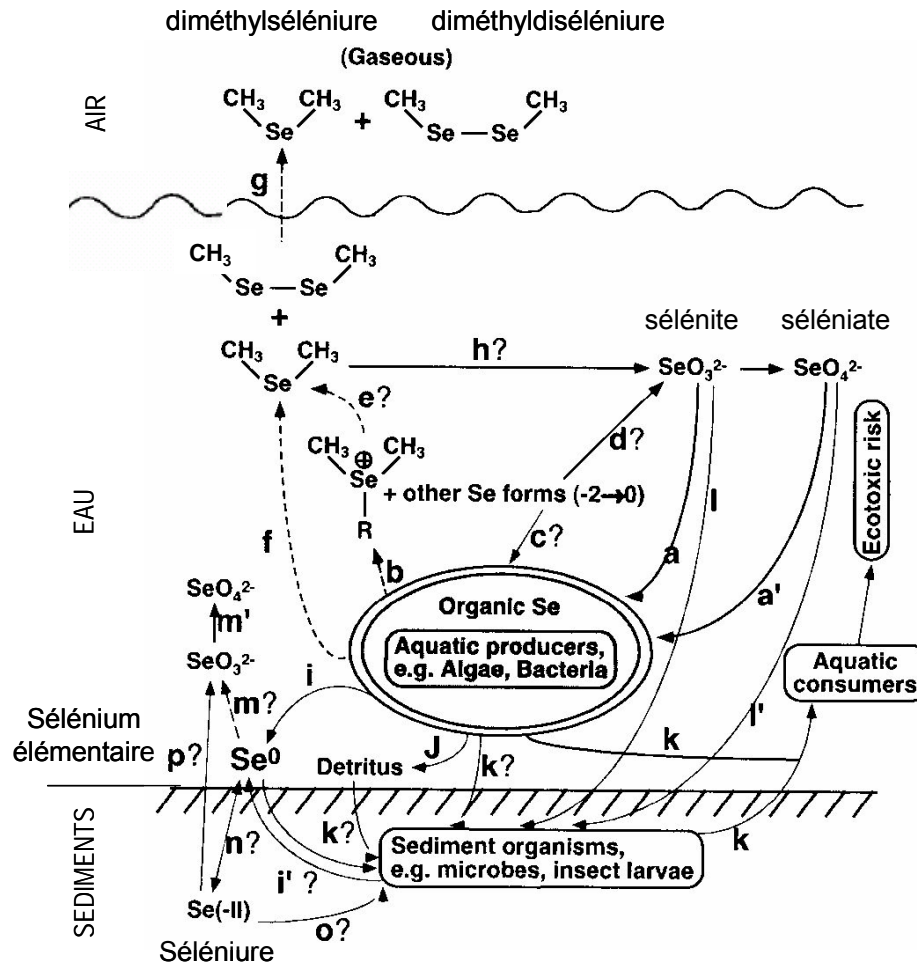


Figure 1 : Cycle biogéochimique du sélénium dans les écosystèmes aquatiques (13).

Les flèches en pointillé indiquent les processus de volatilisation du sélénium à l'origine d'une perte nette de sélénium de la part du système. Les flèches avec des points d'interrogation représentent des processus supposés. (a, a') prise en charge et transformation des espèces inorganiques par les producteurs primaires aquatiques (b) relargage de composés organiques par les producteurs primaires aquatiques (c) prise en charge de composés organiques par les producteurs primaires aquatiques (d) oxydation abiotique de composés organiques en oxyanions (e) relargage d'alkylséléniures par réaction abiotique (f) relargage d'alkylséléniures par les producteurs primaires aquatiques (g) volatilisation des alkylséléniures dans l'atmosphère (h) oxydation des alkylséléniures en formes inorganiques (i) formation de sélénium élémentaire par les organismes pélagiques et benthiques (j) formation de détritits par les producteurs aquatiques (k) bioaccumulation dans la chaîne trophique (l, l') assimilation des oxyanions de sélénium aux sédiments depuis la colonne d'eau (m, m') oxydation du sélénium élémentaire en oxyanions de sélénium (n) réactions redox entre Se(0) et Se(-II) (o) assimilation de Se(-II) depuis le sédiment vers les organismes benthiques (p) oxydation de Se(-II) du sédiment en sélénite.

1.2.2. Rôle des microorganismes dans le cycle biogéochimique du sélénium

De nombreuses études montrent l'implication de l'activité microbienne dans le cycle biogéochimique du sélénium (17, 18). Certains micro-organismes, en modifiant le degré d'oxydation du sélénium, contribuent à augmenter ou à diminuer la mobilité et la biodisponibilité de cet élément dans l'environnement, soit par oxydation d'espèces insolubles du sélénium, soit par réduction d'espèces solubles en espèces insolubles (19, 20). Les transformations microbiennes du sélénium peuvent être le résultat de processus d'assimilation où le sélénium est incorporé dans la biomasse, de dissimilation où la transformation d'oxydo-réduction conduit à fournir de l'énergie en utilisant le sélénium comme accepteur d'électron, ou de détoxication (immobilisation ou volatilisation des espèces séléniées inorganiques) (21, 22).

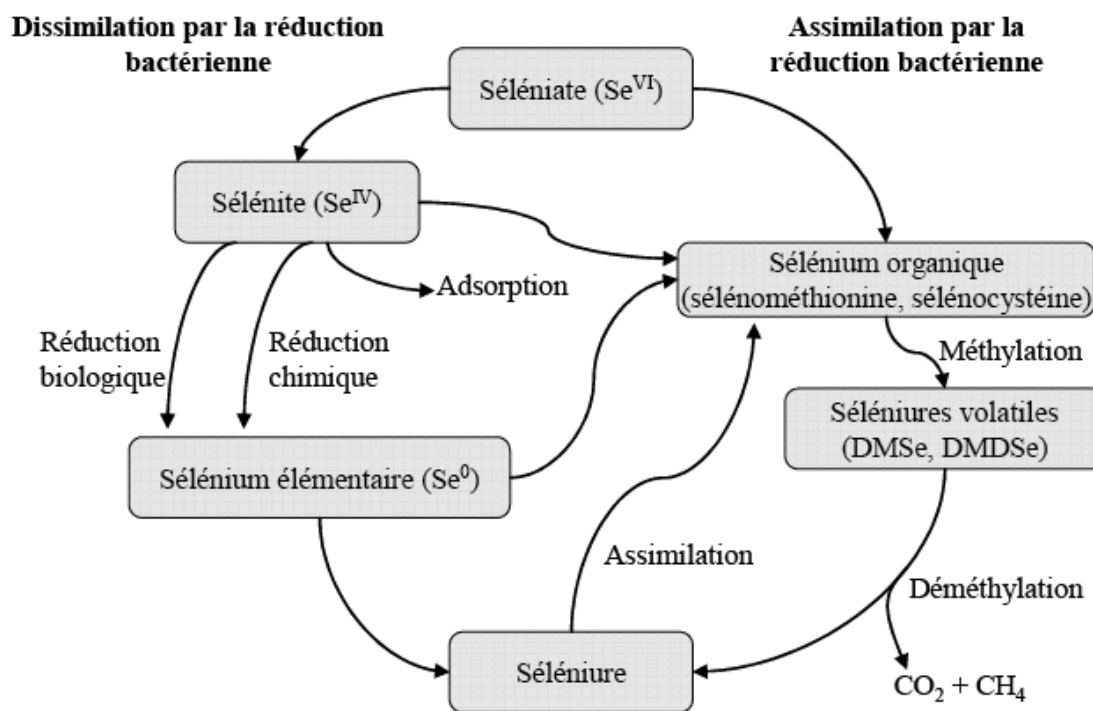


Figure 2 : Transformation du sélénium par les micro-organismes (21).
DMSe correspond à du diméthyl séléniure et DMDSe à du diméthyl diséléniure.

1.2.3. Sources anthropiques et utilisation

Aux principales sources naturelles (dégradation des roches et du sol, activités volcaniques, biologiques...) s'ajoute une dispersion anthropique, liée à ces utilisations multiples, dans les différents compartiments environnementaux (23). Les utilisations industrielles les plus marquantes du Se sont la fabrication de produits électroniques et photographiques, la fabrication du verre, en agriculture comme produit de fertilisation ou en complément alimentaire chez les animaux (12, 23).

1.3. Le sélénium : les deux facettes toxique et essentiel

Selon sa spéciation et sa concentration dans un milieu donné, le sélénium va présenter un caractère toxique ou au contraire va s'avérer essentiel aux organismes vivant dans cet environnement.

1.3.1. Toxicité du sélénium

Les premières observations de la toxicité du sélénium ont été faites par Marco Polo à la fin du XIII^{ème} siècle, soit bien avant sa découverte. Sa progression vers la Chine occidentale fut rapidement compromise par la perte des sabots de ses chevaux, suivie de la mort des animaux. Ceux-ci consommaient une plante dangereuse, *l'Astragalus*, dont la particularité est d'accumuler le sélénium, notamment dans les régions où le sol est très sélénifère, comme dans l'Ouest de la Chine. Ce syndrome de toxicité est aujourd'hui connu sous le nom d'"Alkali disease" (24). Certaines plantes peuvent accumuler naturellement jusqu'à 1000 mg/kg ou synthétiser des formes organiques toxique du sélénium pour les animaux comme la sélénocystathionine (25). D'autres empoisonnements ont été recensés dans des régions contaminées au sélénium par l'activité agricole et industrielle. Dans les années 1980, des décès et des difformités observées sur des animaux sauvages d'un refuge en Californie du Sud ont été associés avec une contamination au séléniate dans l'eau, jusqu'à 30 µg/L (26).

Les cas d'intoxications chez l'homme sont rares. Les symptômes de la toxicité du sélénium sont des pertes de cheveux et d'ongles, accompagnées d'états dépressifs et de fatigues, voire des leucopénies (diminution pathologique du nombre de globules blancs dans le sang), ou des troubles neurologiques dans les cas d'intoxications les plus graves (27). Les bases moléculaires et cellulaires de la toxicité du sélénium ne sont pas encore élucidées (8). La toxicité du sélénium dans l'environnement aquatique s'est déjà manifestée à plusieurs reprises, pouvant engendrer des malformations, des problèmes liés à la reproduction ou encore une mortalité accrue chez des populations de poissons ou d'oiseaux aquatiques (28, 29). Le degré de toxicité dépend également de la forme chimique du sélénium mise en jeu. La sélénométhionine est la forme la plus toxique et la plus accumulée chez le poisson (30). Les formes séléniées les plus toxiques pour les organismes vivants sont généralement le sélénite et le séléniate, du fait de leur grande solubilité et donc disponibilité. De nombreux événements toxiques attribués au sélénium ont été rapportés dans la littérature, et son utilisation croissante dans le monde en fait un élément d'intérêt écotoxicologique majeur (13, 30, 31).

Au niveau cellulaire, de nombreuses espèces séléniées (sélénite, dioxyde de sélénium, sélélocystine, disélénodipropionate, diphényldiséniure, 1,4-phénylènebis-méthylène, sélélocyanate et 6-propylsélélocouracil) réagissent avec les groupements thiols du glutathion pour générer des espèces réactives de l'oxygène, notamment du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et l'anion superoxyde O₂⁻. Ces espèces réactives de l'oxygène sont responsables de leur toxicité (32). La toxicité du sélénite pour des

cellules procaryotes ou eucaryotes a été largement décrite (33-36). Le sélénite agirait comme catalyseur pro-oxydant. Sa toxicité se manifesterait lorsque les conditions pro-oxydantes excèderaient les défenses anti-oxydantes (32). En résumé, la nuisance du sélénium n'est plus à démontrer et pendant de nombreuses années, le sélénium a été associé à son aspect toxique.

1.3.2. Essentialité du sélénium

L'image du sélénium a considérablement changé durant le siècle dernier. Connue dans un premier temps par sa toxicité, le sélénium a suscité un intérêt grandissant à partir des années 1950 lorsque deux études ont montré ces effets bénéfiques sur les organismes. Un premier rapport montrait que le sélénite était nécessaire à la croissance anaérobie de la bactérie *Escherichia coli* sur glucose (1). Schwarz et Foltz ont ensuite rapporté en 1957 que le sélénium prévenait la nécrose du foie chez les rats (2). Ces deux travaux ont été les premiers à montrer l'importance du sélénium en tant qu'oligoélément pour les mammifères et certaines bactéries.

Le rôle du sélénium a par la suite été intensément étudié chez les mammifères et en particulier chez l'homme. Dans les années 1960-70, des carences en sélénium ont été associées à des pathologies graves comme des maladies cardiaques (maladie de Keshan), l'infertilité masculine et des myopathies (37). Dans les années 1980-90, de nombreux travaux ont montré que cet élément joue un rôle dans les fonctions immunitaires, la suppression virale, le SIDA et le retardement du vieillissement cellulaire (11). Des travaux plus récents l'ont qualifié d'agent préventif contre une cinquantaine de maladies dont certaines formes de cancer (4, 38, 39).

Des organismes de santé publique comme le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique Française ont ainsi défini des apports journaliers souhaitables en sélénium suivant les classes d'âges (Tableau 3) (40). Les besoins journaliers en sélénium nécessaires à un homme adulte sont estimés entre 50 et 80 µg alors que le seuil de toxicité est évalué à 150 µg (41).

Tableau 3 : Apports conseillés en sélénium par le Conseil supérieur d'hygiène publique de France pour les différentes classes d'âges (40).

Age	Apport nutritionnel conseillé (en µg par jour et par adulte)
0 - 6 mois	15
7 mois - 3 ans	20
4 ans - 9 ans	30
10 ans - 13 ans	40
14 ans - 18 ans	50
Adultes	50 à 80

Les apports en sélénium se font essentiellement par l'alimentation. Les principaux aliments pourvoyeurs de sélénium sont les volailles, gibiers, poissons, charcuterie et la viande à une teneur moyenne comprise entre 95 et 170 µg/kg (42). Leurs teneurs en sélénium varient toutefois en fonction de la disponibilité et de l'abondance de l'oligo-élément dans l'environnement d'origine. Ainsi dans des zones géographiques pauvres en sélénium, comme dans l'est de la Chine, des apports sélénisés supplémentaires sont fournis aux populations locales sous la forme de compléments alimentaires. Le sélénium doit y être précisément dosé pour éviter un effet toxique à trop forte dose. Le choix de la dose minimale, et surtout les formes sous lesquelles le sélénium est apportée, sont sujets à controverse jusqu'à remettre en cause l'utilisation de compléments alimentaires sélénisés à buts préventif ou thérapeutique (43, 44).

1.4. Métabolisme du sélénium

Au cours des années, les effets toxiques et bénéfiques du sélénium ont été dévoilés. Les recherches concernant le métabolisme du sélénium ont permis de déterminer les formes biologiques de cet élément sans pour autant dévoiler leurs fonctions biologiques. Il est intéressant de noter que les seuls gènes dévoués au métabolisme du sélénium sont ceux impliqués dans la synthèse des sélénoprotéines et ceux dans le catabolisme de la sélénocystéine (4). Le sélénium est assimilé par les organismes vivants et incorporé dans des molécules organiques aux potentiels divers, principalement sous forme d'acides aminés sélénés dans les protéines. Une sélénobase, la 5-méthyl-aminométhyl-2-sélénouridine, a également été retrouvée dans l'anticodon des ARN_t^{glu} et ARN_t^{lys} chez *E. coli*, *C. stricklandii* et *M. vanielii* (45, 46). La présence de cette base modifiée est d'importance capitale pour leur aminoacylation (45, 46). Le sélénium est incorporé dans les protéines sous la forme de résidus sélénométhionyl (47) et sélénocystéyl (48). Les acides aminés sélénés et leurs homologues méthionine et cystéine sont présentés dans la Figure 3. Deux mécanismes distincts permettent l'introduction de sélénium dans les protéines : la voie d'incorporation non spécifique produisant les protéines sélénées et la voie spécifique mise en jeu lors de la synthèse des sélénoprotéines (Figure 4).

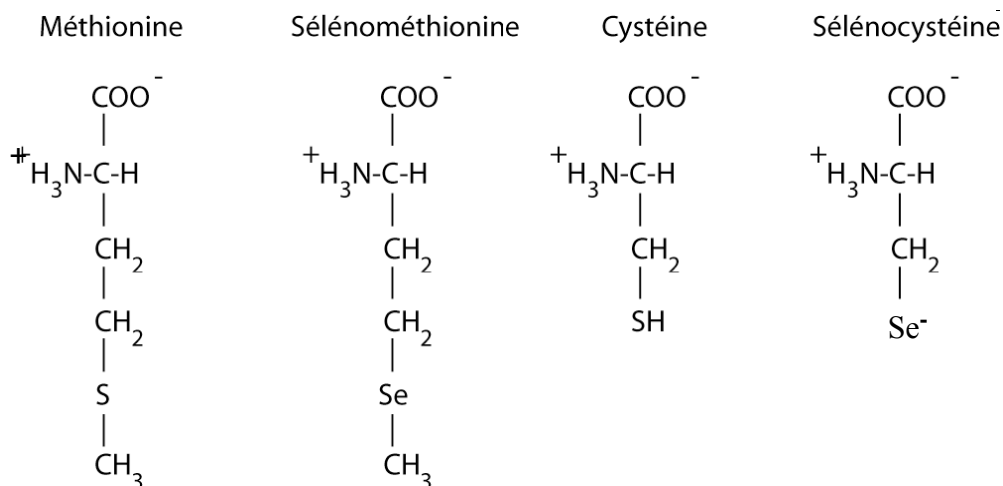


Figure 3 : Structures chimiques de la sélénométhionine, méthionine, de la cystéine et de la sélénocystéine.

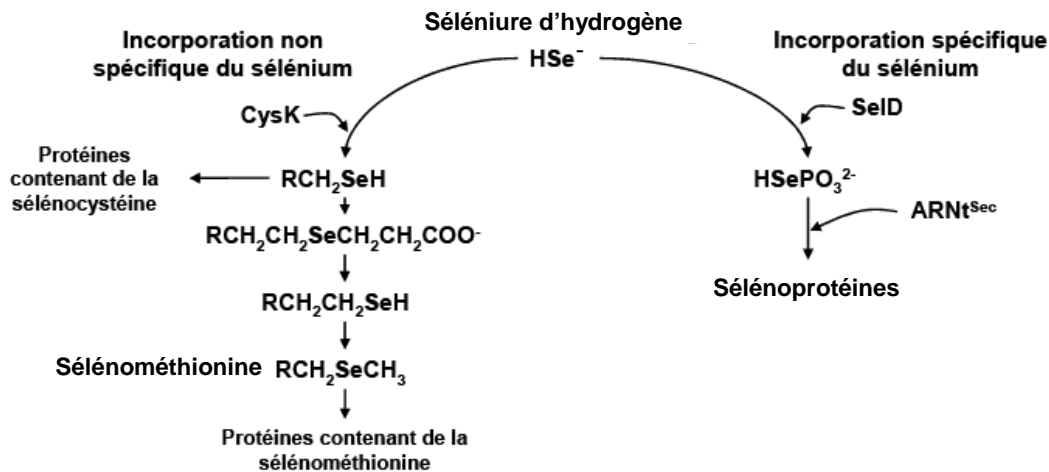


Figure 4 : Incorporation spécifique et non spécifique du sélénium dans le métabolisme bactérien. HSe^- : sélénure d'hydrogène, $\text{RCH}_2\text{SeCH}_3$: sélénométhionine, RCH_2SeH : séléncystéine, HSePO_3^{2-} : séléncystéine phosphorylée (49).

1.4.1. Incorporation non spécifique d'acides aminés sélénés

Le sélénium entre dans la voie d'assimilation du soufre et prend sa place dans des biomolécules, en particulier les acides aminés séléncystéine et sélénométhionine (47, 50). La proportion de soufre remplacé par le sélénium dépend de la concentration intracellulaire de ces deux éléments mais aussi de l'affinité des enzymes impliquées dans la voie d'assimilation du soufre vis-à-vis des substrats contenant du soufre ou du sélénium. En cas d'excès de sélénium, la fréquence de la substitution du soufre augmente (51). Les protéines séléniées sont produites non spécifiquement lorsque le ratio sélénium/soufre augmente dans l'environnement (52). Ce sont des protéines dans lesquelles les résidus méthionyl et cystéyl ont été remplacés par des résidus sélénométhionyl et séléncystéyl par mimétisme chimique. La substitution de la méthionine dans les protéines est possible puisque l'enzyme chargeant l'ARNt^{Met} ne différencie pas la sélénométhionine de la méthionine (53). Dans la nature, la formation de telles protéines est rare en raison de concentrations en soufre souvent beaucoup plus importantes qu'en sélénium. La synthèse des acides aminés sélénés, sélénométhionine et séléncystéine est réalisée à partir du sélénure d'hydrogène. Chez *E. coli*, le sélénure d'hydrogène est transformé en séléncystéine libre par la *O*-acétylsérine (thiol)-lyase codée par le gène *cysK* (CysK). La séléncystéine libre est alors transformée en sélénométhionine libre par la voie de synthèse de la méthionine.

Les différences chimiques entre la sélénométhionine et la méthionine ne sont pas majeures. L'incorporation de sélénométhionine dans les protéines n'altère pas leur structure tertiaire. Par contre, la sélénométhionine substituée à la place de la méthionine au voisinage du site actif d'enzymes peut influencer leurs activités car le groupement $\text{CH}_3\text{-Se}$ de la sélénométhionine est plus hydrophobe que le groupement $\text{CH}_3\text{-S}$ de la méthionine. L'accès du substrat au site actif peut être affecté modifiant les paramètres de cinétiques (54). Par exemple, lorsque le résidu sélénométhionyl remplace le résidu méthionyl de la thymidylate synthase d'*Escherichia coli*, l'activité de l'enzyme est alors augmentée de 40% par rapport à l'enzyme non sélénée (55). L'activité d'une phosphomannose isomérase de *Candida albicans* est augmentée d'un facteur 4 lorsque la sélénométhionine remplace la méthionine située à proximité du site actif (56). *A contrario*, le remplacement de plus de la moitié des 150 résidus méthionyls de la β -galactosidase d'*E. coli* par des résidus sélénométhionyls inactive l'enzyme (57).

1.4.2. Incorporation spécifique de la sélénocystéine

Une des voies majeure d'assimilation du sélénium consiste en son incorporation spécifique dans des protéines, appelées sélénoprotéines. Par son mécanisme d'incorporation spécifique dans les sélénoprotéines, la sélénocystéine est considérée comme le 21^{ème} acide aminé protéogénique et se distingue donc de la sélénométhionine, incorporée de façon non spécifique. La sélénocystéine est un analogue de la cystéine, dans lequel l'atome de soufre du groupement thiol est remplacé par un atome de sélénium pour former un groupement séléinol (Figure 3). Le groupement séléinol ($\text{pK}_a=5,2$), contrairement au thiol ($\text{pK}_a=8$), est entièrement ionisé à pH physiologique (58). Cette ionisation fait du séléinol un meilleur nucléophile. De ce fait, la réactivité des protéines à sélénocystéine dans le site actif est bien plus importante que celle de leurs homologues à cystéine (44, 59, 60). Cette réactivité accrue constitue probablement la raison d'être des sélénoprotéines, malgré le coût énergétique élevé de leur synthèse. La majorité des sélénoprotéines caractérisées sont des enzymes pour la plupart impliquées dans des réactions d'oxydoréduction. Leur résidu sélénocystéyl est essentiel à leur activité catalytique (44), (61). Ces protéines prennent part à diverses activités biochimiques qui expliquent en partie, le rôle fondamental du sélénium (cf. chapitres 2.2 et 2.3).

2 : Les sélénoprotéines

Les sélénoprotéines sont retrouvées dans les 3 domaines du vivant Eucarya (eucaryotes), Bacteria et Archae (procaryotes). Toutefois tous les organismes n'en produisent pas et ni les plantes supérieures, ni les levures ne semblent capables de synthétiser des sélénoprotéines. Ce chapitre présente les mécanismes de biosynthèse de ces protéines, les différentes sélénoprotéines connues expérimentalement et les sélénoprotéines prédites par les nouvelles méthodes de bioinformatique.

2.1. Biosynthèse de la sélénocystéine et incorporation dans les protéines

Le mécanisme de biosynthèse des sélénoprotéines est longtemps demeuré énigmatique, jusqu'en 1986 où il fut découvert qu'à la position correspondant au résidu sélénocystéyl, dans l'ARNm des gènes de la glutathion peroxydase bovine et de la formiate déshydrogénase eubactérienne, se trouvait un codon UGA (62, 63). Cette découverte est alors très surprenante car UGA était seulement connu comme codon stop qui provoque l'arrêt de la traduction. Depuis, le mécanisme par lequel le codon UGA code l'incorporation ciblée de la sélénocystéine a été élucidé chez les procaryotes (64, 65) et est en voie d'élucidation chez les eucaryotes (61, 66). Il implique une machinerie complexe avec de nombreux acteurs moléculaires présentés dans les paragraphes suivants.

Le modèle de biosynthèse de la sélénocystéine décrit ici est issu des études effectuées sur la bactérie *E. coli* par Bock et al (65). La sélénocystéine ne se présente pas comme un acide aminé libre. La première étape de la biosynthèse est le chargement de l'ARNt^{Sec} (produit du gène *selC*) par l'acide aminé sérine, réaction catalysée par une séryl-ARNt synthétase classique. Le résidu séryl est ensuite converti en sélénocystéyl par l'enzyme sélénocystéine synthase, produit du gène *selA* (67). Le sélénium provient du sélénophosphate produit par la sélénophosphate synthétase (produit du gène *selD*) à partir de séléniure d'hydrogène HSe⁻ et d'ATP (Figure 5) (68-70).

Dans les domaines eukarya et archaea, seules une partie de ces acteurs ont été identifiés et la voie de biosynthèse de la sélénocystéine apparaît plus complexe (61). Il y aurait intervention de deux sélénophosphate synthétases SPS1 et SPS2 (71), (72), et d'une phosphoséryl ARNt^{Sec} kinase qui phosphorylerait le résidu séryl de l'ARNt^{Sec} (Ser- ARNt^{Sec}) en phosphoséryl-ARNt^{Sec} avant sa conversion en sélénocystéyl-ARNt^{Sec} (Sec- ARNt^{Sec}) (73).

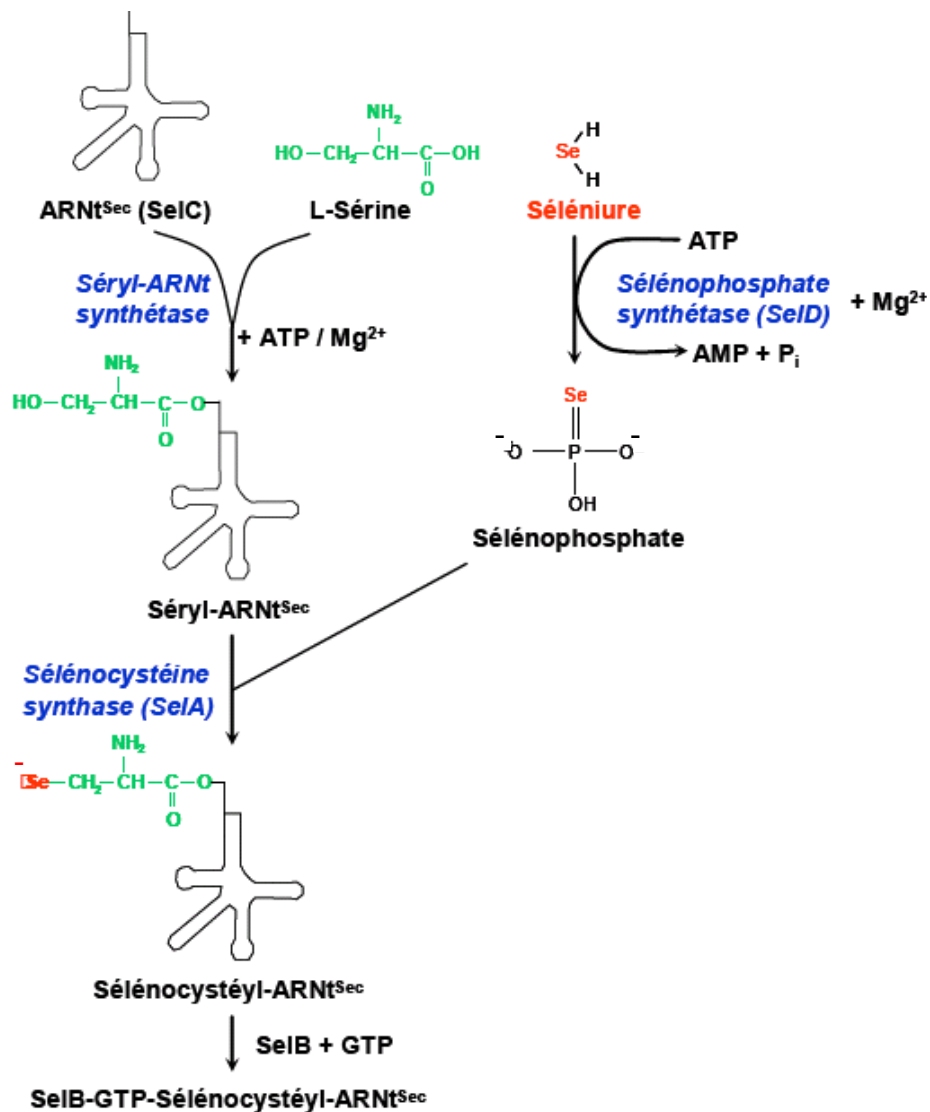


Figure 5 : Biosynthèse et incorporation de la sélénocystéine chez les bactéries (3, 74).

La sélénocystéine est synthétisée à partir de la sérine directement sur un ARN de transfert spécifique de la sélénocystéine, nommé ARNt^{Sec} (62, 63). Cet ARN de transfert chargé du résidu sélénocystéyl est noté sélénocystéyl-ARNt^{Sec}. Il porte l'anticodon complémentaire du codon stop UGA (75). (ARNt : Acide ribonucléique de transfert, ATP : Adénosine triphosphate, AMP : Adénosine monophosphate, ARNt^{Sec} : Acide ribonucléique de transfert spécifique du résidu sélénocystéyl, SelB : facteur d'élongation).

Chez les bactéries, l'insertion fonctionnelle et ciblée de la sélénocystéine en face du codon UGA durant la traduction nécessite la formation de sélénocystéyl-ARN_t^{Sec}, la présence de la protéine SelB (produit du gène *selB*) aussi appelé facteur d'élongation spécifique de la sélénocystéine et une séquence sur l'ARNm appelée élément SECIS pour SelenoCysteine Insertion Sequence. L'élément SECIS est une structure secondaire en « tige-boucle » située directement après le codon UGA (en 3') dans la région codante de l'ARNm. Alors que cette structure est conservée, sa séquence ne l'est pas forcément entre les différentes bactéries. Il possède une double fonction en liant le facteur d'élongation SelB et en codant pour les résidus d'acides aminés de la protéine situés après le résidu sélénocystéyl. Le facteur d'élongation SelB se lie à la fois au sélénocystéyl-ARN_t^{Sec}, à une molécule de GTP et à la séquence SECIS pour former un complexe d'insertion SelB-GTP-sélénocystéyl-ARN_t^{Sec}. Lorsque le ribosome arrive au niveau du codon UGA, le complexe d'insertion ajoute le résidu sélénocystéyl au polypeptide en cours d'élongation (76) (Figure 6). L'ARN_t est ensuite libéré ce qui induit la dissociation du complexe SelB-SECIS. L'élément SECIS est enfin déplié pour sa lecture par le ribosome qui termine la synthèse protéique au codon stop.

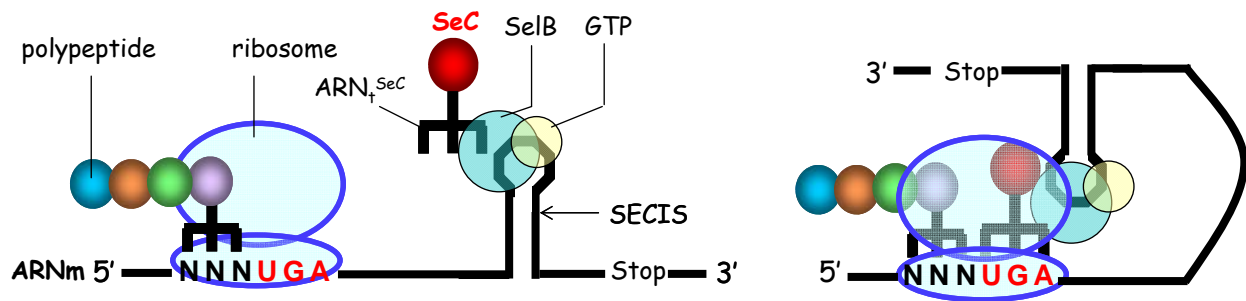


Figure 6 : Éléments conduisant à l'insertion de la sélénocystéine dans les sélénoprotéines.

L'ARN_t spécifique de la sélénocystéine (ARN_t^{Sec}) forme un complexe avec le facteur d'élongation SelB, du GTP et la séquence SECIS située directement en aval du codon UGA. Cet ensemble dirige le résidu sélénocystéyl en face du codon UGA pour son insertion dans la chaîne polypeptidique. (ARNm : Acide ribonucléique messager, SECIS : Selenocysteine insertion sequence, GTP : guanosine triphosphate, ARN_t^{Sec} : ARN de transfert spécifique de la sélénocystéine, NNN : triplet de 3 nucléotides).

Chez les organismes eucaryotes et les archaebactéries, les mécanismes d'incorporation de la sélénocystéine présentent un degré de complexité supérieur. Contrairement à l'élément SECIS bactérien situé immédiatement en aval du codon UGA, l'élément SECIS des mammifères est localisé dans la région 3' non codante de l'ARNm loin du codon sélénocystéine UGA (65), (3), (61), (77, 78). L'élément SECIS des archaebactéries est également dans la région non codante mais il est structurellement différent de celui des mammifères (79, 80). Récemment, la présence d'un nouveau type d'élément SECIS a été détectée dans des algues (80). L'éloignement de l'élément SECIS du codon UGA permet à un seul élément SECIS de diriger le décodage de plusieurs codons UGA sur un même ARNm pour l'incorporation de plusieurs résidus sélénocystéyls comme l'illustre par exemple la sélénoprotéine P avec ces dix résidus

sélénocystéyls (81). En résumé, l'élément SECIS dirige l'incorporation de résidus sélénocystéyls dans la protéine mais il diffère, entre les organismes eucaryotes et procaryotes (regroupant bactéries et archaebactéries), aussi bien en séquence, qu'en structure ou localisation sur l'ARN messager. Les fonctions de la protéine SelB sont assurées, chez les archaebactéries et les mammifères, par deux éléments distincts : La protéine SBP2 (SECIS-binding protein-2) pour la liaison à l'élément SECIS et le facteur d'élongation eEFSec ou mSelB (82-84). Le mécanisme d'incorporation de la sélénocystéine n'a toutefois pas pu être reconstitué *in vitro* à partir d'extraits cellulaires eucaryotes ce qui suppose l'intervention d'autres composants encore non identifiés dans ce mécanisme (85, 86).

Chez les eucaryotes, il semblerait que la protéine SBP2 soit le facteur limitant de la biosynthèse. En effet, le taux d'expression d'une sélénoprotéine le plus important jamais observé est celui de la glutathion peroxydase 4 dans les spermatozoïdes où la protéine SBP2 est fortement exprimée (87) ; alors qu'elle est quasiment indétectable dans les autres tissus (88, 89). La surexpression de SBP2 dans le testicule suggère son rôle essentiel dans la biosynthèse de fortes quantités de sélénoenzymes dans cet organe.

2.2. Les familles de sélénoprotéines découvertes expérimentalement

Parallèlement à l'élucidation des mécanismes de biosynthèse des sélénoprotéines, des sélénoprotéines ont été identifiées et leurs fonctions biologiques caractérisées. L'existence de nombreuses sélénoprotéines est prédite par des approches *in silico* (cf. chapitre 2.3) mais seules quelques familles de sélénoprotéines ont été retrouvées expérimentalement.

2.2.1. Les sélénoprotéines bactériennes

Les sélénoprotéines bactériennes de fonctions connues sont limitées à 5 familles détaillées ci-après.

2.2.1.1 Les formiate déshydrogénases

Les formiate déshydrogénases constituent une classe de sélénoprotéines bien caractérisées. Initialement identifiées chez *Escherichia coli*, ces sélénoprotéines ont été retrouvées chez de nombreuses bactéries et d'autres microorganismes non procaryotes comme *Neurospora crassa*. Elles catalysent la transformation de l'acide formique en dihydrogène H₂ et dioxyde de carbone CO₂ fournissant ainsi de l'énergie à la cellule. Trois isoformes ont été identifiées chez *E. coli*, les formiate déshydrogénases H, N et O (FdhH, H pour hydrogène ; FdhN, N pour nitrate ; FdhO, O pour oxygène). La FdhH est un membre du complexe protéique formiate hydrogenlyase (FHL) (90, 91). C'est un polypeptide de 79 kDa synthétisé seulement sous conditions fermentatives à partir du gène *fdhF* (63). Son site actif, siège des réactions enzymatiques, comporte un résidu sélénocystéyl (SeC), un atome de molybdène, deux cofacteurs molybdopterin guanine dinucleotide (MGD), et un cluster 4Fe,4S (48). Des études cristallographiques de cette protéine ont confirmé que l'atome de sélénium du résidu sélénocystéyl est impliqué dans l'activité catalytique de l'enzyme (92). La FdhN est une enzyme multimérique de 510 kDa composée de trois sous-unités, dont la première est une sélénoprotéine, les deux suivantes correspondant au cytochrome b556 et à une protéine constituée de quatre motifs riches en cystéine (35). Les gènes qui codent pour les trois sous-unités sont organisés en opéron *fdnGHI* induit en conditions anoxiques (93-95). La FdhN est un membre du complexe nitrite réductase. La FdhO est également composée de 3 sous-unités codée par l'opéron *fdoGHI* (96). Chacune de ces sous-unités présente un haut degré de similarité dans sa séquence en acides aminés avec celles de la FdhN. FdhO est induite quand les cellules se développent en conditions aérobies mais une induction lors de la respiration nitrate a également été observée (97).

2.2.1.2 Les hydrogénases

La première de ces enzymes fut identifiée chez *Methanococcus vanielii* (98). Il s'agit d'un hétérooctamère de trois sous-unités, dont l'une contient un résidu sélénocystéyl. Les hydrogénases catalysent la réaction de clivage du dihydrogène en 2 protons et 2 électrons. Cette réaction est en partie possible grâce au potentiel catalytique élevé du sélénium (99).

2.2.1.3 La sélénoprotéine D

La sélénoprotéine D ou SelD est une sélénophosphate synthétase procaryote, mentionnée plus haut, est impliquée dans la synthèse de la sélénocystéine (72, 100). C'est une enzyme de 37 kDa qui catalyse la formation de monosélénophosphate à partir d'ATP et de séléniure. Le résidu sélénocystéyl est essentiel pour l'efficacité catalytique de l'enzyme (96).

2.2.1.4 Les sélénoprotéines des complexes réductase

Les trois complexes glycine réductase, sarcosine réductase et bétaine réductase de *Eubacterium acidaminophilum* sont composés de la sélénoprotéine A commune aux trois complexes, et d'une sélénoprotéine B spécifique pour chaque substrat (101). Ces enzymes catalysent la réduction de leur substrat par désacétylation, ce qui permet la synthèse d'ATP. Elles jouent donc un rôle important dans le métabolisme énergétique (102-104). La proline réductase du même organisme est également une sélénoprotéine, assez similaire à la protéine B du complexe glycine réductase. Les complexes réductase existent également chez d'autres bactéries anaérobies comme *Clostridium sticklandii* ou *Treponema denticola* (105).

2.2.1.5 La sélénoperoxyrédoxine

Une enzyme de la famille des peroxyrédoxines a été identifiée avec un résidu sélénocystéyl à la place du résidu cystéyl classique chez *E. acidaminophilum* (105). Ces enzymes sont impliquées dans la réduction des hydroperoxydes et de ce fait participent à la lutte contre le stress oxydatif (104).

2.2.2. Les sélénoprotéines archaébactériennes

La présence de sélénoprotéines chez les archaébactéries est confinée aux genres *Methanococcus* et *Methanopyrus* (6, 106). Les sélénoprotéines identifiées par des méthodes biochimiques sont la formiate déhydrogénase et l'hydrogénase de *M. vannielii* (98, 107). Cette liste a été complétée par des approches *in silico*, décrites plus loin, après détermination de la séquence des génomes de *M. jannaschii* et d'autres archaébactéries. Mis à part la sélénophosphate synthétase dont la fonction est impliquée dans la biosynthèse de la sélénocystéine, toutes les autres ont une fonction dans la conservation de l'énergie par méthanogénèse (108).

2.2.3. Les sélénoprotéines eucaryotes

La seule sélénoprotéine eucaryote et non mammifère connue est la glutathion peroxydase de la plante modèle *Chlamydomonas reinhardtii* (90). Cette sélénoprotéine a été mise en évidence par analyse MALDI Qq TOF MS et constitue l'unique sélénoprotéine de plante connue à ce jour. Les paragraphes qui suivent présentent les sélénoprotéines mammifères et leurs fonctions.

2.2.3.1 La sélénophosphate synthétase SPS2

La sélénophosphate synthétase mammifère SPS2 est une sélénoenzyme homologue de SelD. SPS2 qui catalyse la synthèse du monosélénophosphate à partir de l'ATP et du séléniure (109).

2.2.3.2 La famille des glutathions peroxydases

La glutathion peroxydase fut en 1973 la première sélénoprotéine de mammifère identifiée (110, 111). Depuis, sept isoenzymes de cette famille ont été caractérisées chez l'homme, dont cinq seulement sont des sélénoprotéines (5, 112, 113). Ces isoformes diffèrent par leur distribution dans les tissus (3). Les glutathion peroxydases permettent de détoxifier différents types de peroxydes aux dépens du glutathion. Elles partagent toutes le même mécanisme catalytique impliquant une triade d'acides aminés strictement conservée et formée de sélélocystéine, tryptophane et glutamine (59). Les glutathion peroxydases constituent la barrière essentielle de l'organisme contre le stress oxydatif (114, 115).

2.2.3.3 La famille des désiodases

Le fonctionnement normal de la thyroïde dépend de la présence de deux éléments traces, l'iode et le sélénium (116). L'iode semble utilisé uniquement pour la production des hormones thyroïdiennes (116). Le sélénium est retrouvé dans trois désiodases (D1-D3) qui régulent l'activité des hormones thyroïdiennes en clivant une liaison carbone-iode (117, 118). Ces trois désiodases sont des oxydoréductases avec un centre catalytique conservé impliquant un résidu de sélélocystéine. Elles diffèrent cependant par leurs séquences, leurs structures, mais aussi par les réactions qu'elles catalysent. Leur rôle au cours du développement des vertébrés est fondamental bien que leur inactivation chez la souris ne soit pas létale (119-123). La découverte de séquences homologues aux désiodases dans les génomes séquencés de microorganismes de la mer des Sargasses est donc surprenante et montre que les fonctions de ces enzymes ne sont pas complètement élucidées (124).

2.2.3.4 Les thiorédoxines réductases

La thiorédoxine réductase (TrxR) joue un rôle régulateur rédox et antioxydant important dans la cellule (125). Cette sélénoprotéine eucaryote de 112 à 130 kDa, composée de 2 sous-unités identiques, réduit une large gamme de substrats dont les protéines oxydées, les ponts disulfures, la vitamine, les hydroperoxydes

et le sélénite. Chez les mammifères, il existe trois isoformes de la thiorédoxine réductase : la thiorédoxine réductase cytoplasmique TrxR1, la thiorédoxine réductase mitochondriale TrxR2 et la thiorédoxine réductase TrxR3 aussi appelée thiorédoxine glutathion réductase TGR. Elles possèdent toutes un résidu SeC en pénultième position essentiel pour leur activité catalytique. Toutefois, de nombreux variants de ces TrxR peuvent être générés par des épissages alternatifs pour leur adressage vers différents organites (126-128). L'inactivation des gènes des TrxR1 ou 2 est létale *in utero*, reflétant l'implication de ces protéines dans un grand nombre de processus cellulaires vitaux (129).

2.2.3.5 La sélénoprotéine P

La sélénoprotéine P (SeLP) est une glycoprotéine extracellulaire découverte initialement chez le rat en 1982 (130), puis chez l'homme en 1993 (131). Alors que les sélénoprotéines ne possèdent en généralement qu'un résidu sélénocystéyl, la sélénoprotéine P peut présenter jusqu'à 10 résidus sélénocystéyls incorporés spécifiquement dans sa séquence par 2 éléments SECIS. Les fonctions de la sélénoprotéine P ne sont pas connues avec certitude ; cependant son rôle dans l'homéostasie du sélénium en fournissant certains organes tels que le cerveau, les reins ou encore les testicules a été observé (123, 132). Ainsi, SeLP est la sélénoprotéine la plus abondante dans le plasma où elle constitue plus de 50% des réserves de sélénium plasmatique (133). Il a également été rapporté que la sélénoprotéine P protège les cellules endothéliales des dommages oxydatifs (134, 135). En cas d'empoisonnement par des métaux lourds, SeLP a la capacité de fixer les métaux lourds (136, 137).

2.2.3.6 La sélénoprotéine R

La sélénoprotéine R, également appelée sélénoprotéine X a été découverte simultanément *in vivo et in vitro* (138, 139). Cette protéine participe à la lutte contre le stress oxydatif en réduisant les résidus méthionyl-R-sulfoxydes des protéines oxydées. Pour cette raison, on la trouve également sous le nom de méthionine-R-sulfoxyde réductase (MsrB1) (140, 141). Le remplacement de la SeC du site actif par une Cys engendre un mutant *msrB* avec une activité spécifique environ 800 fois plus faible ce qui confirme le rôle important du résidu sélénocystéyl dans l'activité catalytique (142). Le réducteur utilisé par MsrB1 est la thiorédoxine, qui à son tour est réduite par la thiorédoxine réductase, ce qui permet de lier les activités de ces deux sélénoenzymes (143). En plus de la réparation des méthionines oxydées lors du stress oxydatif, les méthionine-sulfoxyde réductases sont impliquées la régulation d'activités enzymatiques ou encore dans la communication cellulaire (141).

2.3. Recherche *in silico* des gènes codant pour les sélénoprotéines et définition des sélénoprotéomes procaryotes et eucaryotes

2.3.1. Les approches bioinformatiques

A partir de 2003, le groupe de V. Gladyshev à l'université du Nebraska a largement complété les listes de sélénoprotéines procaryotes et eucaryotes grâce à de nouvelles approches *in silico* (6, 144, 145). Ces approches ont pu considérablement se développer grâce à l'augmentation du nombre de génomes séquencés. Les programmes de détection des séquences codantes (CDS pour CoDing Sequence) interprètent le codon UGA uniquement comme codon stop ce qui empêche la détection des gènes codant pour les sélénoprotéines. Afin d'y remédier, deux approches bioinformatiques ont été développées pour rechercher *in silico* des gènes codant pour les sélénoprotéines.

La première approche recherche les éléments SECIS dans les banques de données de génomes entièrement ou partiellement séquencés (Genome Database Human, NCBI genome microbial database...). L'analyse des éléments SECIS dans les règnes eucarya, bacteria et archaea a permis de déterminer les séquences consensus et les motifs structuraux caractéristiques de ces éléments. A partir de ces informations, des modèles SECIS ont été définis pour chaque règne (Figure 7). Les programmes SECISearch 2.0 (5), bSECISearch (145) et Archaeal SECISearch (6) recherchent ces modèles SECIS respectivement dans les génomes séquencés des organismes eucaryotes, des bactéries et des archaebactéries. Les gènes à proximité de l'élément SECIS sont ensuite étudiés pour déterminer s'ils codent ou non pour une sélénoprotéine.

La seconde approche est indépendante de l'élément SECIS. Elle part du constat que la plupart des sélénoprotéines possèdent des homologues ayant une cystéine à la place de la sélénocystéine. Lors de cette approche, les génomes séquencés (partiellement ou totalement) et comportant toute ou partie de la machinerie d'insertion de la sélénocystéine (gènes *selB*...) sont sélectionnés. Les séquences issues de la traduction de ces génomes sont ensuite comparées aux séquences des banques protéiques (UniProtKB/Swiss Prot, ...) afin d'identifier celles dont le codon UGA s'aligne avec une cystéine dans une protéine homologue. Les gènes sélectionnés sont enfin analysés pour vérifier qu'ils codent pour une sélénoprotéine. Les listes de sélénoprotéines procaryotes et eucaryotes obtenues par ces approches bioinformatiques sont présentées dans les paragraphes suivants.

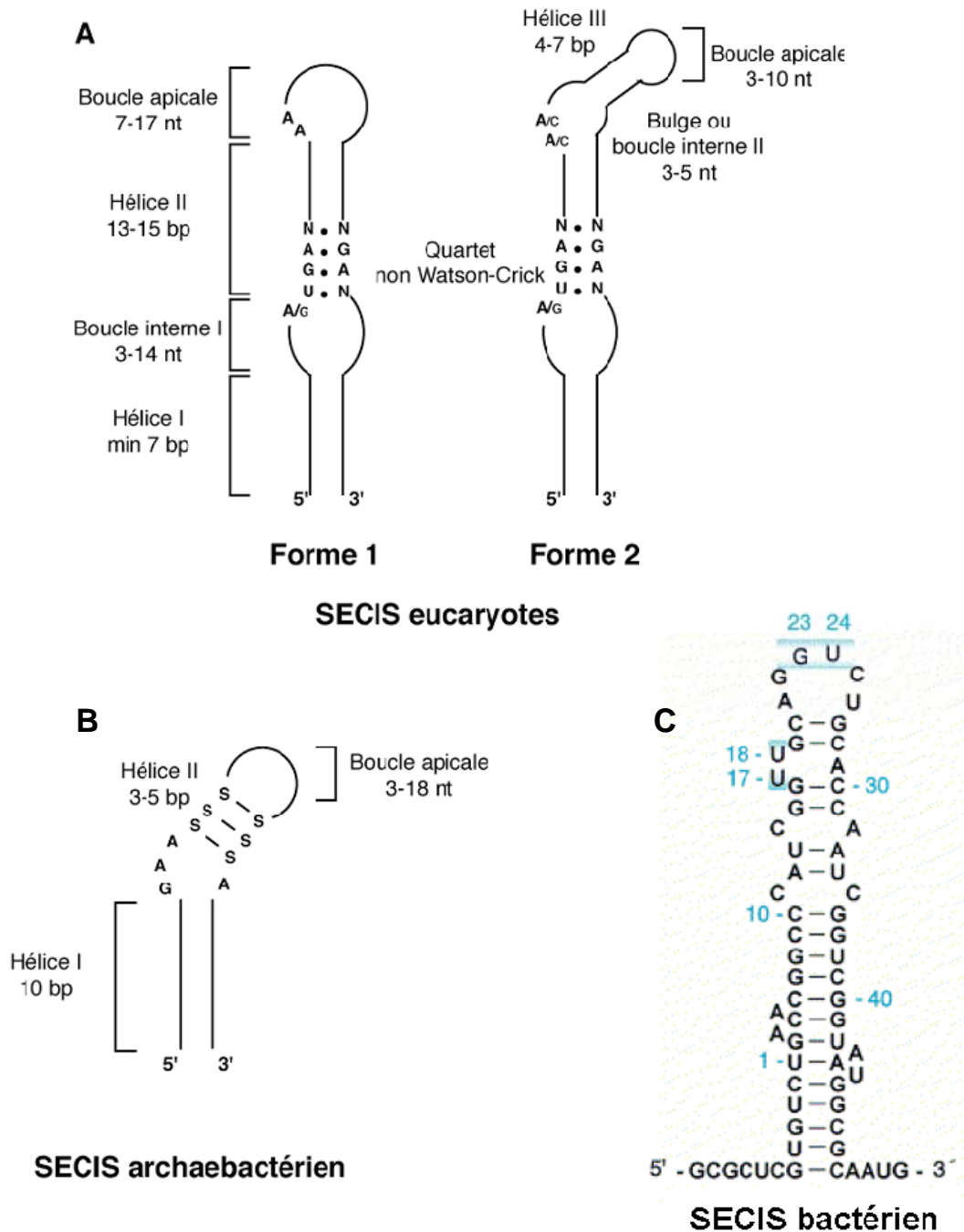


Figure 7 : Modèles structuraux des ARN SECIS eucaryotes, archaebactériens et bactériens.

A : Structures secondaires consensus des 2 éléments SECIS eucaryotes. N représente n'importe quel nucléotide (61).

B : Structure secondaire consensus de l'élément SECIS archaebactérien (6).

C : Structure de l'élément SECIS bactérien de la formiate déhydrogénase. En bleu sont indiquées les bases interagissant avec SelB (146).

2.3.2. Le sélénoprotéome procaryote

Le sélénoprotéome procaryote constitue l'ensemble des sélénoprotéines des organismes bactériens et archaebactériens. Avant la recherche *in silico* de sélénoprotéines, peu de sélénoprotéines étaient connues chez les procaryotes (Tableau 4). Deux types d'études bioinformatiques ont contribué à redéfinir le sélénoprotéome procaryote.

La première étude a consisté en l'analyse des génomes procaryotes séquencés et répertoriés dans la banque de données « genome microbial » du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Ces organismes ont été isolés d'environnements très différents par des techniques de microbiologie classiques. Cependant, ils ne représentent qu'une infime minorité des procaryotes. L'analyse des 47 génomes procaryotes complètement et partiellement séquencés (respectivement 14 et 33) en avril 2004 a permis l'identification de 5 nouveaux gènes codant pour des sélénoprotéines en plus des 10 déjà connus (6).

Le second type d'étude recherche des gènes codant pour des sélénoprotéines dans l'ensemble des organismes provenant d'un même environnement, la mer des Sargasses. En 2003, des échantillons d'eaux de surface ont été collectés et les génomes de leurs populations microbiennes séquencés, constituant une base de données de 1,045 milliards de paires de bases de séquences non redondantes annotées (147). L'annotation de ces séquences n'a pas tenu compte du double sens du codon UGA ; ainsi, aucun gène codant pour une sélénoprotéine n'a été annoté et identifié. Sur cette base, Zhang *et al* ont appliqué l'approche bioinformatique indépendante de l'élément SECIS pour caractériser le sélénoprotéome de cette population microbienne (124). La base de données de la mer des Sargasses est relativement riche en sélénoprotéines avec 101 gènes codant pour des sélénoprotéines répertoriés en 15 nouvelles familles (Tableau 4).

Les résultats de la première étude laissent penser que le gène codant pour la sélénoprotéine formiate déhydrogénase est le plus abondant chez les procaryotes. Chez les microorganismes de la mer des Sargasses, cette famille de sélénoprotéines n'arrive plus qu'en 12^{ème} position avec 8 occurrences loin derrière les familles des protéines de type SelW (48 occurrences), des peroxyrédoxines (43 occurrences) et des proline réductases (42 occurrences) qui constituent à elles seules 88% des gènes de sélénoprotéines identifiées. La formiate déhydrogénase étant spécialisée dans le catabolisme anaérobie, ce résultat n'est pas surprenant pour des échantillons d'eaux prélevés en surfaces de mer, eaux bien oxygénées. Parmi les nouvelles familles de sélénoprotéines identifiées, il est surprenant de voir apparaître des glutathion peroxydases, des désiodases et des sélénoprotéines de type W, que l'on pensait exclusivement eucaryotes. Il est en effet évident que la désiodase remplit des fonctions différentes, tout en utilisant les mêmes propriétés catalytiques, chez les bactéries et chez les mammifères, où elle régule l'activité des hormones thyroïdiennes par des réactions d'oxydoréduction.

Ainsi les sélénoprotéomes procaryotes décrit en 2004 et celui de la Mer des Sargasses sont différents et biaisés par le nombre ou l'origine des microorganismes séquencés et ne reflètent certainement qu'une partie du sélénoprotéome procaryote réel (124).

Chez *Methanococcus jannaschii*, sept sélénoprotéines ont été identifiées par bioinformatique dont six impliquées dans la méthanogenèse (148, 149): ceci inclut trois hydrogénases, une formiate déshydrogénase, une disulfure réductase et une formylméthanofurane déshydrogénase. La dernière est la sélénophosphate synthétase. Ces enzymes sont des sélénoprotéines alors que chez d'autres espèces bactériennes du genre *Methanococcus* des protéines homologues à cystéine sont retrouvées (98, 107, 150-152).

Tableau 4 : Sélénoprotéines procaryotes caractérisées expérimentalement.

Sélénoprotéines	Fonctions	Occurrence dans les génomes séquencés	Occurrence dans la banque de la Mer des Sargasses
Formiate déshydrogénase, sous-unité α	Conversion de formiate en CO_2	40	8
Glycine réductase A	Conversion de glycine en acétylphosphate	5	1
Glycine réductase B	Conversion de glycine en acétylphosphate	5	1
Proline réductase B	Métabolisme énergétique	1	42
Hétérodisulfide réductase sous-unité A	Fonction d'oxydo-réduction	4	0
Méthylviologène hydrogénase réductrice sous-unité δ	Fonction d'oxydo-réduction	3	0
Sélénophosphate synthétase	Synthèse de sélénoprotéines	16	28
Formylméthanofurane déshydrogénase sous-unité B	Fonction d'oxydo-réduction	4	0
Coenzyme F420 hydrogénase réductrice, sous-unité α	Fonction d'oxydo-réduction	4	0
Coenzyme F420 hydrogénase réductrice, sous-unité δ	Fonction d'oxydo-réduction	3	0
Peroxi-rédoxine (Prx)	Fonction d'oxydo-réduction ?	1	43

Tableau 5 : Nouvelles sélénoprotéines prédites en bioinformatique.

Vingt nouvelles sélénoprotéines sont proposées par bioinformatique (sur la base de leur identification dans plusieurs génomes et la présence d'éléments SECIS putatifs) (6, 124). Douze sélénoprotéines potentielles (sur la base de leur identification dans 1 seul génome et la présence d'éléments SECIS putatifs) ont également été répertoriées mais ne sont pas indiquées dans ce tableau.

Sélénoprotéines	Fonctions	Occurrence dans les génomes séquencés	Occurrence dans la banque de la Mer des Sargasses
<i>The prokaryotic selenoproteome, Kryukov et al. 2004 (6)</i>			
Glutathion peroxydase (GPx)	Réduction d'oxydo-réduction	1	5
Protéine de type HesB	Fonction d'oxydo-réduction	7	0
Protéine de type SelW	antioxydant ?	4	48
Protéine de type peroxirédoxine (Prx)	Fonction d'oxydo-réduction ?	2	22
Thiorédoxine (Trx)	Fonction d'oxydo-réduction	2	11
<i>The microbial selenoproteome of the Sargasso sea, Zhang et al., 2005 (145)</i>			
Protéine de type AhpD	Inconnue	0	27
Arséniate réductase	Réduction de l'As ^V en As ^{III}	0	14
Glutarédoxine (Grx)	Fonction d'oxydo-réduction	1	10
Protéine de type DsrE	Oxydation du soufre intracellulaire ?	1	2
Protéine de type DsbG	Fonction d'oxydo-réduction	1	1
NADH:ubiquinone oxydoréductase	Fonction d'oxydo-réduction	0	1
Protéine MoeB	Biosynthèse de molybdoenzymes	0	11
Protéine de type DsbA	Fonction d'oxydo-réduction ?	0	9
Glutathion S-transférase	Conjugaison du glutathion	0	4
Protéine de type désiodases	Inconnue	0	4
Protéine contenant un domaine CMD	Inconnue	0	4
Protéine hypothétique 1	Inconnue	0	4
Sulfurtransférase de type rhodanese	Inconnue	0	3
Protéine de type OsmC	Fonction d'oxydo-réduction ?	0	3
Protéine de type thiol-disulfide isomérase	Inconnue	0	4

2.3.3. Le sélénoprotéome eucaryote

2.3.3.1 Le sélénoprotéome mammifère

Jusqu'en 2003, le sélénoprotéome mammifère consistait en 12 sélénoprotéines organisées en 7 familles. Depuis, les approches *in silico* ont permis de déterminer le répertoire exhaustif des sélénoprotéines humaines avec l'annotation de 25 gènes mammifères codant pour des sélénoprotéines (5, 89, 138, 139, 153). Ces sélénoprotéines sont les glutathion peroxydases, les thiorédoxine réductases (TRx1, TRx2 et TRx3), les désiodases thyroïdiennes (Dio1, Dio2 et Dio3), les sélénoprotéines I, H, K, M, N, O, P, W, X, Y, Z et la sélénophosphate synthétase SPS2. Les principales sélénoprotéines chez les mammifères sont présentées dans le Tableau 6. La plupart de leurs fonctions sont encore inconnues mais le lien entre les déficits en sélénium et un nombre croissant de pathologies a permis de comprendre les fonctions de certaines d'entre elles. En général, ces protéines possèdent des propriétés anti-oxydantes impliquées dans différents mécanismes de protection de l'organisme.

2.3.3.2 Les nouvelles familles de sélénoprotéines eucaryotes

Les analyses d'organismes eucaryotes non mammifères ont ensuite permis d'identifier de nouvelles familles de sélénoprotéines dont les fonctions restent inconnues. Le génome de la drosophile contient 3 gènes codant pour des sélénoprotéines. En plus du gène de la sélénophosphate synthase, seuls 2 gènes codant pour la **sélénoprotéine BthD** et une **sélénoprotéine de 12kDa riche en glycine** ont été rapportés. Ces deux sélénoprotéines ont des fonctions biologiques encore inconnues (154). Après avoir montré que le sélénium était nécessaire à la croissance de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, les sélénoprotéines de cette algue ont été identifiées par Novoselov *et al* en 2002 (155). L'identification de l'élément SECIS dans cette algue a permis de développer un programme spécifique de ces algues appelé ChlamySECISearch à partir du programme SECISearch existant. Cette application a permis l'identification de 8 gènes codant pour des sélénoprotéines déjà connues. Ces sélénoprotéines sont Sel K, Sel M1 et M2, Sel W, thiorédoxine réductase 1, glutathion peroxydase hydroperoxyde phospholipidique 1 et 2 (PHGPx 1 et 2) et d'un gène codant pour une méthionine-S-sulfoxyde réductase appelée **MsrA1**. Chez les autres eucaryotes, la méthionine-S-sulfoxyde réductase possède un résidu cystéyl à la place du résidu sélénocystéyl. Les gènes codant pour une nouvelle famille de sélénoprotéines appelées **SelU** ont été identifiés dans plusieurs organismes eucaryotes non mammifères (poisson zèbre, poulet, algues vertes, diatomées). L'homologue de SelU chez l'homme possède une cystéine à la place de la sélénocystéine. La fonction de ces protéines n'a pas été déterminée (144). La famille de sélénoprotéines **SelJ** a été identifiée dans un nombre restreint d'eucaryotes, poissons et oursins de mer. SelJ pourrait avoir un rôle structural et

ne possède pas d'homologue à cystéine chez les mammifères (156). Récemment, l'analyse des génomes de plusieurs parasites humains a permis l'identification de nouvelles familles spécifiques à ces parasites. L'analyse de *Plasmodium falciparum*, agent responsable de la malaria chez l'homme, a permis de détecter 4 gènes codant pour des sélénoprotéines de fonctions inconnues. Ces sélénoprotéines nommées **Sel 1, 2, 3 et 4** sont très conservées dans les espèces de *Plasmodium* mais n'ont pas d'homologues connus chez d'autres organismes. Ces 4 sélénoprotéines pourraient être des protéines d'oxydo-réduction (157). Les analyses des génomes séquencés de *Trypanosoma* et *Leishmania* ont permis de désigner une nouvelle famille : les **sélénoprotéines SelTryp**. Ces sélénoprotéines pourrait avoir des fonctions d'oxydo-réduction.

Tableau 6 : Le sélénoprotéome eucaryote.

SELENOPROTEINES	FONCTIONS
<i>Sélénoprotéines mammifères</i>	
Famille des glutathion peroxydases (GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX6)	Anti-oxydants, modulation de lipoxygénases, transduction du signal rédox, régulation du cycle cellulaire
Famille des iodothyronine desiodases (Dio1, Dio2, et Dio3)	Activation et inactivation des hormones thyroïdiennes T3 et T4
Famille des thiorédoxine réductase (TrxR1, TrxR2, TrxR 3)	Rôles multiples dans la régulation rédox, spermatogenèse
Sélénoprotéine I (SelI) ou phosphotransférase	Biosynthèse de phosphatidyléthanolamine
Sélénoprotéines H, K, M, O, S, T, V	Inconnues
Sélénoprotéine N (SelN)	Régénération et prolifération cellulaire ?
Sélénoprotéine P (SelP)	Antioxydant ? Stockage du sélénium ?
Sélénoprotéine R (SelR, SelX, Msr B)	Réparation des protéines oxydées
Sélénophosphate synthétase 2 (SPS2)	Synthèse de sélénophosphate
Sélénoprotéine W (SelW)	Antioxydant ?
Sélénoprotéine de 15 kDa (Sel15)	Inconnues
<i>Autres sélénoprotéines eucaryotes</i>	
Méthionine-S-sulphoxyde réductase (MsrA)	Réparation des protéines oxydées
Sélénoprotéines J	Rôle structural ?
Sélénoprotéine U, Y, Z (SelU)	Inconnues
Sélénoprotéine BthD	Inconnue
Sélénoprotéine 12 kDa	Inconnue
Sélénoprotéine 18 kDa (Sel18)	Inconnue
Sélénoprotéines SelTryp	Fonction d'oxydo-réduction ?
Sélénoprotéines 1, 2, 3 et 4	Fonction d'oxydo-réduction ?

2.3.4. Limites des approches bioinformatiques

Les méthodes bioinformatiques ont permis de découvrir *in silico* de nombreuses familles de sélénoprotéines dont les fonctions sont encore à découvrir pour la plupart. Ces méthodes très utiles sont toutefois restreintes au petit nombre d'organismes ayant leur génome séquencé. D'autres limitations spécifiques à chaque méthode existent. La méthode indépendante de l'élément SECIS ne permet pas de trouver les gènes codant pour des sélénoprotéines qui n'ont pas d'homologues à cystéine. Par exemple, le gène codant pour la sélénoprotéine A du complexe glycine réductase ne peut pas être détecté par ce type d'approche. La méthode recherchant l'élément SECIS connaît également certaines limitations. L'analyse du sélénoprotéome bactérien effectuée par Zhang *et al* en 2005 par cette méthode n'a pas retrouvé 3 gènes codant pour des sélénoprotéines déjà connues (145). 2 de ces 3 gènes présentent des structures SECIS inhabituelles non reconnues par le programme bSECISearch. De plus, des repliements locaux de l'ARNm similaires à l'élément SECIS conservé peuvent se former et entraîner l'apparition de « faux positifs » (158). Cette méthode n'est pas à l'abri de la prédiction d'un faux élément SECIS. Il faut également noter que la connaissance du sélénoprotéome par ces méthodes ne renseigne ni sur les conditions d'expression ni sur les fonctions de ces sélénoprotéines. Seules des études expérimentales réalisées dans des conditions données le permettent.

2.3.5. Les sélénoprotéines non prédites à découvrir : l'exemple des sélénoprotéines de *Desulfococcus multivorans*

Des approches *in vitro* ont révélé la présence de sélénoprotéines dans des organismes vivants que la bioinformatique ne peut pas étudier. Ainsi, les expériences effectuées par le groupe de recherche du Pr. Matthias Böll montrent que les bactéries anaérobies strictes *Desulfococcus multivorans* et *Geobacter metallireducens* produisent des sélénoprotéines lors de la dégradation de composés aromatiques comme le benzoate (159). La croissance de ces 2 bactéries sur benzoate est strictement dépendante du sélénium alors qu'elle ne l'est pas sur substrats non aromatiques. Le rôle du sélénium a alors été étudié chez *D. multivorans* par utilisation du radiotracer ⁷⁵Se (160). Trois protéines marquées au ⁷⁵Se ont été détectées après électrophorèse SDS-PAGE lors de la croissance de l'organisme sur benzoate en présence de sélénite marqué au ⁷⁵Se. Ces protéines ont des poids moléculaires apparents de 27, 30 et 100 kDa (Figure 8). La comparaison des niveaux d'expression de ces sélénoprotéines en présence de benzoate ou d'acétate montre que la sélénoprotéine de 30 kDa présente l'induction la plus importante. L'identification de ces sélénoprotéines est importante car elle permettrait de mieux comprendre le métabolisme des composés aromatiques qui représentent un sérieux problème environnemental en raison de leur toxicité et de leur persistance.

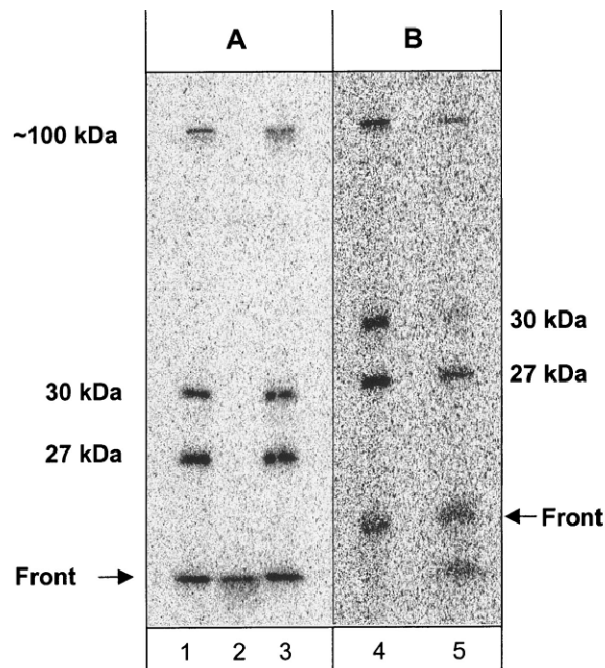


Figure 8 : Autoradiogramme après SDS-PAGE d'extraits cellulaires de *Desulfococcus multivorans* cultivée sur un milieu de culture contenant du ^{75}Se -sélénite (160).

(A) et (B) : Autoradiogrammes d'un gel SDS-PAGE 10% (A) et d'un gel SDS-PAGE 12,5%(B). Pistes 1 à 4 : extraits bruts de cellules cultivées sur benzoate. Piste 2 identique à piste 1 après traitement des extraits cellulaires à la protéinase K. Piste 3 : après traitement à la RNase A. Piste 5 : extraits bruts de cellules cultivées sur lactate.

3 : Principes de l'analyse des protéines par électrophorèse sur gel.

Le protéome constitue l'ensemble des protéines codées par le génome d'un organisme. Suivant les conditions environnementales, seule une partie du protéome est présente dans un organisme. Ainsi, alors que le génome d'un organisme est constant, la nature et la quantité des protéines varient en permanence en réponse aux différentes conditions de vie de cet organisme (161). L'organisme va en effet s'adapter aux conditions environnementales en produisant les protéines dont il a besoin. Pour avoir accès aux protéines exprimées par l'organisme, des approches expérimentales dites de protéomiques sont utilisées. D'une manière générale, l'approche protéomique classique consiste à séparer le mélange protéique complexe extrait de l'organisme par électrophorèse sur gel, à digérer les protéines et à analyser par spectrométrie de masse MALDI TOF-MS le digestat (Figure 9) (162). Enfin, les identifications des protéines par interprétation des données de spectrométries de masse sont réalisées grâce à des outils bioinformatiques spécialisés. Dans le cas où l'identification en MALDI TOF-MS n'a pas pu aboutir, le digestat protéique est analysé en spectrométrie de masse en tandem ESI-MS/MS avec une séparation préalable des peptides en nanoLC. D'autres approches existent, comme par exemple l'approche type « shotgun proteomics » où la totalité des polypeptides est digérée par une endopeptidase puis séparée par nanoLC mono ou bidimensionnelle (163). Ces nouvelles approches restent encore peu quantitatives et moins résolutive que l'approche classique tout en générant un grand nombre de peptides à analyser simultanément. Le propos de ce sous-chapitre est de présenter les différentes techniques utilisées dans l'approche dite classique en 4 parties : la préparation de l'échantillon, la séparation des protéines, l'analyse par spectrométrie de masse et les stratégies d'identification des protéines au travers des recherches dans les banques de données.

3.1. Préparation de l'échantillon

Une préparation de l'échantillon appropriée est absolument essentielle pour de bons résultats en électrophorèse sur gel 1D ou 2D. En raison de la grande diversité des protéines dans un échantillon biologique, la procédure de préparation d'échantillon optimale pour un échantillon donné doit être déterminée empiriquement. Idéalement, le procédé doit résulter en la dénaturation, solubilisation et réduction complètes des protéines dans l'échantillon. Des étapes additionnelles de préparation de l'échantillon peuvent être utilisées afin d'améliorer la qualité de la préparation. Ici, sont présentées les principales étapes de préparation de l'échantillon.

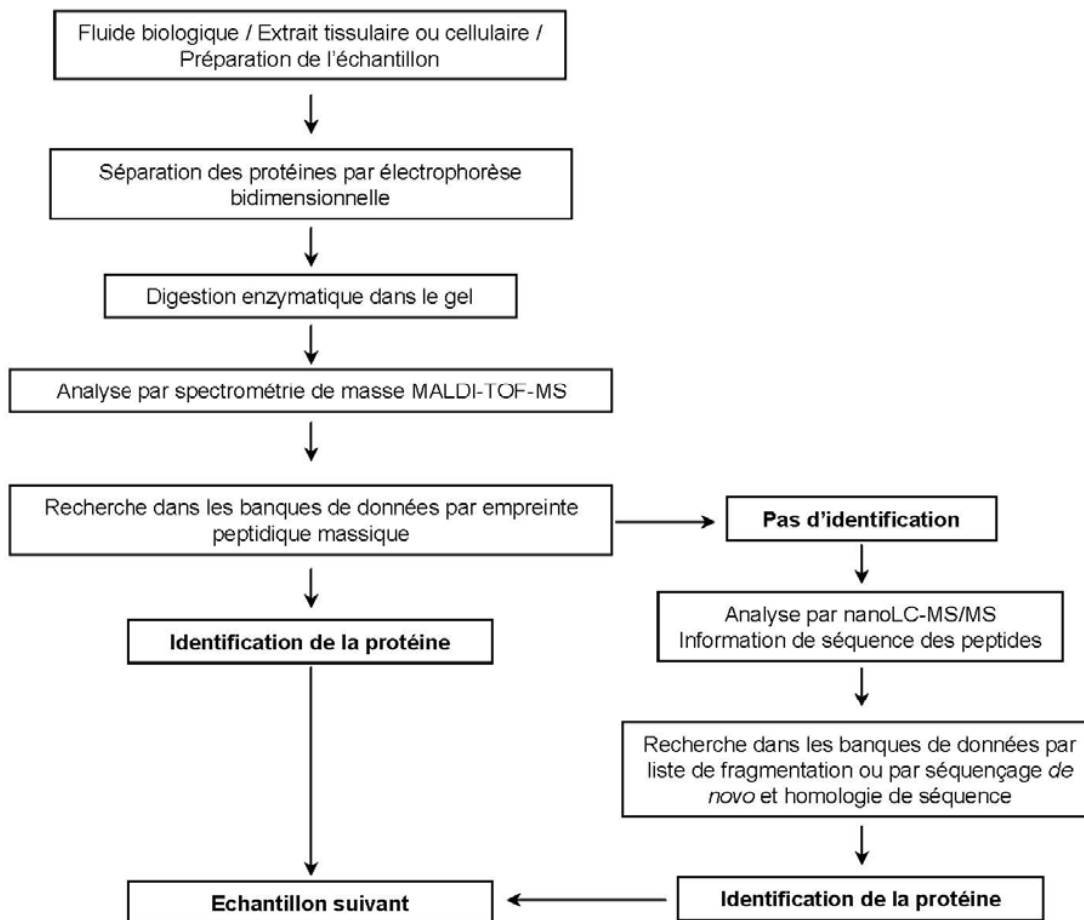


Figure 9 : Stratégie classique d'identification des protéines basée sur l'électrophorèse sur gel.

3.1.1. Lyse des cellules, protection contre la protéolyse et fractionnement

L'analyse des protéines intracellulaires nécessite une lyse cellulaire efficace. Le choix de la méthode de lyse dépend à la fois de la nature de l'échantillon biologique et de l'objectif de l'analyse (par exemple, l'étude concerne-t-elle toutes les protéines ou une classe particulière de protéines ?). Globalement les méthodes de lyse sont classées en deux types : les méthodes de lyse dites « douces » et les méthodes dites « vigoureuses » (Tableau 7).

Des protéases peuvent être libérées lors de la lyse des cellules. Les protéines de l'échantillon doivent donc être protégées de la protéolyse par l'utilisation d'inhibiteurs de protéases. Les plus utilisés sont le PMSF (phénylméthylsulfonyl fluoride), l'AEBSF (aminoéthyl benzylsulfonyl), l'EDTA, le TPCK (tosyl phénylalanine chlorométhyl cétone) ou encore des mélanges de ces différents inhibiteurs (164).

Tableau 7 : Méthodes générales de lyse cellulaires

Méthode de lyse cellulaire	Procédure générale	Applications	Références
Méthodes de lyse douce			
Lyse avec des détergents	Resuspension des cellules dans une solution de lyse contenant du SDS (incompatible avec IEF) ou d'autres détergents non ioniques	Cellules bactériennes Cellules de tissu en culture	(165)
Lyse enzymatique	Lysozyme pour cellules bactériennes Cellulase et pectinase pour les plantes Lyticase pour les levures	Cellules de plantes, de bactéries et levures	(165, 166)
Lyse par cycle de congélation / décongélation	Rapide congélation de suspension cellulaire dans de l'azote liquide puis décongélation	Cellules bactériennes Cellules de tissu en culture	(167, 168)
Méthodes de lyse vigoureuse			
Sonication	Cellules sont lysées par des ultrasons générés par un sonicateur	Suspensions cellulaires	(164)
Cellule à presse de French®	Cellules sont cassées par une différence de pression	Microorganismes à paroi cellulaire	(169)
Broyage	Les cellules sont congelées dans de l'azote liquide puis broyées dans un mortier avec un pilon	Tissus solides, microorganismes	(164)

3.1.2. Précipitation et élimination des espèces interférentes

Les procédures de précipitation sont généralement utilisées pour concentrer un échantillon en protéines et purifier ces protéines des espèces contaminantes comme les sels, acides nucléiques, lipides qui peuvent empêcher le bon déroulement d'une électrophorèse 1D ou 2D. Les procédures de précipitation les plus employées sont :

- Précipitation au sulfate d'ammonium : la plupart des protéines ont tendance à s'agglomérer ou à précipiter en présence de fortes concentrations en sels. La précipitation ne va s'opérer que si la concentration en protéines est supérieure à 1mg/mL d'échantillon. L'inconvénient de cette méthode est que toutes les protéines ne précipitent pas dans ces conditions et elle ne permet pas d'éliminer tous les interférents. Cette méthode est cependant utilisable comme technique de préfractionnement (170).
- Précipitation à l'acétone : ce solvant précipite les protéines mais connaît les mêmes limitations que celles observées lors de la précipitation au sulfate d'ammonium (171).
- Précipitation au TCA (acide trichloroacétique) : après précipitation, le TCA résiduel est habituellement éliminé par lavages à l'acétone. Les protéines précipitées au TCA peuvent être difficiles à resolubiliser (171).
- Précipitation au TCA dans l'acétone : la combinaison des 2 permet d'assurer une précipitation maximisée (172).

Etant donné qu'aucune méthode de précipitation / resuspension ne permet de récupérer toutes les protéines d'un échantillon, cette étape peut altérer le profil protéique de l'échantillon. Lorsqu'une représentation précise et complète des protéines d'un échantillon est attendue, ces étapes doivent donc être évitées.

3.2. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel

Il n'existe aujourd'hui aucune technique capable de séparer toutes les protéines d'un organisme. La technique la plus résolutive reste l'électrophorèse sur gel suivie d'une détection quantitative des protéines par coloration. L'électrophorèse permet de séparer des molécules chargées en solution par application d'un champ électrique. Le gel de polyacrylamide, introduit en 1959, est la matrice la plus utilisée en électrophorèse pour séparer les protéines d'un organisme. C'est un gel inerte de porosité variable, légèrement hydrophobe, produit de la polymérisation de monomères d'acrylamide en longues chaînes réticulées par du NN'-méthylènebisacrylamide. Les principes des électrophorèses sur gel IEF, 1D-SDS-PAGE et 2D-SDS-PAGE sont ici présentés.

3.2.1. Principe des électrophorèses de protéines sur gel de polyacrylamide

3.2.1.1 Focalisation isoélectrique (IEF)

La focalisation isoélectrique (IEF) est une technique d'électrophorèse sur gel qui sépare les protéines selon leurs points isoélectriques (pI) dans un gradient de pH. Le point isoélectrique d'une protéine est le pH pour lequel la charge nette de la protéine est nulle. Les protéines, entraînées par un champ électrique, vont se déplacer dans ce gradient en fonction de leur charge nette. Quand une protéine arrive au point de pH qui correspond à son point isoélectrique, sa charge globale devient nulle résultant en un arrêt de sa migration : on parle de focalisation isoélectrique (Figure 10). Initialement, le gradient de pH dans le gel était obtenu, sous l'influence d'un champ électrique, par la focalisation à leur point isoélectrique de petites molécules amphotères à fort pouvoir tampon. Les gradients de pH ainsi obtenus sont peu stables et ont été délaissés au profit de gels dans lesquels le gradient de pH est immobilisé (IPG pour « Immobilized pH gradients ») (173). Ce sont des gels de polyacrylamide greffés de monomères d'acrylamide portant des groupements ionisables de pK acides ou basiques. Ils permettent d'obtenir des gradients de pH très stables et une séparation protéique de moins de 0,001 unités de pH. L'apparition de gradients de pH linéaires et étroits (zooms de pH) a permis d'augmenter la résolution et donc le nombre de protéines détectées sur gels. L'IEF possède une grande résolution mais son spectre d'application reste limité car certaines protéines ne sont pas solubilisées correctement (protéines hydrophobes) dans les tampons compatibles à l'IEF ou ne sont pas visibles (protéines de pI extrêmes) après électrophorèse. Ce mode de séparation utilise la charge des protéines ce qui proscrit l'utilisation des détergents ioniques très efficaces comme le SDS pour la solubilisation des protéines. Les protéines vont donc être solubilisées dans des tampons à faible force ionique contenant des agents chaotropiques (urée, thiourée), de détergents zwitterioniques ou non ioniques (CHAPS, triton X-100, tween, sulfobétaine SB3-10 ou amidosulfobétaine ASB-14) et des agents réducteurs (DTT, TBP) (174). Une haute qualité de préparation de l'échantillon est souvent nécessaire. Il est en effet important de se débarrasser des impuretés ioniques et des sels présents aux côtés

des protéines après la lyse cellulaire. Ces impuretés peuvent empêcher une focalisation correcte des protéines, des précipitations TCA/acétone des protéines sont donc conseillées pour les enlever. Les acides nucléiques, les lipides, les polysaccharides, les composés phénoliques sont également des composés qui peuvent empêcher de différentes manières la focalisation correcte des protéines. De la qualité de cette préparation de l'échantillon vont dépendre les résultats de l'électrophorèse IEF et l'électrophorèse 2D.

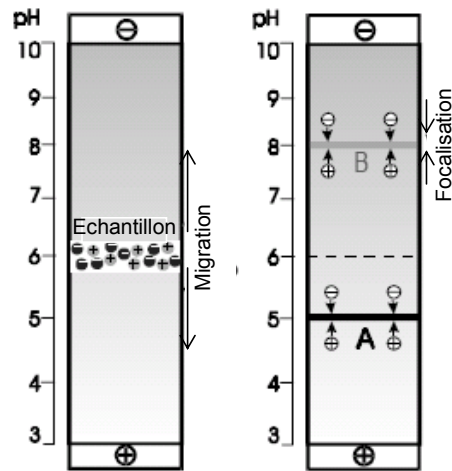


Figure 10 : Principe de la focalisation isoélectrique des protéines (164).

Après application d'une tension, les protéines migrent dans le gradient de pH et se focalisent au point de pH correspondant à leur pI.

3.2.1.2 Electrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE)

Un autre technique de séparation des protéines est la très populaire **SDS-PAGE** pour « Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamide Gel Electrophoresis » décrite initialement par Laemmli en 1970 (175), et aujourd'hui très largement répandue. C'est une électrophorèse de zone des protéines dans un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Les protéines extraites de l'organisme sont solubilisées dans une solution chauffée à 100°C, tamponnée au pH 6,8 par du Tris-HCl et contenant un excès de sodium dodécyl sulfate (SDS) et d'agent réducteurs des thiols (DTT ou le β -mercaptoéthanol). Le SDS charge négativement les protéines et les dénature, aidée par le chauffage, en entourant le squelette polypeptidique. L'agent réducteur réduit les ponts disulfures des protéines ce qui a pour conséquence de les dissocier en sous-unités polypeptidiques individuelles. Les protéines ainsi solubilisées migrent dans un système d'électrophorèse discontinu constitué de deux gels de polyacrylamide de porosité différente et tamponnés à des pH différents (Figure 11). Les gels sont coulés et polymérisés dans un système vertical « en sandwich » entre 2 plaques de verre. L'échantillon est déposé au-dessus d'un premier gel appelé gel de

concentration (stacking gel) tamponné au pH 6,8 par du Tris-HCl et de réticulation très lâche. Dans ces conditions, la présence de glycine dans la solution de la cuve d'électrophorèse va permettre de concentrer les protéines dans le gel au cours de la migration. Au pH 6,8 du gel, la glycine est faiblement chargée et présente une faible mobilité contrairement au Cl^- complètement ionisé avec une forte mobilité. Lorsqu'une tension est appliquée au système, les ions Cl^- migrent plus vite dans le gel laissant derrière eux une zone de faible conductivité, un gradient de tension important et un pH plus élevé qui accélère la migration de la glycine de façon à ce qu'elle suive les ions Cl^- . Ce front constitué par les ions Cl^- et les ions glycine migrent au travers de l'échantillon puis au travers du gel. Les protéines chargées négativement par le SDS possèdent une vitesse de migration intermédiaire et vont de ce fait se trouver emprisonnées et donc concentrées dans la fine zone délimitée par les ions Cl^- et les ions glycine. Les protéines ainsi concentrées sont ensuite séparées suivant leur taille dans le gel de séparation (running gel) tamponné à pH 8,8 avec des pores plus petits. La migration des protéines dans ces pores va être ralentie jusqu'à devenir plus faible que celle des ions glycine. Le pH 8,8 a pour effet d'augmenter la vitesse de migration des ions glycine qui vont alors dépasser les protéines et se trouver juste derrière les ions Cl^- . Les protéines ne sont plus emprisonnées dans la fine zone et sont alors séparées suivant leur taille par migration vers l'électrode positive. La comparaison du profil de migration des protéines à celles de marqueurs de taille (M) connus et traités de la même façon permet de donner la masse moléculaire relative (M_r) des protéines séparées.

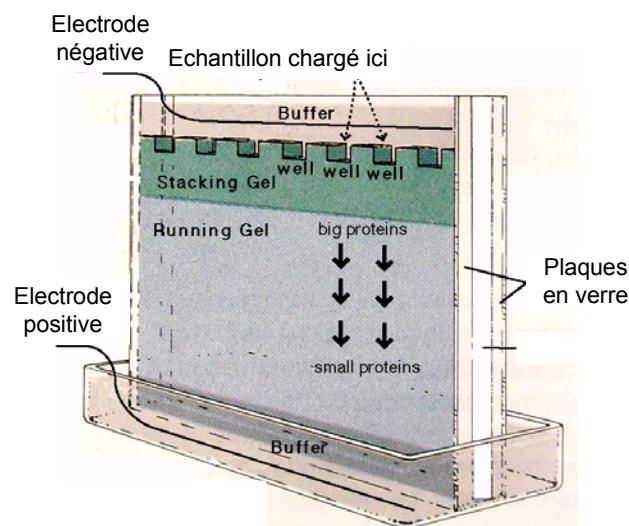


Figure 11 : Principe de l'électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (1D-SDS-PAGE).

L'électrophorèse SDS-PAGE est une technique robuste qui possède un très large spectre d'applications (176). Le SDS-PAGE est de nos jours utilisé en routine principalement pour (i) estimer la taille des protéines, (ii) établir la pureté d'une protéine, (iii) quantifier les protéines, (iv) contrôler l'intégrité protéique, (v) comparer le contenu protéique de différents échantillons, (vi) analyser la taille et le nombre des sous-unités protéiques, (vii) et en seconde dimension pour établir des cartes 2D (177). La dénaturation des protéines entraîne la perte de leur activité enzymatique ce qui oblige parfois à avoir recours à l'électrophorèse de zone non dénaturante plus délicate à utiliser et presque toujours moins résolutive (177).

3.2.1.3 Electrophorèse bidimensionnelle de protéines sur gel de polyacrylamide (2D-SDS-PAGE)

L'électrophorèse bi dimensionnelle sur gel (2D-SDS-PAGE ou gel 2D) est la seule méthode actuellement disponible pour la séparation simultanée de milliers de protéines. Les protéines sont séparées suivant une première dimension en fonction de leur charge nette par focalisation isoélectrique (IEF) puis suivant une deuxième dimension en fonction de leur taille moléculaire par SDS-PAGE (Figure 12). Cette technique est appropriée à l'étude des protéines comprises entre 10 et 300 kDa avec un point isoélectrique compris entre 4 et 10. Introduite dans les années 1970 (175), perfectionnée par O'Farrell en 1975 (178), cette technique permet aujourd'hui de résoudre jusqu'à 5000 protéines simultanément avec une grande reproductibilité (2000 protéines en routine) (178-180). Les limites de cette technique sont les mêmes qu'en IEF (181). Les protéines membranaires et basiques sont largement sous-représentées sur les gels 2D en raison de problèmes d'extraction et de solubilisation pour l'IEF (181). Aussi, en raison de la grande diversité des protéines, la résolution des gels 2D n'est pas toujours suffisante pour les séparer efficacement et la co-migration de plusieurs protéines par spot n'est pas rare (182, 183). La gamme dynamique maximale visible sur gel 2D est de 10^4 au maximum. Or dans certains échantillons comme le sérum, la gamme dynamique peut atteindre 10^9 (181). Des méthodes de pré-fractionnement sont donc nécessaires afin de visualiser les protéines minoritaires. Cette technique permet cependant d'observer plusieurs milliers de protéines, certaines modifications post-traductionnelles ainsi que de grandes variations de masses visibles sur la deuxième dimension.

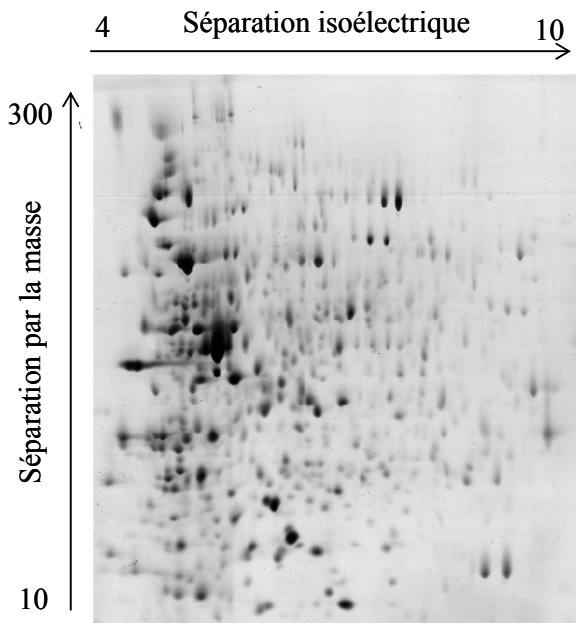


Figure 12 : Exemple d'une électrophorèse bidimensionnelle sur gel de protéines en conditions dénaturantes (2D-SDS-PAGE).

3.2.2. Détection de protéines dans les gels de polyacrylamide

Une fois l'électrophorèse effectuée, les différentes protéines présentes sur le gel sont révélées par coloration ou par fluorescence. Le choix du colorant ou de l'agent fluorescent utilisé va déterminer la sensibilité de la technique. Les colorants les plus communément utilisés sont répertoriés dans le Tableau 8 avec les limites de détection et les gammes de linéarité correspondantes.

- Le bleu de Coomassie : bien que peu sensible, il est parfaitement adapté pour les études comparatives du fait de sa réponse linéaire.

- La coloration à l'argent : elle est 100 fois plus sensible que la coloration au bleu mais souvent au prix d'un grand nombre d'étapes et de réactifs parfois coûteux (184). Au-delà de certaines concentrations, la réponse devient non linéaire et des incompatibilités avec l'analyse par spectrométrie de masse MALDI et ESI ont été mises en évidence (185).

- La coloration par fluorescence (coloration Sypro® ruby par exemple) : elle est à l'heure actuelle la technique la plus sensible avec la plus grande gamme de linéarité mais elle nécessite un scanner à fluorescence, équipement onéreux, pour obtenir une image de la répartition des protéines.

D'autres types de colorations sont développés afin d'être plus sensibles et plus compatibles avec la spectrométrie de masse comme la coloration au ruthénium (176) ou des colorations modifiées à base

d'argent (186). L'électrophorèse peut être réalisée en conditions natives, il est alors très appréciable de révéler l'activité des enzymes grâce à des substrats colorés.

La méthode d'analyse des gels colorés a évolué grâce aux progrès combinés de l'informatique et de l'analyse d'image. La première étape de l'analyse est la digitalisation des gels, c'est-à-dire la transformation de l'image expérimentale en une information numérique utilisable par ordinateur. L'image digitalisée est ensuite traitée avec divers logiciels. Dans le cadre de l'analyse protéomique, les informations pertinentes sont alors issues d'analyses différentielles obtenues par comparaison des gels entre eux.

Au vu de toutes ces limitations, même si le gel 2D est encore largement utilisé, des techniques alternatives ont été développées éliminant l'étape d'IEF. En effet, même si l'IEF est à l'origine de la haute résolution du gel 2D notamment pour la séparation des variants post-traductionnels, elle est aussi la cause de la plupart des limitations du gel d'électrophorèse 2D.

Tableau 8 : Principales méthodes de coloration des protéines après électrophorèse sur gel (187).

Méthodes de coloration	Limite de détection (ng)	Gamme de linéarité (ordres de grandeur)
Bleu de Coomassie CBB-R	50 à 100	1 à 1,3
Nitrate d'argent	1	2
Sypro® Orange, Ruby (Fluorescence)	1 à 8	>3
Deep purple® (Fluorescence)	<1	4

3.3. Techniques de spectrométrie de masse pour l'identification des protéines séparées par électrophorèse sur gel

En biologie, l'étude des protéines passe par la détermination de leur séquence primaire en acides aminés. La dégradation d'Edman a longtemps été la méthode de choix pour la détermination des séquences d'acides aminés grâce au séquenceur automatique commercialisé en 1967 (188). Dès le début des années 90, cette méthode a été supplantée par la spectrométrie de masse devenue actuellement la méthode la plus sensible de caractérisation des biomolécules (7, 189-191). La spectrométrie de masse moléculaire est aujourd'hui une technique de base pour l'identification et la caractérisation des biomolécules. Cet essor est venu du développement de deux nouvelles techniques d'ionisation dites « douces » par John Bennett Fenn et Toichi Tanaka (prix Nobel de Chimie 2002) en 1989. Ces techniques appelées respectivement ionisation par électronébulisation (ElectroSpray Ionisation ou ESI) et ionisation laser assistée par matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation ou MALDI) permettent d'amener en phase gazeuse et sous forme ionisée des biomolécules pour leur analyse en spectrométrie de masse (192, 193). Généralement, les protéines séparées par électrophorèse sur gel sont digérées par la trypsine avec une procédure maintenant bien établie (194). Les peptides sont ensuite analysés par les techniques de spectrométrie de masse MALDI-TOF MS et nanoLC-ESI-MS/MS pour l'identification de protéines. Ces techniques sont présentées dans le chapitre suivant.

3.3.1. Spectrométrie de masse à ionisation MALDI

3.3.1.1 Technique d'ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

La technique d'ionisation laser assistée par matrice (MALDI) a été développée à la fin des années 80 par Karas et Hillenkamp (193) et, au même moment, par une équipe japonaise (195) pour l'analyse de peptides et de protéines. Cette technique consiste à irradier un dépôt cristallin contenant une matrice organique et l'échantillon à analyser avec un faisceau laser pulsé généralement dans l'UV. Les molécules d'analytes sont co-cristallisées avec la matrice sur un support en acier inoxydable, conducteur et chimiquement inerte vis à vis de l'échantillon. La matrice MALDI est une petite molécule capable d'absorber fortement les radiations UV (ou IR) du laser. Elle est choisie en fonction de la molécule à analyser et de la longueur d'onde du laser utilisé. Les matrices les plus couramment utilisées en protéomique sont l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -CHCA) (analyse de peptides et petites protéines), l'acide sinapinique (analyse de protéines entières), l'acide 2,5-dihydrobenzoïque (DHB) (matrice polyvalente). Afin de faciliter l'ionisation des molécules d'analytes, la matrice est déposée en large excès par rapport à l'analyte (rapport de 100 : 1 à 10000 : 1). Les processus conduisant à l'ionisation ne sont pas, à l'heure actuelle, entièrement élucidés. Le faisceau laser va irradier sous vide le dépôt

cristallin. La matrice va alors fortement absorber l'énergie des photons pour se retrouver excitée puis ionisée. Elle va se dissocier et se sublimer, créant un plasma et entraînant les molécules d'analytes dans ce plasma (196). A ce niveau, un transfert de proton est réalisé, en phase gazeuse, de la matrice vers l'analyte créant des ions essentiellement monochargés (Figure 13) (197, 198).

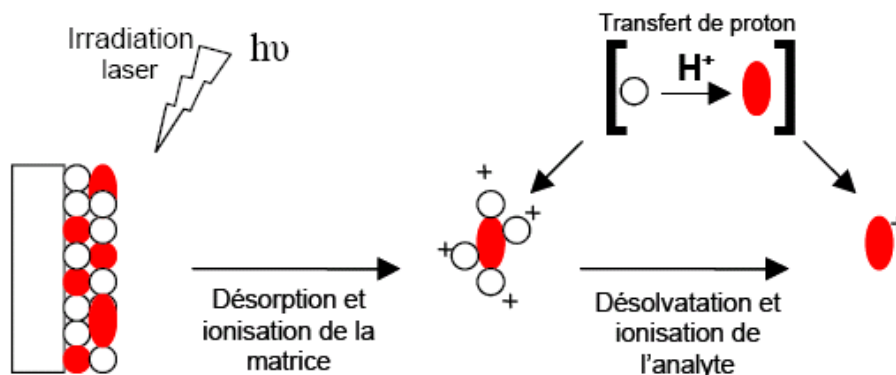


Figure 13 : Principe de l'ionisation MALDI

3.3.1.2 Les analyseurs de type temps de vol (TOF)

Les ions moléculaires générés sont généralement analysés par un analyseur de type temps de vol (TOF). Les ions sont d'abord accélérés dans la **zone d'accélération** par application d'un champ électrique intense pour atteindre une zone libre de champ (le tube de vol) où règne un vide poussé ($2 \cdot 10^{-7}$ mbar), puis le détecteur. Le rapport m/z est directement corrélé au temps de vol, les ions de m/z élevé arrivant plus tardivement au détecteur que ceux de faible m/z (Figure 14).

Les premiers analyseurs TOF souffraient d'une mauvaise résolution jusqu'à ce que deux dispositifs aient été mis en place permettant d'atteindre une résolution de 20000 :

- L'extraction retardée (« Delayed extraction® ») (199, 200). L'utilisation d'une lentille supplémentaire permet d'appliquer pendant un bref délai suivant le tir laser un potentiel légèrement supérieur à celui de la cible s'opposant ainsi à la propagation des ions dans l'analyseur. La focalisation temporelle et spatiale est donc améliorée.

- Le réflecteur électrostatique (201). Le réflecteur est composé d'une série d'anneaux ou de grilles sur lesquels sont appliqués des potentiels croissants, agissant comme un miroir électrostatique. Le champ créé par ce miroir électrostatique va permettre de renvoyer les ions vers le détecteur « réflectron ». En fonction de l'énergie cinétique que possèdent les ions, ils évoluent plus ou moins profondément dans le réflecteur. Au final, les ions de même masse nominale m/z sont refocalisés et arriveront au même moment au détecteur ce qui a pour conséquence d'améliorer la résolution de séparation.

La Figure 14 rassemble l'ensemble de ces dispositifs pour illustrer le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF.

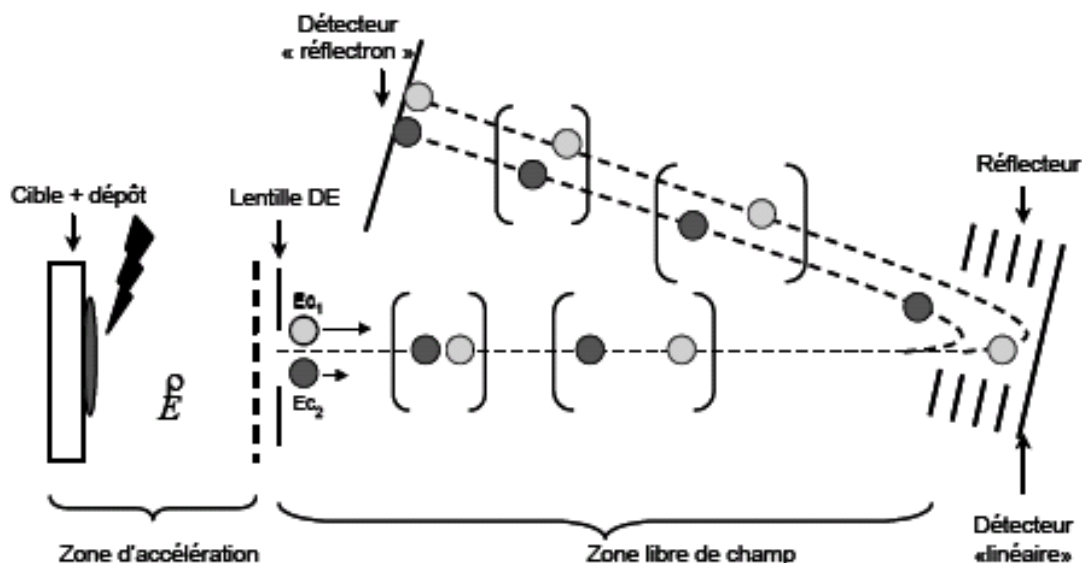


Figure 14 : Schéma représentant le principe de fonctionnement d'un MALDI-TOF avec un réflecteur électrostatique et un système d'extraction retardée.

3.3.1.3 Expérience de fragmentation en mode « Post Source Decay »

Des expériences de fragmentation peuvent être effectuées en spectrométrie de masse MALDI en mode « Post Source Decay ». Le processus de dégradation des ions dans le tube de vol, zone libre de champ, est désigné par le terme PSD pour Post Source Decay (202). Les principaux mécanismes d'activation à l'origine de ce phénomène sont essentiellement :

- la dégradation métastable d'ions ayant accumulé beaucoup d'énergie interne sur la cible ou par collisions multiples dans la source,
- la dissociation induite par collisions dans l'analyseur.

La nature de la matrice semble jouer un rôle important dans le processus PSD. Une matrice de faible affinité protonique (comme α -CHCA) est une matrice énergétique qui favorise la dégradation de l'échantillon après ionisation et est donc appropriée à l'analyse en PSD. Pour les analyses en PSD, le réflecteur est utilisé en tant que filtre en énergie cinétique. Les fragments les plus légers sont réfléchis plus rapidement et ont un temps de vol plus court que les fragments plus lourds. Cependant, le réflecteur n'est capable d'analyser les ions fragments avec une résolution correcte que sur une certaine gamme d'énergie. Aussi, un spectre complet des ions fragments sur toute la gamme de m/z doit être acquis en plusieurs étapes durant lesquelles les potentiels appliqués dans le réflecteur sont progressivement diminués.

Finalement, toutes les acquisitions sont juxtaposées pour reconstituer le spectre d'ions fragments complet : le spectre PSD est un spectre recomposé. Par ailleurs, l'étalonnage des spectres PSD n'est pas aussi facile que dans le cas des spectres MALDI-TOF classiques. Il n'y a pas de relation simple entre le temps de vol et la masse des ions fragments : de nombreux paramètres instrumentaux sont à prendre en considération. Par conséquent, malgré de récents progrès dans le domaine (203), l'analyse PSD présente l'inconvénient majeur d'être longue et fastidieuse à mettre en oeuvre. Peu sensible (au moins 10 picomoles d'échantillon sont nécessaires), elle offre, de plus, une résolution très limitée (100 à 500 sur une gamme de 1000 m/z). L'apparition d'une nouvelle génération d'instruments appelés TOF-TOF permet de simplifier les expériences MS/MS avec une source MALDI tout en conservant une bonne qualité d'analyse. Actuellement, de plus en plus de constructeurs développent des appareils hybrides comme le MALDI-Q-TOF pour accéder à la séquence des peptides ionisés.

3.3.1.4 Performances de la technique MALDI-TOF MS

La technique MALDI-TOF MS permet de travailler sur une grande gamme de masse (en théorie illimitée, en pratique jusqu'à environ 500 kDa) avec une bonne précision de mesure (10-20 ppm), une bonne résolution (plus de 10000 en général), une bonne sensibilité (détection de quantité sub femtomolaires), une mise en oeuvre assez simple et rapide et une relative tolérance vis à vis des sels et détergents couramment utilisés en biologie (204). La qualité des spectres obtenus va dépendre de plusieurs facteurs liés à la préparation de l'échantillon comme le choix de la matrice, le choix de la méthode de dépôt pour la co-cristallisation de la matrice et de l'analyte (méthode de la goutte séchée, méthode en sandwich). C'est aujourd'hui un instrument de choix pour les mesures de masses précises des peptides tryptiques en analyse protéomique.

3.3.2. Spectrométrie de masse à ionisation électrospray et couplages associés

Dans l'approche traditionnelle, les peptides sont produits par digestion tryptique dans le gel après électrophorèse. Dans le cas où l'analyse en MALDI TOF MS échoue, la nanochromatographie liquide haute performance (nanoHPLC) couplée à l'électrospray MS est utilisée pour l'analyse des peptides et l'identification de la protéine dont ils sont issus.

3.3.2.1. Instrumentation et principe de l'électrospray MS

Le phénomène d'ionisation par électrospray a été décrit par les travaux de Dole en 1968 (205), mais ce n'est que dans les années 80 que cette technique d'ionisation est couplée à un analyseur quadripolaire pour l'analyse de protéines (206, 207). En raison de sa particularité à former des ions multichargés, l'ESI-MS a permis l'analyse de molécules de plus en plus lourdes et complexes avec une précision de mesure en masse remarquable (0,01%). Par ailleurs, la formation d'ions à pression atmosphérique dans la source ES a autorisé son couplage à la chromatographie en phase liquide (LC-MS). Le principe général du spectromètre de masse à ionisation électrospray est schématisé en Figure 15 et détaillé dans le paragraphe suivant.

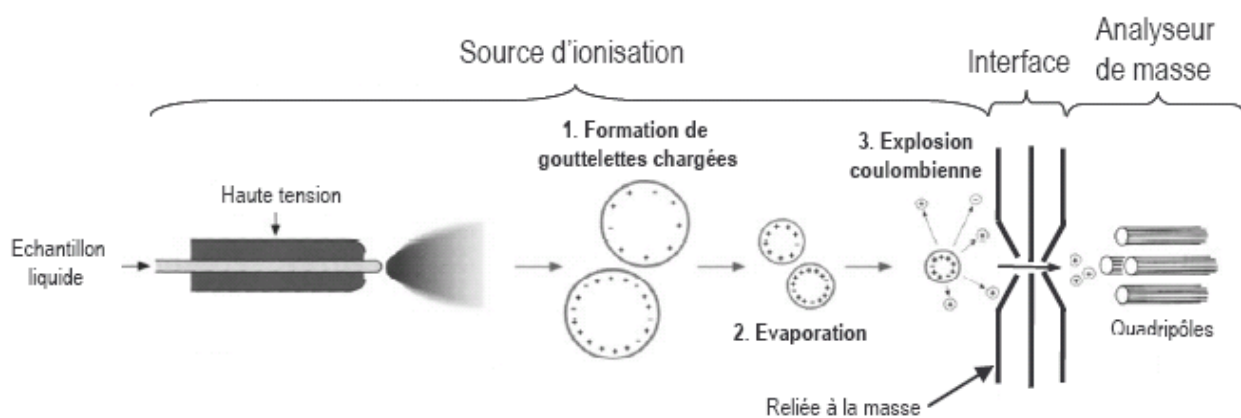


Figure 15 : Schéma de principe du spectromètre de masse à ionisation électrospray

La source électrospray est constituée d'un capillaire métallique maintenu sous haute tension face à une contre électrode située à quelques centimètres et reliée à la masse. Dans ce type de source, des ions désolvatés sont produits en phase gazeuse par électronébulisation de l'échantillon liquide sous l'effet d'un champ électrique intense à pression atmosphérique. Le processus d'ionisation électrospray va s'opérer en plusieurs étapes (208-210). L'application d'une haute tension sur le capillaire métallique va charger les gouttelettes de l'aérosol. Le solvant contenu dans les gouttelettes chargées va progressivement s'évaporer en entraînant une diminution de la taille des gouttelettes. La densité de charge de la gouttelette va

augmenter jusqu'à ce que les forces de répulsion (coulombiennes) provoquent l'explosion de la gouttelette. Les gouttelettes filles formées vont à leur tour subir le même processus sur plusieurs générations jusqu'à donner des ions complètement désolvatés finalement émis en phase gazeuse. Les ions sont ensuite transmis entre la source d'ions à pression atmosphérique et le spectromètre de masse sous vide poussé ($2,5$ à $3 \cdot 10^{-8}$ bar) par une interface. Les ions vont être dirigés vers l'analyseur du spectromètre de masse sous l'action combinée de champs électriques et de gradients de pression pour une séparation fonction de leur rapport m/z . L'analyseur a pour rôle de séparer les ions selon le rapport masse sur charge (m/z). Plusieurs types d'analyseurs compatibles avec le mode d'ionisation électrospray sont commercialisés et le choix de l'analyseur de masse utilisé va s'effectuer selon sa résolution, sa précision de mesure de masse, sa gamme de masse, sa sensibilité et sa capacité à faire de la spectrométrie de masse en tandem, MS/MS. Quatre types d'analyseurs sont couramment utilisés en analyse protéomique :

- les trappes ioniques (IT) (211),
- les temps de vol (TOF) (212),
- les quadripôles (Q) (207),
- les analyseurs de résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FT-ICR) (213). Ces différents analyseurs sont utilisés soit seuls, soit assemblés pour créer des analyseurs hybrides de type Q-TOF pour les plus courants bénéficiant des points forts de chacun des analyseurs assemblés.

Le spectromètre de masse Q-TOF est un instrument hybride composé de trois analyseurs quadripolaires (Q_0 , Q_1 , Q_2) en série avec un analyseur à temps de vol (TOF) orienté perpendiculairement (Figure 16). Le couplage entre le mode d'ionisation électrospray et l'analyseur TOF nécessite une injection orthogonale pulsée des ions provenant du quadripôle dans l'analyseur TOF. Le faisceau d'ions issu des quadripôles entre par un orifice dans l'accélérateur d'ions de l'analyseur TOF. Un champ électrique pulsé est ensuite activé dans l'accélérateur pour commencer la mesure du temps de vol. Ce champ électrique repousse les ions perpendiculairement au faisceau d'ions, vers le tube de vol. Ils ont alors une vitesse inversement proportionnelle à la racine carrée de leur ratio m/z : $V \propto (m/z)^{-1/2}$. A mi-chemin, un miroir ionique renvoie les ions vers un détecteur, appelé MCP (Microchannel Plate ou plateaux à micro-canaux). L'arrivée de chaque ion est ainsi convertie en signal numérique. En partant du principe que les ions de grandes masses traversent le tube de vol plus lentement que les petits ions, le TOF, après calibration, peut mesurer de façon très précise la masse de chaque ion en enregistrant le temps mis entre le moment du « pulse » et l'arrivée au détecteur.

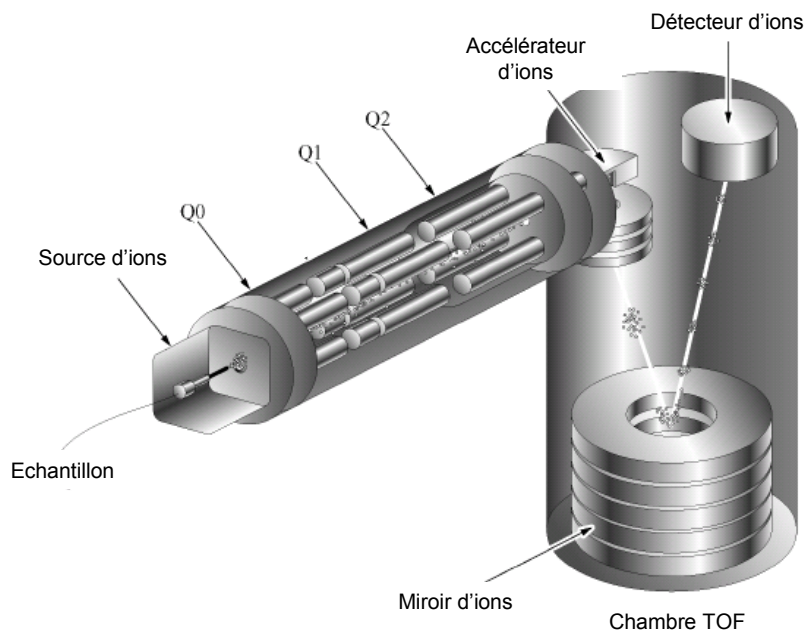


Figure 16 : Schéma d'un spectromètre de masse hybride de type Q-TOF : le Q STAR[®] XL (Applied Biosystems).

3.3.2.2. Spectrométrie de masse en tandem en ESI Q-TOF

3.3.2.2.1 Fonctionnement en mode MS/MS (spectrométrie de masse en tandem)

En mode MS/MS, le spectromètre de masse Q-TOF est utilisé pour étudier la fragmentation des ions par décomposition induite par collision (CID). Plusieurs modes de balayage existent, le mode « détection d'ions parents », le mode « perte de neutre » et le mode « détection d'ions fils » (ou « product ion scan »). Ce dernier mode consiste à sélectionner un « ion parent » dans Q_1 , à le fragmenter dans Q_2 et à analyser les « ions fils » dans le TOF. On parle de MS/MS classique (Figure 17). Le quadripôle Q_0 stabilise le faisceau d'ions et le transmet au quadripôle Q_1 , où l'ion parent est sélectionné puis fragmenté en présence de gaz (Ar, He, N_2 ...) dans la cellule de collision Q_2 . En sortie de chaque quadripôle, des lentilles ioniques sont présentes pour faciliter l'extraction et la refocalisation des ions. Les ions sont ainsi transmis au TOF, fonctionnant comme analyseur de masse, pour obtenir un spectre de masse d'ions fragmentés issus de l'ion parent sélectionné dans Q_1 . L'étude de ces fragments permet de déterminer la nature de l'ion fragmenté, dans le cas d'un peptide et sa séquence. Les principaux avantages du TOF dans cette configuration sont le travail sur une gamme de m/z en théorie illimitée et un gain en sensibilité et en résolution qui permet d'avoir une information sur la composition atomique des ions détectés avant et après fragmentation beaucoup plus précise.

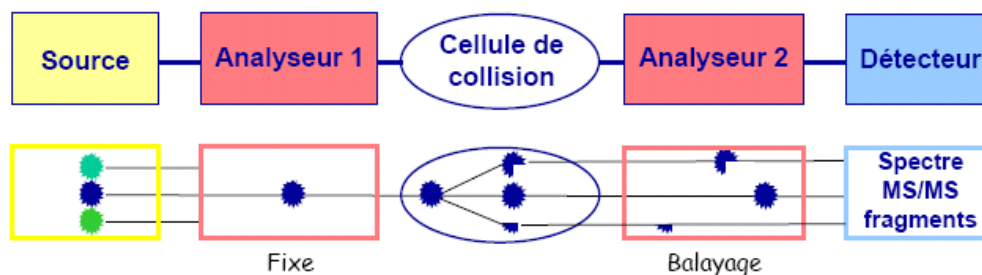


Figure 17 : Mode de balayage « détection d'ions fils » en spectrométrie MS/MS

3.3.2.2.2 Règles de fragmentation en spectrométrie de masse MS/MS

L'identification des séquences peptidiques à partir de l'interprétation des spectres MS/MS est souvent très complexe et nécessite une connaissance des mécanismes de fragmentation des peptides en phase gazeuse. Les spectres MS/MS obtenus sur des analyseurs de type Q-TOF mettent en jeu des collisions de basse énergie avec des molécules de gaz non chargées. On parle de CID pour Collision Induced Dissociation. La fragmentation des peptides se fait essentiellement au niveau de la liaison peptidique. Une nomenclature de fragmentation peptidique introduite par Roepstorff et Fohlmann et complétée et simplifiée par Biemann fait aujourd'hui référence (Figure 18) (214, 215).

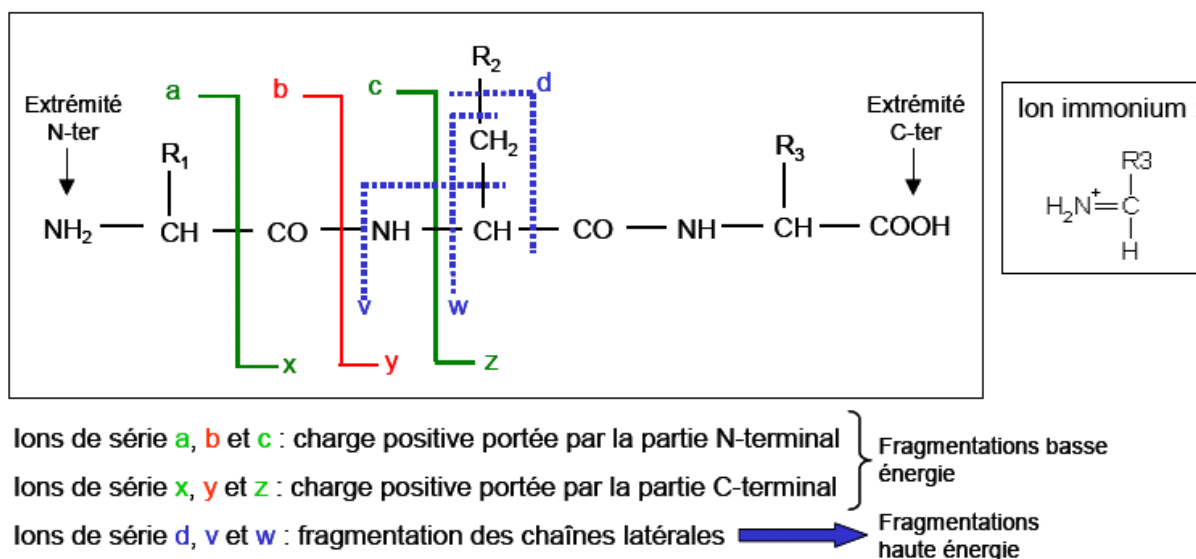


Figure 18 : Nomenclature de la fragmentation peptidique en spectrométrie de masse.

Deux types d'ions sont observés :

- Les ions pour lesquels la charge positive est portée par la partie contenant l'acide aminé N-terminal : **les ions des séries a, b et c.**
- Les ions pour lesquels la charge positive est portée par la partie contenant l'acide aminé C-terminal : **les ions des séries x, y et z.**

Les ions obtenus par fragmentation des chaînes latérales (ions des séries d-, v- et w-) n'apparaissent que lors d'autres fragmentations non présentées ici.

Les spectres de fragmentations peptidiques à basse énergie donnent majoritairement des ions des séries b- et y-. Les différences de masse entre des ions consécutifs d'une même série permettent de déterminer l'identité des acides aminés consécutifs et donc de déduire la séquence partielle ou totale du peptide. Il existe cependant des ambiguïtés lors de l'interprétation des spectres de fragmentation : il est en effet difficile de distinguer les acides aminés isobares leucine et isoleucine ou encore les acides aminés de masses très proches comme la lysine et la glutamine ($\Delta M = 0,036$ Da). Des **fragments internes**, appelés **ions immoniums**, peuvent aider à l'interprétation des spectres MS/MS en confirmant la présence de certains acides aminés dans la séquence. Ces fragments internes ne contiennent qu'une seule chaîne latérale suite à la combinaison de fragmentations de type a- et de type y-. Dans le cas particulier des peptides issus de la digestion tryptique, l'interprétation des spectres de fragmentation est plus simple et permet d'obtenir un meilleur recouvrement des séquences primaires. Les fragments sont porteurs d'une charge permanente, apportée par la lysine ou l'arginine en position C-terminale, qui a pour effet de favoriser la détection des fragments de type y.

3.3.2.3. Le couplage NanoHPLC ESI-MS/MS

Le couplage de la séparation chromatographique et de la détection ESI-MS a été effectué dans le but de séparer des mélanges peptidiques de plus en plus complexes et d'obtenir un maximum d'informations de séquences en acides aminés (216). Les développements en chromatographie avec la miniaturisation des colonnes et en spectrométrie de masse avec la miniaturisation de la source électrospray ont permis le couplage nanoLC-MS/MS qui est aujourd'hui un des instruments de base de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse (217).

3.3.2.3.1. NanoHPLC des peptides et adaptation des systèmes chromatographiques.

La nanochromatographie liquide à haute performance (nanoHPLC) de phase inverse (RP : Reversed phase) est issue de l'expérience acquise avec les techniques micro/cap HPLC classiques. La phase mobile du système chromatographique devant être compatible avec le phénomène d'ionisation électrospray, les

peptides sont élués par un gradient eau/acétonitrile par ordre croissant d'hydrophobicité. Une étape de préconcentration en ligne peut être rajoutée comme l'ont préconisée Giusti *et al* pour l'analyse de composés minoritaires (218). Le principe consiste à injecter un volume 100 à 1000 fois supérieur à celui considéré optimal en nanoHPLC, avec un débit de plusieurs $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ en direction d'une cartouche de préconcentration de diamètre capillaire (300 μm) remplie de la même phase que la nanocolonne (Figure 19). Cette étape permet de préconcentrer et de purifier l'échantillon des sels et matrice non retenus sur la cartouche. Cette purification en ligne est un atout majeur pour une détection en ESI-MS des analytes (219) dont l'ionisation peut être supprimée par les sels et la matrice de l'échantillon.

3.3.2.3.2. Miniaturisation de la source électrospray : la source nanospray

La miniaturisation des sources électrospray (ES) conventionnelles a permis de réduire le débit d'échantillon délivré au niveau de la source. En 1994, Emmet et Caprioli ont développé un dispositif micro-électrospray permettant de travailler à des débits inférieurs à 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ (220), puis Wilm et Mann en 1996 introduisent la source nano-électrospray ou nanoES délivrant un débit de quelques centaines de nL/min. (221). La source nanoES permet d'accroître la sensibilité de la mesure grâce à une taille de gouttelettes plus petite (environ 200 nm de diamètre) avec un rendement d'ionisation/désorption des analytes favorisé (222). Une plus grande tolérance aux contaminations par les sels de solutions tamponnées est également observée, et contrairement à l'ESI, la nanoESI ne requiert plus d'assistance pneumatique contribuant à la désolvatation de l'analyte. Les diverses applications du nanospray, notamment pour l'analyse protéomique montrent aujourd'hui l'importance d'un tel dispositif.

Des expériences de fragmentation en ligne des peptides élués (spectrométrie de masse en tandem communément abrégée LC-ESI-MS/MS) vont alors fournir des **informations de séquence** permettant d'augmenter considérablement la spécificité et la qualité des identifications. Lors d'analyses nanoLC-ESI-MS/MS, la sélection des ions parents pour la fragmentation peut se faire automatiquement, après que l'utilisateur ait défini la valeur seuil à partir de laquelle il y a fragmentation, ou manuellement en rentrant la masse des ions devant être fragmentés. La valeur seuil doit être finement optimisée. Lorsque ce seuil est placé trop bas, les ions parents sont sélectionnés dès qu'ils dépassent le seuil ce qui ne correspond pas forcément à leur maximum d'intensité. Ce n'est donc pas à ce moment que leur fragmentation sera la plus informative. En revanche, lorsque le seuil de sélection est placé trop haut, le risque de perdre des informations sur des ions minoritaires est important. Pour cela une seconde analyse identique à la première doit être réalisée, mais en fixant dans la méthode la masse des ions, détectés dans la première acquisition en mode MS, que l'on souhaite fragmenter dans la seconde en mode MS/MS. On préférera

également sélectionner les ions doublement et triplement chargés qui fragmentent mieux que les ions monochargés (223).

La nanoLC ne peut pas être utilisée seule, sans autre technique de séparation en amont, si l'échantillon est trop complexe. En effet, un extrait protéique contient plusieurs milliers de protéines d'où des centaines de milliers de peptides tryptiques qui ne pourront pas être séparés efficacement sur nano-colonnes. Cette technique sera donc couplée en amont à une autre technique séparative, généralement le gel 2D. D'autres alternatives peuvent être envisagées, comme la chromatographie multidimensionnelle ou le couplage gel SDS/nano-LC, méthodes développées afin de s'affranchir des limites liées aux gels 2D. Même si elle correspond à un gain de résolution significatif, la nanoLC-ESI-MS/MS se trouve limitée par le nombre de pics effectivement séparés sur la nano-colonne de phase inverse. Cette limite a conduit au développement de différentes approches utilisant des **chromatographies bi- ou multi-dimensionnelles**.

Du fait de la bonne sensibilité de détection jusqu'à quelques femtomoles de matériel du couplage nanoLC-MS/MS, cette approche est devenue indispensable à l'électrophorèse pour l'identification des protéines.

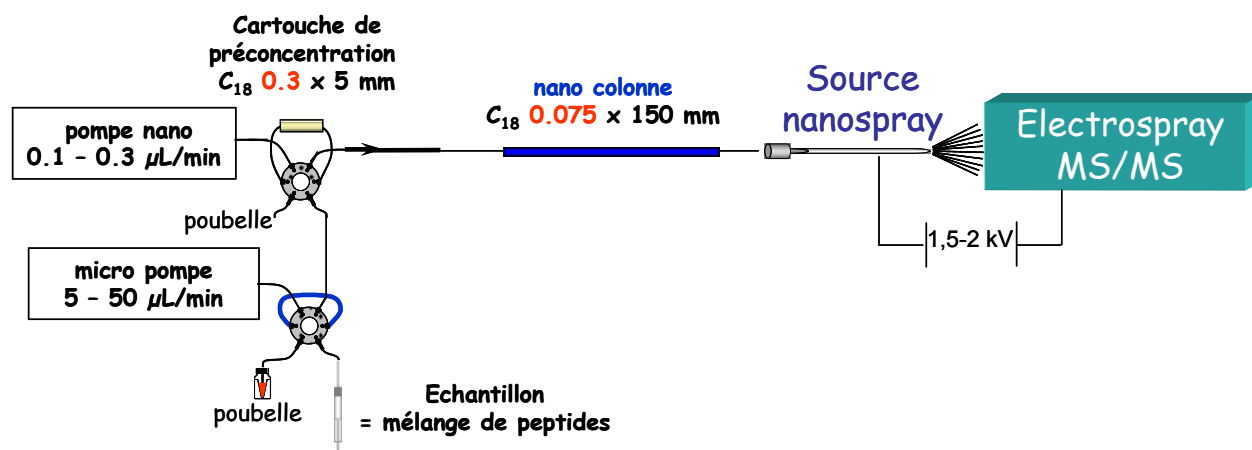


Figure 19 : Dispositif instrumental pour séparation en nanoHPLC avec préconcentration en ligne avant analyse ESI-MS/MS.

3.4. Approches d'identification des protéines

L'ensemble des stratégies de recherche disponibles actuellement pour l'identification automatique des protéines avec des données de spectrométrie de masse en tandem a été compilé récemment par Hernandez *et al* (224).

3.4.1. Les banques de données

Tous les types de banques de séquences peuvent théoriquement être utilisés, des banques de séquences protéiques mais aussi des banques d'ESTs (Expressed Sequence Tag) et des banques génomiques (225, 226). Les analyses protéomiques utilisent majoritairement les banques protéiques. Les banques protéiques les plus utilisées sont les banques de séquences « corrigées » pour lesquelles un travail de nettoyage, de tri, de documentation et d'annotation a été réalisé par des experts. Ces banques sont nombreuses, les plus connues sont la banque Entrez Protein du National Center for Biotechnology information, NCBI et les banques du consortium UniProt. La banque Entrez Protein est volumineuse et redondante mais elle présente l'avantage d'être relativement complète. Elle est accessible sur le site du NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi>. Le consortium UniProt centralise les banques SwissProt, TrEMBL et PIR-P (227-230). Ces banques sont accessibles sur le site <http://www.expasy.uniprot.org/>. La banque PIR-PSD (Protein Information Resource Protein Sequence Database) est organisée selon une classification par familles et super-familles de protéines. Cette banque contient des annotations fonctionnelles, structurales, bibliographiques (liens vers PubMed, ...) et génétiques (<http://pir.georgetown.edu/>). La banque Swiss-Prot, également appelée UniProtKB/Swiss-Prot est la banque de séquences protéiques la moins redondante et la mieux annotée. Un soin particulier est apporté pour indiquer la nature, expérimentale ou bioinformatique, des informations fonctionnelles, ainsi que le niveau de confiance qui est accordé à ces informations (231). Le 21 août 2007, la banque UniProtKB/Swiss-Prot contenait 277883 entrées (<http://us.expasy.org/sprot/relnotes/relstat.html>). La banque TrEMBL (Translation from EMBL) ou UniProtKB/TrEMBL contient les séquences annotées *in silico* d'après la traduction de l'ensemble des séquences codantes des banques nucléotidiques GenBank/EMBL/DDBJ hormis celles déjà présentes dans Swiss-Prot (232) (<http://www.ebi.ac.uk/trembl/>). Le 21 août 2007, la banque UniProtKB/TrEMBL contenait 4754787 séquences (http://www.ebi.ac.uk/swissprot/sptr_stats/index.html). Pour certains organismes modèles, les banques protéiques sont vérifiées et annotées par des experts comme la banque SwissProt. Par contre, lorsqu'il s'agit d'identifier des protéines d'organismes autres que la petite poignée d'organismes modèles, la qualité des protéomes présents dans la banque est très variable selon les organismes. Il est donc important de consulter les informations relatives aux différentes banques de données avant de les utiliser pour en connaître notamment le nombre d'entrées concernant l'organisme étudié, la façon dont ces entrées

L'identification des protéines va se faire en fonction du nombre de masses peptidiques qui correspondent à la protéine, du pourcentage de recouvrement de la séquence protéique (ou plus précisément le nombre de peptides identifiés), de la comparaison entre le pI et le poids moléculaire théorique de la protéine identifiée à sa position sur le gel lors d'analyses de spots de gel 2D et enfin la précision de mesure des différentes masses peptidiques (239, 240). Ces critères de validité sont inclus dans les directives de publication de bonnes données de protéomique (241). Une protéine est identifiée par empreinte peptidique massique lorsque le pourcentage de recouvrement dépasse 30% (ou 7 peptides) avec une précision en masse meilleure que 50 ppm.

La dénomination **Peptide Fragmentation Fingerprinting** a été introduite par Blueggel *et al* en 2004 par analogie avec la dénomination PMF (242). Cette approche va identifier les protéines par comparaison des spectres MS/MS expérimentaux et des spectres MS/MS générés à partir de l'ensemble des peptides tryptiques issus de la digestion *in silico* des protéines contenues dans les banques de données. Toute une série d'algorithmes sont utilisés pour effectuer cette comparaison, comme l'algorithme de **Mascot** (224, 238). L'algorithme de **Mascot** compare la liste de masses expérimentales des fragments obtenus aux listes de masses des fragments MS/MS calculées à partir des peptides présents dans la banque de données.

L'identification des protéines par cette stratégie peut toutefois échouer en raison de nombreuses limitations :

- Les **échantillons trop complexes** vont donner lieu à des superpositions d'empreintes peptidiques difficiles à interpréter et qui vont rendre les identifications rapidement impossibles (243).

- Les **protéines de faible poids moléculaire** ou faiblement abondantes vont générer après digestion un nombre de peptides peut être insuffisant à une identification de qualité des protéines.

- La **précision des mesures de masse** doit être très élevée pour limiter les identifications de faux positifs.

- Avec la croissance exponentielle de la **taille des banques de données**, la **spécificité du PMF** est de plus en plus **limitée**, les identifications par empreinte peptidique massique de plus en plus difficiles à valider, et l'identification de faux positifs de plus en plus probable (244). En effet, plusieurs compositions en acides aminés peuvent avoir des masses égales et si on ne dispose que de la masse du peptide, rien ne permettra de valider l'une ou l'autre des séquences. En augmentant le nombre de séquences dans les banques, le nombre de masses théoriques augmente et donc également le nombre de masses redondantes.

Une solution à ces limites est l'utilisation d'instruments à très haute résolution du type MALDI-FT ICR MS générant des mesures de masse très précises ($\approx 1-2$ ppm) et permettant ainsi d'améliorer considérablement la qualité et la spécificité des identifications par PMF (204). Néanmoins, les instruments de type FT-ICR n'étant pas très répandus dans les laboratoires de protéomique, dans bien des cas, le

recours à la spécificité apportée par les informations de séquence obtenues par des analyses MS/MS est nécessaire (245).

Dans le cas où le **génom**e de l'organisme étudié n'est pas séquencé, les différentes protéines ne seront pas disponibles dans les banques de données. Dans ce cas, le recours à la spectrométrie de masse en tandem s'impose afin d'obtenir des informations sur la séquence en acides aminés des peptides.

3.4.3. L'approche Peptide Sequence Tag

L'approche «*Peptide Sequence Tag*» repose sur le fait que les spectres MS/MS contiennent toujours au moins un fragment de séquence du peptide, aussi appelé « tag » (246). En plus de ce tag, cette approche utilise également les masses m_1 et m_2 définies comme les distances entre le tag de séquence déterminé et les extrémités du peptide. A partir de ces 3 informations, fragment de séquence et les masses m_1 et m_2 , l'identification de la protéine va être déterminée par recherche dans les banques de données. En 1994, un Peptide Sequence Tag de 2-3 acides aminés était suffisant pour identifier un peptide unique dans SwissProt mais en **2004**, on estime qu'une séquence de moins de **7 acides aminés** n'est plus suffisante pour identifier un peptide unique (245). Ces stratégies ne sont adaptées que pour l'identification de **protéines présentes dans les banques de données**. Une stratégie alternative utilisant le séquençage *de novo* des peptides fragmentés en MS/MS est utilisée pour l'interprétation des données provenant d'organismes non séquencés.

3.4.4. Les approches par séquençage *de novo*

Dans les cas où l'on étudie des protéines issues d'organismes non séquencés et que les différentes protéines ne se trouvent pas dans les différentes banques protéiques, l'approche par séquençage *de novo* s'avère indispensable. Cette approche consiste à reconstituer la séquence en acides aminés d'un peptide à partir de son spectre de fragmentation issu de l'analyse par spectrométrie de masse en tandem. Très souvent réalisé « à la main » sur la base des règles de fragmentation des peptides ou assisté par un logiciel adapté, le séquençage *de novo* nécessite des spectres MS/MS de très bonne qualité. A partir de chaque spectre MS/MS, une séquence en acides aminés sera déduite, partielle ou complète, et pourra servir à des recherches dans les banques de données par homologie de séquence et non plus par homologie de masse. Des logiciels de recherche par alignement de séquence sont utilisés et disponibles sur le serveur du site NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

4 : Analyse des protéines sélénées par électrophorèse sur gel

L'utilisation de techniques résolutive comme l'électrophorèse sur gel pour l'étude de protéines contenant du sélénium est récente. Ces protéines contiennent du sélénium incorporé par liaison covalente et peuvent donc être séparées par des électrophorèses classiques de type 1D SDS-PAGE ou gel 2D SDS-PAGE présentées plus haut. Ce paragraphe présente l'état de l'art des sélénoprotéines séparées par électrophorèse sur gel et caractérisées par les méthodes de spectrométrie de masse moléculaires.

4.1. Caractérisation des protéines sélénées sur gel par spectrométries de masse MALDI et ESI

Les techniques MALDI MS ou ESI-MS sont utilisées pour la recherche de sélénopeptides dans les digestats enzymatiques de sélénoprotéines séparées sur gel. Cette stratégie est limitée par l'étape d'extraction des peptides sélénés du gel qui présente des rendements aléatoires selon les protéines digérées et les solvants d'extraction utilisés, mais aussi par le fait que le sélénium est sensible à l'oxydation et peut être perdu par la protéine sous forme d'acide séléinique. Une étape de stabilisation du sélénium sur la protéine est généralement nécessaire pour éviter cette perte. Dans ce but, des procédures de carboxyméthylation de la sélénocystéine ont été proposées (247, 248) mais cet agent de dérivation peut réagir avec d'autres acides aminés (sélénométhionines, méthionines, cystéine...). Le seul travail issu d'une telle approche est celui de Qiu *et al* (249). Leurs travaux ont concerné l'identification de cibles protéiques d'un analgésique. Après administration de l'analgésique marqué radioactivement à une souris, les auteurs ont effectué un extrait protéique suivi d'un gel 2D et d'une autoradiographie des cibles de l'analgésique. Ces protéines cibles ont ensuite été digérées dans le gel et les digestats extraits et analysés en MALDI TOF MS. L'une de ces protéines présente dans son spectre MALDI MS un peptide avec un profil isotopique caractéristique du sélénium. Une analyse PSD de ce peptide a permis, malgré la mauvaise qualité du spectre MS/MS (Figure 21), de montrer la présence d'une sélénocystéine dans la séquence du peptide. L'identité de la protéine, sélénoprotéine glutathion peroxydase, a été retrouvée par empreinte peptidique classique et soumission des masses obtenues aux banques de données, comme classiquement effectué en protéomique. Cet exemple constitue le seul exemple de sélénoprotéines identifiées par spectrométrie de masse à partir d'un gel d'électrophorèse.

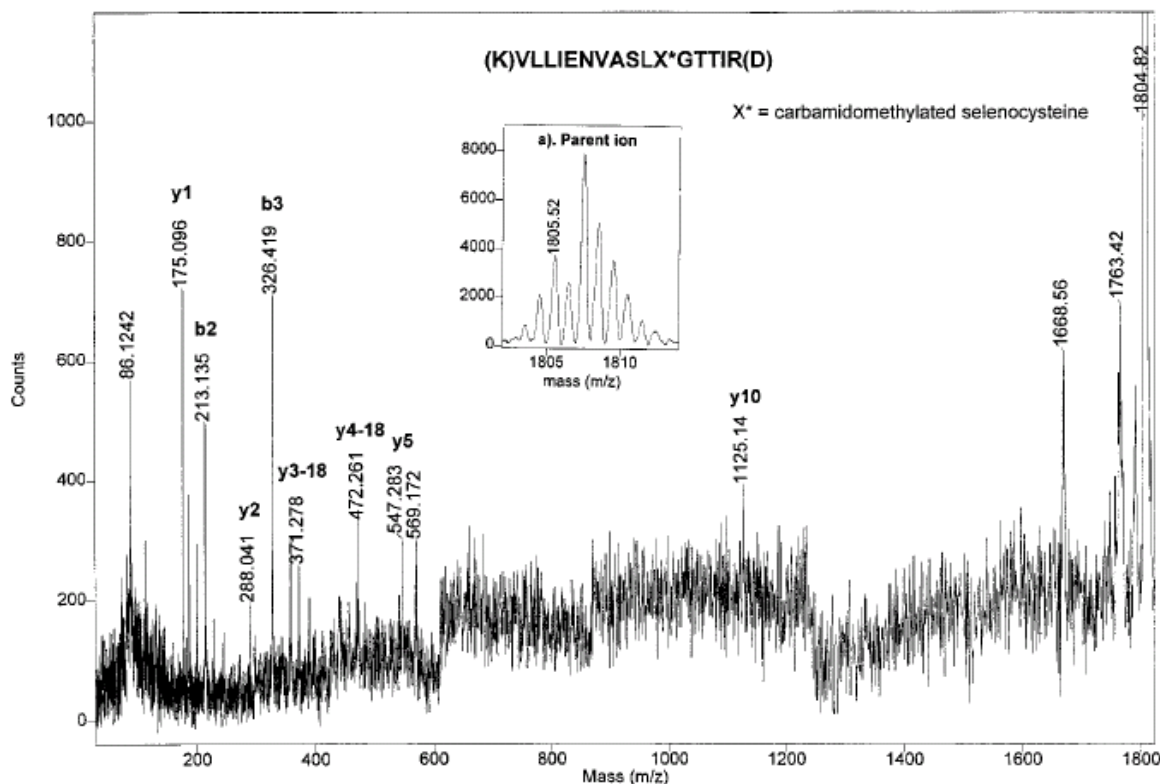


Figure 21 : Spectre PSD du sélénopéptide de la glutathion peroxydase.

L'encart au centre du spectre correspond au profil isotopique de l'ion parent (249).

Les analyses réalisées par MALDI TOF MS et en nanoESI-MS/MS sur des sélénoprotéines (PHGPx, sélénoprotéine P, thioredoxine réductase ...) purifiées et digérées en solution montrent pourtant la faisabilité et l'utilité de ces techniques pour l'identification des sélénoprotéines (125, 250). Ma *et al* ont étudié la stabilité *in vitro* des résidus sélénocystéyls de la sélénoprotéine P et de la glutathion peroxydase en MALDI MS et nanoESI-MS/MS. Sans protection de la sélénocystéine par carboxyméthylation, les sélénopéptides de Selp et de la GPx s'oxydent et perdent le sélénium protéique avec conversion de la sélénocystéine en déhydroalanine (248). Grâce à une approche similaire, Fu *et al.* ont apporté la preuve expérimentale de l'existence de sélénoprotéine chez les plantes. Ils ont en effet mis en évidence une sélénoprotéine homologue à la glutathion peroxydase, appelée CrGPx, chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Après clonage, et purification de CrGPx, la digestion *in solution* de CrGPx suivie de l'analyse des peptides protéolytiques en MALDI Qq TOF MS a confirmé la présence d'une sélénocystéine à la position prédite. Les analyses MALDI TOF MS et LC ESI-MS/MS ont également été utilisées pour déterminer, dans le cadre de 2 études, la présence de ponts Se-S entre sélénocystéines et cystéines et leur position dans la séquence de la sélénoprotéine P.

L'identification de sélénoprotéines après électrophorèse sur gel par spectrométrie de masse est difficile sans détection au préalable des sélénoprotéines dans le gel. Le chapitre suivant présente les techniques employées pour cibler spécifiquement ces protéines avant leur identification.

4.2. Détection de protéines sélénées dans des gels d'électrophorèse

Les méthodes traditionnelles pour la détection des protéines dans les gels impliquent l'utilisation de colorants. Cette technique ne renseigne bien évidemment pas sur le contenu en sélénium des protéines séparées. Des méthodes de détection spécifique du sélénium avec des limites de détection extrêmement basses sont nécessaires pour rechercher les sélénoprotéines dans un gel d'électrophorèse (251). Les sélénoprotéines sont en effet peu abondantes dans les organismes ce qui se reflète sur le gel par un faible pourcentage de sélénoprotéines. Ce chapitre est consacré aux différentes méthodes analytiques visant à détecter des protéines contenant du sélénium dans un gel après électrophorèse.

4.2.1. Détection sur gel après marquage des protéines au traceur isotopique ^{75}Se

L'une des méthodes des plus sensibles et spécifiques est l'utilisation d'un traceur isotopique suivi d'une autoradiographie des protéines séparées sur gel. Le radiotracer ^{75}Se est un radioélément bien adapté aux expériences de traçage en raison de son temps de demi-vie de 120 jours et de son émission de rayons gamma dans une gamme d'énergie de 121 à 400 keV. Il est administré *in vitro* ou *in vivo* pour son incorporation dans les protéines sélénées ou sélénoprotéines. Après séparation en électrophorèse sur gel, la distribution du traceur peut être détectée et quantifiée par autoradiographie avec l'obtention d'un autoradiogramme, image de la distribution de la radioactivité présente dans un gel suite à l'exposition d'un écran thermoluminescent ou d'un film photographique au gel. L'utilisation d'un compteur à scintillation peut être également envisagée mais elle nécessite de découper le gel en fins morceaux et de remettre en solution les protéines marquées radioactivement. Bien que ces méthodes ne soient ni applicables aux échantillons humains (252), ni aux études environnementales (251), les travaux de Chen, Behne, et Chery montrent le potentiel de cette technique spécifique et sensible avec une excellente limite de détection sous le femtogramme (253-255). Ainsi, Behne *et al* ont détecté plus de 20 sélénoprotéines ou sous-unités protéiques dans différents tissus de rat alors que Chen a mis en évidence pour la première fois la présence de sélénoprotéine P dans le plasma et le foie de rat (254-256). Chery *et al* ont étudié l'incorporation du ^{75}Se dans les protéines de levure par autoradiographie d'un gel bi-dimensionnel (257). Plus récemment, Bukalis *et al* (258) ont mis en évidence une trentaine de protéines sélénées dans les cellules de poumons et de trachée humaines par cette méthode. Enfin, Qu *et al* ont administré du ^{75}Se à des rats et ont mis en évidence 8 protéines contenant du sélénium sur gel par comptage à scintillations (259).

L'avantage de cette méthode est sa haute sensibilité de détection, plus élevée que celle obtenue en autoradiographie, et ce au détriment de la bonne résolution du gel. Malgré le potentiel de cette technique, les inconvénients dus au risque de contamination, aux problèmes posés par le traitement des déchets radioactifs et l'utilisation d'équipement nucléaire empêche une utilisation plus large de ces techniques. Ces analyses ne peuvent être pratiquées que dans un laboratoire dûment accrédité avec du personnel compétent et du matériel pour la radioprotection. Ainsi, malgré les limites de détection basses, d'autres méthodes de détection de sélénoprotéines ont dû être envisagées pour répondre aux limitations inhérentes à l'utilisation de radioisotopes.

4.2.2. Détection élémentaire « off-line » (après découpage des gels)

Les techniques de détection présentées dans ce paragraphe nécessitent de découper le gel suivant la visualisation des protéines par coloration pour effectuer l'analyse. Ces procédures sont relativement longues et les étapes de préparation de l'échantillon (découpage, digestion) peuvent compromettre l'analyse du point de vue résolution ou contamination. Les principes de ces techniques et les rares applications pour la détection de protéines contenant du sélénium sont présentés ci-dessous.

4.2.2.1. Analyses par activation neutronique

Cette technique d'analyse par activation neutronique (« neutron activation analysis » en anglais, ou N.A.A.) est une méthode directe de marquage radioactif des protéines. Après séparation des protéines en électrophorèse sur gel, les morceaux de gel contenant des protéines (visualisation par coloration) sont découpés et irradiés par un flux de neutrons dans un réacteur nucléaire. L'irradiation va créer des radioisotopes à partir du sélénium présent dans l'échantillon, soit le ^{77m}Se à courte vie ($T_{1/2} = 17,5\text{s}$) ou le ^{75}Se à longue vie ($T_{1/2} = 120$ jours) suivant les conditions d'irradiation (260). Les radioisotopes sont ensuite détectés par mesures des radiations γ émises avec des détecteurs spécifiques NaI (TI) et Ge (LI). La détection par comptage des scintillations peut également être utilisées pour des échantillons remis en solution. Généralement, les limites de détection en N.A.A. sont de 5 ng pour le ^{77m}Se et de 0,1 ng pour le ^{75}Se . Peng *et al* ont rapporté une limite de détection de 0,02 ng Se grâce à un long temps d'irradiation (8,3 jours) avec une flux neutronique intense et un long temps de comptage de la radioactivité émise (261). Le problème de cette technique est le bruit de fond important qui résulte de l'activation de toutes les impuretés de la matrice du gel lors du bombardement neutronique. Cette technique est également difficile à mettre en place en raison du lourd investissement et de l'infrastructure (réacteur nucléaire) requis. La littérature présente quelques applications de cette technique (262, 263). En 1994, Stone *et al* l'ont utilisé pour la détection du sélénium contenu dans la glutathion peroxydase après SDS-PAGE avec une limite de

détection estimée à 0,08 ng (252). En 1996, Hammel *et al* ont détecté par cette technique des protéines sélénées de moins de 20 kDa dans les racines de la plante accumulatrice en sélénium *Lecythis ollaria* (264).

4.2.2.2. Détection par spectrométrie atomique

La spectrométrie atomique rassemble des techniques de détection sensibles et spécifiques des éléments. Certaines de ces techniques ont été utilisées pour la détection spécifique des sélénoprotéines sur gel. Les principales techniques de spectrométrie atomique utilisées incluent la spectrométrie de fluorescence atomique AFS, et l'ICP-MS (265) et sont présentées dans le chapitre suivant.

4.2.2.2.1 Spectrométrie de fluorescence atomique avec introduction par génération d'hydrures (HG-AFS)

La génération d'hydrures couplée à la spectrométrie de fluorescence atomique (HG)-AFS est une technique d'analyse efficace pour les éléments hydrurables comme le sélénium. Le sélénium sous forme de Se^{IV} est en effet hydrurable en H_2Se avec un rendement proche de 100%. Cette réaction est réalisée en milieu acide en présence d'un réducteur, le plus souvent du borohydrure de sodium NaBH_4 . Cette réaction présente l'avantage d'éliminer une partie de la matrice puisque les éléments non hydrurables dans ces conditions ne sont pas transportés vers le détecteur. Chen *et al* ont utilisé cette technique pour la détection de sélénoprotéines dans des échantillons de foie humain (266). Après migration des protéines sur SDS-PAGE, le gel est découpé en morceaux qui sont digérés avec un mélange de $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (3 :1) à 100°C. Le Se (VI) est réduit en Se (IV) par 5M HCl avant réaction avec NaBH_4 et détection de l' H_2Se formé. La limite de détection a été estimée à 0.05 ng de Se. 24 protéines contenant du sélénium ont ainsi été détectées dans cette étude. Bien que des protéines sélénées à 61, 54 et 21 kDa aient été avancées comme les sélénoprotéines P, thioredoxine réductase et glutathion peroxydase, aucune des 24 protéines détectées n'a été formellement identifiée dans cette étude.

4.2.2.2.2 Spectrométrie de masse ICP à vaporisation électrothermique (ETV-ICP-MS)

La spectrométrie de masse ICP à vaporisation électrothermique (ETV-ICP-MS) est une méthode de détection élémentaire qui associe un système d'introduction efficace et un détecteur sensible et spécifique. Cette méthode ne nécessite pas la destruction de morceaux de gel par digestion car le cœur du système d'introduction est un four où une rampe de température progressive assure un balayage thermique de l'échantillon. L'analyte évaporé est transporté dans un flux d'argon jusqu'à l'ICP-MS sans la matrice. La principale étape d'optimisation de cette méthode est le programme en température du four. Si la

température de vaporisation de l'analyte est trop proche de la température de pyrolyse, une partie de l'analyte peut être perdue. Le palladium est souvent utilisé pour modifier les propriétés thermiques de l'analyte et ainsi permettre une évaporation de l'analyte séparée de celle de la matrice. Une limitation plus contraignante est le manque de précision de ces méthodes (typiquement, RSD 5 à 20%). Quelques applications ont été rapportées avec la technique similaire ET AAS (267) mais l'AAS est une technique d'analyse des métaux aujourd'hui moins performante que l'ICP-MS dotée d'une meilleure limite de détection. La spectrométrie de masse ICP à vaporisation électrothermique (ETV-ICP-MS) a été optimisée par Chéry *et al* pour l'analyse quantitative de sélénium dans les bandes de glutathion peroxydase après SDS-PAGE (268, 269). Les avantages des deux techniques sont combinés : une séparation hautement résolutive avec le SDS-PAGE, et une détection sensible et spécifique du sélénium en ICP-MS (266). Après la séparation, les bandes de protéines sont prélevées du gel et amenées une par une dans le four de la vaporisation électrothermique (ETV) pour détection en ICP-MS. Après reconstitution du profil sélénié, un électrophérogramme est obtenu (Figure 22). Les limites de détection rapportées dans cet exemple sont de 50 pg Se par morceau de gel ou 50 ng Se.mL⁻¹ dans la solution originale.

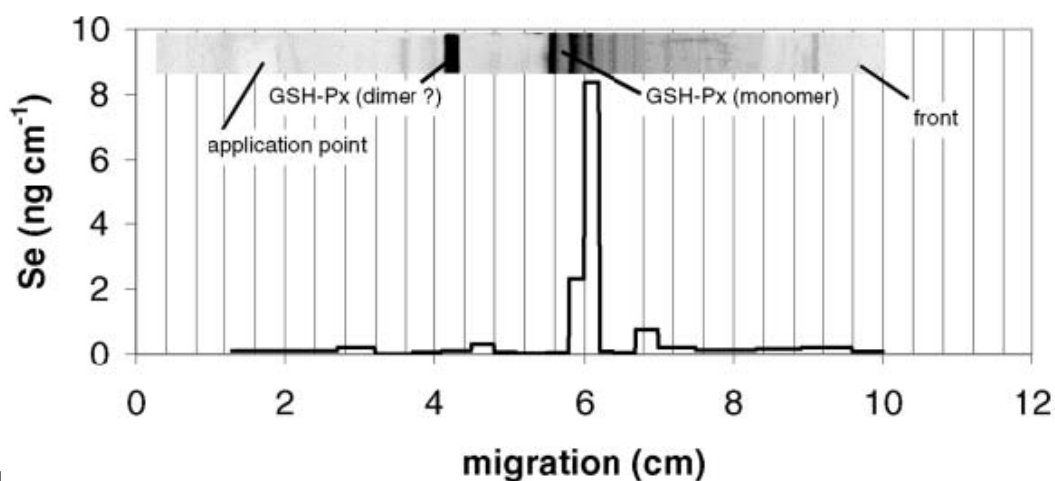


Figure 22 : Électrophérogramme ⁸²Se de la GPx (257).

Chassaigne *et al* ont appliqué la technique pour la détection de protéines séléniées dans un matériau de référence, la levure séléniée (270). De la même façon, des électrophérogrammes du sélénium ont été reconstruits à partir de l'analyse des gels en ETV ICP-MS. Cette technique est difficilement applicable à un fractionnement obtenu après 2D SDS-PAGE. Des milliers de spots sont présents sur un gel et l'analyse serait alors trop longue. Compte tenu du volume appliqué sur le gel (10 µl) et si le sélénium est réparti sur plusieurs protéines, la LOD rapportée ici est insuffisante pour l'analyse des sélénoprotéines par exemple

dans le sérum humain où la concentration en Se est estimée à 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Dans ce cas, d'autres techniques de détection plus sensibles sont à envisager.

4.2.3. Détection *in situ* par spectrométrie de rayons X : XRF, PIXE μSRXRF et EXAFS

Ce paragraphe présente brièvement le principe de ces techniques et leurs rares applications dans la détection de sélénoprotéines sur gel. Les techniques spectrométriques XRF, PIXE et μSRXRF sont comparables quant à la nature des événements détectés, à savoir des rayons X émis suite à un réarrangement des électrons excités, ou fluorescence X. Elles diffèrent par la nature de l'excitation, photons X en spectrométrie de fluorescence X conventionnelle (X-ray fluorescence ou XRF), particules chargées accélérées par microsonde nucléaire en émission de rayonnement X induit par des particules chargées accélérées (Particle induced X-ray Emission ou PIXE), rayonnement synchrotron en microscopie de fluorescence X induite par rayonnement synchrotron (synchrotron radiation X-ray fluorescence ou μSRXRF). Alors que la XRF a connu peu de succès en raison de son manque de sensibilité (Stone *et al*), la technique PIXE est plus intéressante en raison de sa meilleure sensibilité (ordre du $\mu\text{g/g}$) et de sa résolution spatiale (échelle du mm) (271). Le haut flux de rayons X en μSRXRF permet une sensibilité accrue et des résolutions sub-micrométriques. Le couplage SDS-PAGE- PIXE est cité par Behne *et al* (272) puis par Avoscan pour tracer le profil de répartition du sélénium dans les bandes protéiques de la bactérie *Cupriavidus metallidurans* CH34 (273). Weseloh *et al* ont appliqué le couplage SDS-PAGE- μSRXRF pour la détection de sélénoprotéines dans des extraits de testicules de rat (274). Un seul pic a été détecté en raison d'une sensibilité insuffisante pour mettre en évidence les 8 sélénoprotéines détectées par autoradiographie à partir du même échantillon. Ces analyses sont difficilement applicables pour les analyses de routine en raison de la lourde infrastructure nécessaire et leur sensibilité encore trop faible (274).

L'EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) est une technique de spectroscopie d'absorption des rayons X (SAX) au seuil K du sélénium. Cette technique consiste à mesurer les variations du coefficient d'absorption des rayons X dans un domaine d'énergie de quelques centaines d'électronvolts, au-delà du seuil d'ionisation d'un élément chimique. L'EXAFS apporte des informations sur les atomes entourant l'atome central de sélénium (nature et nombre d'atomes voisins, distances interatomiques) différenciant ainsi les acides aminés séléniés sélénométhionine et sélénocystéine incorporés dans des protéines (275). L'EXAFS a été proposé pour la distribution spatiale des formes chimiques du sélénium dans une plante hyperaccumulatrice *Astragalus bisulcatus* (276). A ce jour, et à notre connaissance, il n'y a pas encore eu d'études EXAFS effectuées sur des sélénoprotéines sur gels.

4.2.4. Détection élémentaire on-line : technique d'ablation laser ICP-MS

Le spectromètre de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS pour inductively coupled plasma mass spectrometry) couplé à l'ablation laser (LA) s'est largement développée depuis ces premières utilisations au début des années 1980 (277) jusqu'à devenir aujourd'hui un outil de choix pour l'analyse des éléments traces dans les échantillons solides. Cette technique permet à priori d'analyser une large gamme d'échantillons solides avec peu de préparation de l'échantillon ce qui se traduit par un gain de temps et une diminution de la contamination par manipulation. La résolution spatiale de quelques μm , les interférences et les taux d'oxydes réduits en raison de l'introduction d'un échantillon sec dans l'ICP, sont d'autres avantages de l'ablation à laser comparé aux autres systèmes d'introduction. La détection en spectrométrie de masse à source d'ionisation par plasma induit (ICP-MS) est multiélémentaire (jusqu'à 60 éléments suivis lors d'une même analyse), isotopique, sélective, sensible, précise (écart type relatif généralement inférieur à 5%) avec une gamme linéaire étendue (jusqu'à 9 ordres de grandeur) (278). De nos jours, l'ablation laser ICP-MS est devenu plus abordable en terme de coûts d'achat et de fonctionnement ce qui en fait une technique de plus en plus utilisée dans les laboratoires pour l'analyse isotopique et élémentaire. Son utilisation actuelle en fait une technique très prisée dans plusieurs domaines d'applications aussi variés que la géologie, l'archéologie, les sciences des matériaux, l'environnement, et la médecine (279). Les caractéristiques, avantages et applications de l'ablation laser ICP-MS sont exposés dans plusieurs articles de revues scientifiques récents (279-283) et résumés dans les paragraphes suivants.

4.2.4.1 Principe de l'ablation laser ICP-MS (LA-ICP-MS)

Le montage de base de LA-ICP-MS n'a pas significativement changé ces dernières années (Figure 23). L'échantillon est placé dans une cellule d'ablation étanche montée sur une plateau mobile dans les trois dimensions de l'espace ce qui autorise des mouvements de microanalyses 2D, en profondeur ou à la surface du solide. La taille du faisceau laser est réglée avec le système optique en fonction de la quantité de matière à ablater. Un microscope muni d'une caméra permet de régler précisément la zone de tir (à quelques μm). Le rayon laser, envoyé sous forme d'impulsions, est focalisé à la surface de l'échantillon par un système optique conduisant à l'explosion du solide. L'aérosol formé est transporté par un flux de gaz d'argon ou d'hélium vers le plasma à couplage inductif confiné dans la torche à plasma reliée par une simple connexion à la chambre d'ablation. A ce niveau, l'aérosol est vaporisé, atomisé et ionisé. Les ions sont transférés du plasma à pression atmosphérique vers l'analyseur sous vide poussé via une interface constituée de deux cônes. La séparation suivant le rapport masse sur charge (m/z) est alors effectuée dans l'analyseur de masse généralement constitué d'un quadripôle. Les ions ayant le rapport m/z sélectionné sont ensuite comptés par un multiplicateur d'électrons qui convertit les ions en signal.

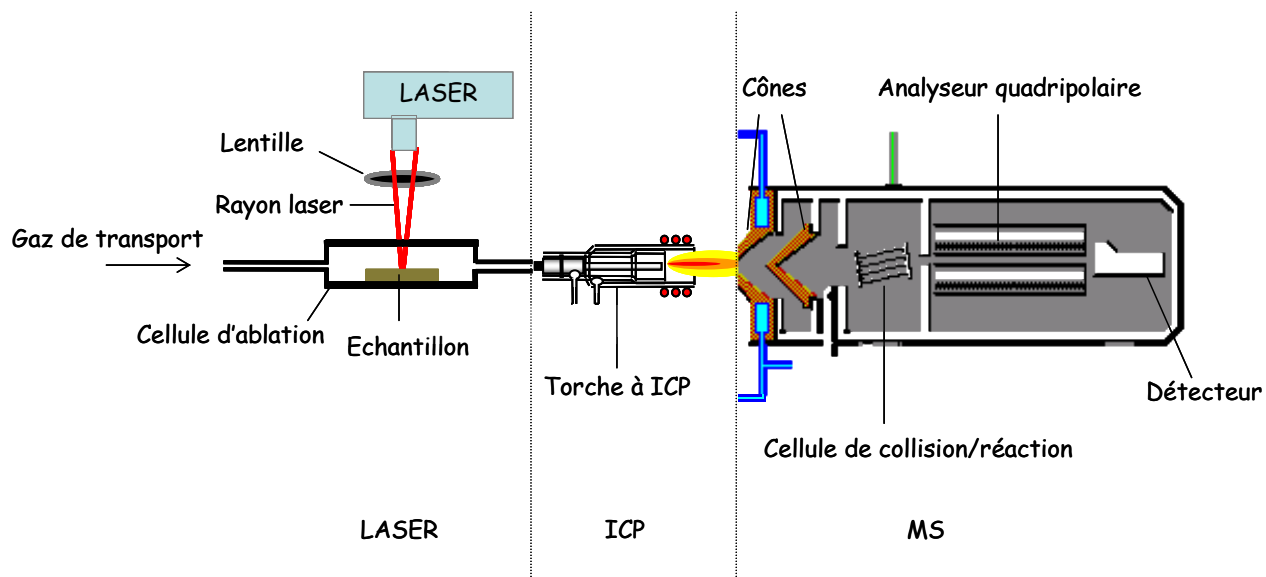


Figure 23 : Principe de l'analyse d'ablation laser ICP-MS

4.2.4.2 Processus d'ablation laser et choix du laser

Le laser, acronyme anglais de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, est un générateur d'ondes électromagnétiques, du proche infrarouge aux rayons X, fonctionnant sur le principe de l'émission stimulée d'un rayonnement monochromatique qui permet d'obtenir un faisceau cohérent de très grande puissance et très peu divergent. Le laser est ici utilisé comme un système d'introduction d'échantillon solide dans l'ICP-MS. Il existe d'autres systèmes d'introduction d'échantillon solide comme la vaporisation électrothermique (cf. chapitre 4.2.2.2.2.). Tous visent à fournir au plasma un échantillon sous forme de gouttelettes ou particules très fines quelle que soit la forme physique de départ de l'échantillon. L'utilisation du laser pour l'analyse chimique a longtemps été freinée en raison des coûts élevés d'achat, de fonctionnement et d'entretien. Toutefois, les progrès technologiques tant au niveau de l'informatisation que de l'automatisation, les prix de plus en plus abordables et la mise au point de nouveaux types de lasers, tels que les diodes laser, ont permis l'essor de cette technique. De nos jours, différents types de lasers opérant à des longueurs d'onde couvrant la gamme de 157 nm à 10600 nm sont utilisés pour l'ablation laser (Tableau 9). Tous ces lasers ont des durées d'impulsions de quelques dizaines à quelques centaines de nanosecondes. Les plus communément utilisés sont les lasers Nd: YAG, acronyme anglais de *neodymium-doped yttrium aluminium garnet* ou grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme. Ces lasers solides sont robustes, fiables, relativement bon marché et nécessitent peu de maintenance. Les lasers émettant dans l'infrarouge (IR) ou le visible (VIS) ont été peu à peu remplacés par des systèmes d'ablation émettant dans l'ultraviolet. Des sources laser délivrant des impulsions de quelques nanosecondes, à des longueurs d'onde de 266 nm, 213 nm, voire 193 nm ont ainsi été commercialisées. L'utilisation de

longueurs d'ondes plus courtes a résulté en une amélioration de l'interaction rayonnement matière, avec des aérosols plus fins et plus efficacement transportés à l'ICP ainsi qu'un fractionnement élémentaire réduit (volatilisation sélective de certains éléments) (284-293). Les lasers à excimère dans la région UV peuvent également être utilisés pour l'ablation laser. Ces lasers, surtout utilisés en médecine, lithographies ou micro-usinage, nécessitent un remplissage périodique de gaz afin de conserver leur énergie maximale.

Tableau 9 : Principaux lasers utilisés pour le couplage avec l'ICP-MS.

Longueur d'onde (nm)	Milieu actif du laser	Energie maximale (mJ)
10600	Gaz CO ₂	2000
1064	Solide Nd : YAG	2000
694	Solide Ruby	1000
532	Solide Nd : YAG	300
355	Solide Nd : YAG	200
308	Gaz XeCl	200
266	Solide Nd : YAG	100
248	Gaz KrF	200
213	Solide Nd : YAG	30
193	Solide Nd : YAG	1,7
193	Gaz ArF	200
157	Gaz F ₂	60

L'ablation laser désigne l'ensemble des processus se déroulant lors de l'interaction du rayon laser avec la matière. Une partie de l'énergie incidente est réfléchié tandis que l'autre est absorbée par le solide et convertie en chaleur, provoquant l'échauffement de la surface du solide. Si l'énergie n'est pas dissipée, la fusion et l'évaporation du matériau ont lieu. Dans le cas d'une densité d'énergie suffisamment importante (au dessus de 10^9 W/cm²) et d'une impulsion laser suffisamment courte par rapport au temps de réponse caractéristique du matériau, une sublimation de la surface a lieu provoquant l'explosion du matériau et l'éjection de particules solides par fragmentation. Les électrons libres présents dans la vapeur interagissent avec le rayon laser, ionise la vapeur et en entrent en collision avec les atomes conduisant à la formation d'un micro plasma au dessus de la surface du solide. Ce micro plasma peut interagir avec le matériau et créer une fusion et vaporisation supplémentaires (294). Une meilleure compréhension du processus d'ablation laser a mis en évidence que la durée de l'impulsion laser joue un rôle majeur dans les caractéristiques de l'aérosol formé (stoechiométrie et taille des particules) (295-299). La plupart des lasers utilisés sont des lasers à impulsions nanosecondes (Tableau 9). Récemment, des durées d'impulsions plus courtes de l'ordre de la picoseconde voire de la femtoseconde se sont avérées plus efficaces pour

l'ablation d'échantillons métalliques. Ainsi, différentes applications en ablation laser –ICP-MS utilisant des lasers femtosecondes ont été rapportées (285, 296, 300, 301). L'utilisation de sources à impulsions femtosecondes a montré des signes encourageants pour palier aux problèmes d'effets de matrice et pour s'affranchir du fractionnement élémentaire (285, 295, 300). Les lasers femtosecondes (fs) se distinguent par des impulsions ultracourtes, bien inférieures au temps de diffusion des électrons et au temps de transfert de l'énergie vers le réseau d'atomes (10 ps) (301). La matière est donc éjectée avant qu'il n'y ait diffusion de chaleur hors du volume irradié. De plus, la température du plasma formé à la surface de l'échantillon (295) est fortement réduite (on parle alors d'ablation « froide ») ce qui a pour conséquence de diminuer les dommages causés au matériau en périphérie de la zone d'ablation (298) (fusion et rupture du matériau). Ce phénomène est en outre accompagné de la formation de particules de faible dimension (296, 298). Ceci contraste avec les processus de fusion rencontrés en ablation laser nanoseconde (ns) suite à un échauffement de la matière. Une autre caractéristique remarquable des impulsions laser femtosecondes est que par nature, elles ne peuvent interagir avec le plasma qui se forme à la surface de l'échantillon, quelques nanosecondes après l'impact laser (300). La matière se déplace en effet trop lentement pour être éjectée durant l'impulsion laser femtoseconde. Toute l'énergie délivrée est ainsi utilisée pour l'ablation du matériau. Ceci n'est évidemment pas le cas avec des impulsions nanosecondes, puisque le plasma apparaît alors que l'impulsion laser n'est pas terminée : le plasma forme alors un « écran » absorbant une partie de l'énergie et pouvant être source de fractionnement. Les lasers femtosecondes présentent généralement une faible énergie de quelques mJ par impulsion. La diminution de la durée de l'impulsion permet en revanche de fournir des fluences (densité d'énergie par unité de temps) plus grandes pour les lasers femtosecondes (fs) que les lasers nanosecondes (ns) ce qui est crucial lors de l'analyse d'échantillons solides. Russo *et al.* ont récemment montré que l'utilisation d'impulsions femtosecondes permet d'augmenter les performances du couplage ablation laser / ICP-MS en terme de rapport signal sur bruit, de résolution spatiale et de fractionnement élémentaire (295).

Une appareil laser femtoseconde spécifiquement conçue pour le couplage ablation laser / ICP-MS a récemment été développée (Alfamet, Novalase S.A., France) en collaboration avec notre laboratoire. Cet appareil représente à notre connaissance le premier système d'ablation laser femtoseconde intégré, conçu pour l'analyse des éléments traces dans les solides. La particularité de cette machine est d'intégrer une source laser femtoseconde compacte basse énergie (100 μ J par pulse) et haute cadence de tirs (< 10 kHz). Ceci la distingue significativement des autres sources laser utilisées jusqu'à présent pour le couplage ablation laser/ ICP-MS qui, dans leur très grande majorité, délivrent des impulsions nanosecondes à haute énergie (quelques mJ par pulse) avec une faible cadence de tir (< 100 Hz pour certaines et plus généralement <20 Hz). L'utilisation de cette source laser infrarouge femtoseconde à haute cadence de tir et basse énergie, combinée à un dispositif optique permettant le balayage ultra rapide du faisceau a permis

à Pécheyrans *et al* (302) d'améliorer la qualité d'ablation par rapport à un système d'ablation nanoseconde (8 ns, 266 nm) sur un étalon NIST 612. Stabilité du signal de l'ordre de 3 %, limites de détections améliorées d'un facteur 10 à 40 suivant les éléments et fractionnement proche de l'incertitude analytique sont les principaux résultats obtenus.

4.2.4.3 Plasma à couplage induit (ICP)

Le plasma est un gaz, de l'argon généralement, inerte et ionisé, composé d'électrons et d'ions formant un ensemble électriquement neutre. Il est produit sous pression atmosphérique à l'intérieur d'une torche à plasma à l'aide d'une bobine d'induction (plasma couplé inductivement ou ICP). Une étincelle provoquée dans l'arrivée d'argon de la torche entraîne l'ionisation initiale des atomes d'argon tandis qu'un champ radiofréquence (rf) (de 27 ou 40 MHz) permet de maintenir l'ionisation de l'argon. La température au centre du plasma est typiquement de l'ordre de 8000 K. Les torches à plasma utilisées de nos jours sont très similaires à celles de type Scott-Fassel introduites en 1974. Le corps de la torche est un tube en quartz avec deux arrivées de gaz : le gaz plasmagène ($\sim 15 \text{ L.min}^{-1}$, Ar), qui supporte le plasma et qui l'isole thermiquement de la torche, et le gaz auxiliaire ($\sim 1 \text{ L.min}^{-1}$, Ar), qui limite la diffusion du plasma (Figure 24). Le gaz dans le canal central (ou injecteur), encore appelé gaz de nébulisation transporte l'aérosol ($\sim 1 \text{ L.min}^{-1}$, Ar) et est gainé par le gaz auxiliaire pour une pénétration de l'échantillon au cœur du plasma. L'échantillon est tout d'abord désolvaté (si c'est une solution), vaporisé, puis atomisé et partiellement ionisé (si le potentiel d'ionisation des éléments présents est inférieur à 15,76 eV, potentiel d'ionisation de l'argon). Le temps court de résidence de l'aérosol dans l'ICP impose une taille de gouttes et de particules petites, en dessous de 150 nm, pour une complète conversion de l'aérosol en ions (303).

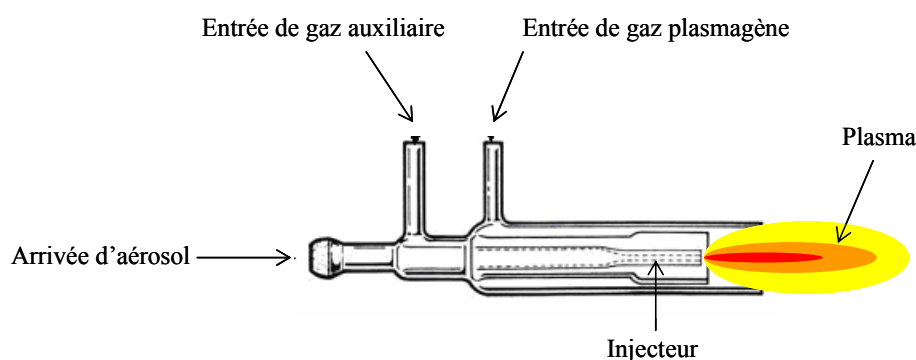


Figure 24 : Représentation schématique de la torche de l'ICP

4.2.4.4 Le spectromètre de masse

Les ions générés dans le plasma sont introduits dans le spectromètre de masse par l'intermédiaire d'une interface. Le rôle de cette interface est de transférer les ions formés dans le plasma à 8000 K et à pression atmosphérique vers le spectromètre de masse à température ambiante à une pression de 10^{-7} mbar compatible à son fonctionnement. L'interface est composée de 2 cônes, échantillonneur et écorceur, percés pour récupérer les ions formés dans le canal central du plasma et d'une optique ionique pour éliminer les photons pouvant parasiter le détecteur, refocaliser et optimiser la trajectoire des ions à leur entrée dans l'analyseur de masses (Figure 25). Le faisceau d'ions arrive dans l'analyseur où un vide plus poussé $<0,1$ Pa, obtenu par une pompe turbomoléculaire, permet une séparation des ions selon leur rapport masse sur charge (m/z).

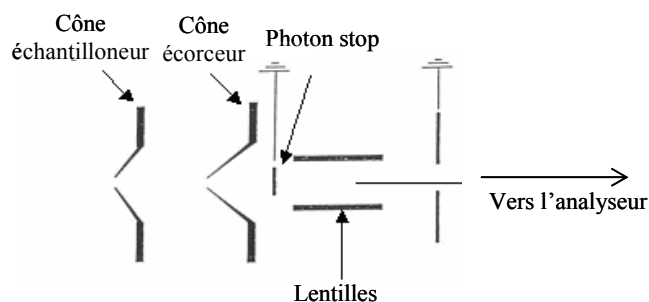


Figure 25 : Interface entre ICP et spectromètre de masse

Plusieurs analyseurs de masses peuvent être couplés à l'ICP. Les plus utilisés sont : le quadrupole à cellule de collision (277, 304), le temps de vol (TOF) (305-307) et le spectromètre de masse combinant secteur magnétique et électrique (308). Des couplages entre ICP et spectromètre de masse à piégeage d'ions (309) ou FT ICR MS (310) ont également été décrits.

Le quadrupole est l'analyseur de masse le plus fréquemment utilisé. Il est constitué de 4 barreaux métalliques parallèles autour de la trajectoire des ions, les barres opposées étant soumises au même potentiel composé à la fois d'une tension continue et d'une tension alternative. Chaque paire de barreaux diamétralement opposés est portée à un potentiel électrique de signe opposé à l'autre paire. L'application de différents couples de tensions permet de trier les ions selon leur rapport masse sur charge (m/z) aussi appelé masse nominale. Ainsi, pour un couple donné de tension, seuls les ions de rapport m/z adéquat traversent le filtre quadripolaire. Les autres ions n'ont pas de trajectoire stable et finissent par rentrer en collision avec les barres. L'ensemble des ions à analyser, de rapports m/z différents, sont donc triés et mesurés séquentiellement en quelques millisecondes, par variation de la tension appliquée. L'inconvénient majeur du quadrupole est sa résolution en masse insuffisante (de 0,3 à 0,8 unité de masse atomique) pour résoudre des interférences polyatomiques se produisant sur certaines masses. L'addition d'une cellule de

collision /réaction (CC/R) permet toutefois de résoudre certaines de ces interférences comme dans le cas du sélénium. Les interférences polyatomiques de dimères $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ et $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ (issues du plasma d'argon) empêchent de suivre les isotopes les plus abondants, ^{78}Se et ^{80}Se . Ces ions mono ou poly-atomiques interférant sont transformés en espèces n'interférant plus. La cellule de collision/réaction est un multipôle fermé, placé à la sortie du cône écorceur et avant le filtre de masse (Figure 26). Selon son type et les interférences à résoudre elle est pressurisée avec un gaz de collision (He, Xe) ou un gaz de réaction (NH_3 , H_2 , CH_4 , etc.). Les ICP-MS X7 CCT THERMO® Electron et 7500 c Agilent® que nous utilisons sont équipés d'une cellule de collision/réaction qui peut être activée ou désactivée selon le type d'analyse à réaliser.

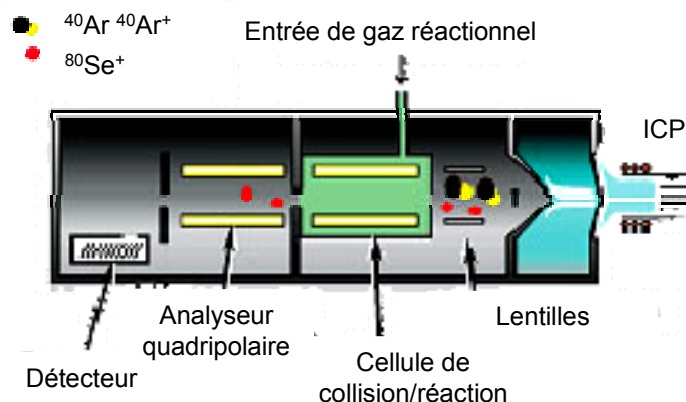


Figure 26 : Schéma illustrant le principe de la cellule de collision / réaction

Les spectromètres de masse combinant secteur magnétique et secteur électrique sont les seuls moyens pour séparer les interférences spectrales des analytes d'intérêts. La revue de Jakubowski *et al.* (1998) est consacrée à ces analyseurs (308). La résolution de ces appareils est bien meilleure et autorise ainsi la séparation d'ions de m/z proche. Les ions peuvent être recueillis de manière séquentielle sur un multiplicateur d'électron (ICP-MS haute résolution ou ICP-HR-MS) ou de manière simultanée sur des coupes de faraday et des multiplicateurs d'électrons (ICP-MS multicollecteur). Les limites de détection sont environ dix fois plus faibles que celles obtenues avec un quadripôle. Le coût de ces instruments et le niveau de compétence requis ont toutefois limité leur développement.

Le détecteur est le dernier chaînon de l'ICP-MS. Il permet de transformer le flux d'ions recueillis à la sortie du filtre de masses en signal électrique qui sera amplifié et traité par une interface informatique. Les détecteurs les plus couramment utilisés sont la cage de Faraday et le multiplicateur d'électrons (channeltron ou à dynodes discrètes). La cage de Faraday est une électrode métallique placée dans le faisceau d'ions. Le courant mesuré est proportionnel au nombre d'ions et à leur charge. La mesure d'un

courant nécessite cependant beaucoup d'ions ($\sim 10^7$). Par conséquent, le collecteur de Faraday est utilisé pour les fortes intensités. Pour de plus faibles intensités, des multiplicateurs d'électrons secondaires sont utilisés pour amplifier le courant. Ce détecteur peut toutefois fonctionner sous 2 modes. Il est possible de compter les impulsions électriques générées par un simple impact d'ions (mode pulsé) ou de mesurer un courant après amplification (mode analogique). La gamme linéaire dynamique du détecteur se trouve ainsi augmentée (au moins 7 ordres de grandeur).

4.2.4.5 Applications de l'ablation laser ICP-MS

L'ablation laser ICP-MS a été introduite pour la détection des éléments traces dans les protéines séparées par électrophorèse sur gel avec les travaux de Nielsen *et al.* (311). Le balayage des gels d'électrophorèse 1D sur leur longueur avec un laser UV permet l'acquisition d'un électrophérogramme qui fait correspondre la quantité d'un élément donné en fonction de sa position dans le gel. Deux stratégies d'ablation ont ensuite été proposées pour l'analyse de protéines sur gel : l'ablation translationnelle d'une piste d'un gel 1D sur sa longueur ou l'ablation individuelle d'un spot (*single-hole drilling* en anglais) après la séparation par gel 2D (257). Une dizaine d'applications de cette technique ont été rapportées dans la littérature pour différents éléments (phosphore, cuivre, zinc, sélénium...) dont certaines concernent la détection du sélénium dans les protéines (251, 257, 312). Dans ce cas, un laser ArF nanoseconde ou similaire a été utilisé. Les limites de détection rapportées sont variables selon le type d'échantillon, le mode de séparation par électrophorèse, le mode d'ablation, l'élément considéré et le dispositif d'analyse en spectrométrie de masse. Les limites de détection concernant le Se lié de façon covalente aux protéines séparées par SDS-PAGE ou électrophorèse bi-dimensionnelle ont été établies par Chéry *et al.* La limite de détection en utilisant la cellule de collision/réaction et en utilisant de l'hélium comme gaz de transport a été évaluée à $70 \text{ ng Se g}^{-1} \text{ gel}$ pour l'ablation sur un spot (applicable à la 2D-SDS-PAGE) et à $150 \text{ ng Se g}^{-1} \text{ gel}$ pour l'ablation avec translation (applicable à la 1D-SDS-PAGE). Cette technique a été appliquée à la détection de sélénoprotéines dans des extraits de globules rouges après une séparation monodimensionnelle (1D-SDS-PAGE) et la détection de protéines sélénées de levure après séparation bidimensionnelle (2D-SDS-PAGE) (257).

4.3. Identification des protéines sélénées en cap/nano HPLC ESI-MS/MS assisté par ICP-MS

4.3.1. L'intérêt de la détection en parallèle par l'ICP-MS et l'ESI-MS/MS.

L'application des approches protéomiques classiques pour l'identification de sélénoprotéines échouent généralement. Des problèmes d'extraction du gel et de suppression de l'ionisation vont empêcher le succès de cette approche. Sur un gel d'électrophorèse, les sélénoprotéines, qui ne représentent qu'un faible pourcentage des milliers de protéines présentes, vont être accompagnées par leur homologue non sélénié ou par d'autres protéines responsables de la coloration de la bande ou du spot analysé. Par conséquent, à moins que la sélénoprotéine ne soit suffisamment enrichie et purifiée, l'ionisation du seul peptide sélénié issu de la digestion tryptique de la sélénoprotéine va être supprimée par les peptides élués de façon concomitante provenant des protéines plus abondantes dans la bande ou le spot. Sa recherche dans le spectre de masse moléculaire grâce à la signature isotopique caractéristique du sélénium va donc se révéler infructueuse (313). Ainsi, il est nécessaire d'effectuer une détection ICP-MS spécifique du sélénium parallèle à l'ESI-MS. Cette détection va renseigner sur la présence, le nombre de peptides séléniés devant être identifiés en ESI-MS/MS, leurs temps de rétention, leurs concentrations, l'efficacité de la digestion tryptique et de l'extraction et le taux de recouvrement de la colonne chromatographique. Cette approche requiert que les temps de rétention soient conservés entre les deux injections. Les récents systèmes chromatographiques à faibles débits sont équipés de contrôleurs de débits assurant une reproductibilité des injections satisfaisantes pour utiliser cette approche.

4.3.2. HPLC ICP-MS à débits réduits

Le couplage de l'HPLC à l'ICP-MS nécessite une interface (aussi appelée système d'introduction de l'échantillon dans l'ICP-MS) dont le rôle est de transformer le liquide en sortie de colonne sous la forme d'un spray calibré de fines gouttelettes. Le principal problème de ce couplage réside dans l'incompatibilité des débits utilisés en HPLC à débits réduits, quelques $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (capHPLC) voire centaines de $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ (nanoHPLC) avec ceux de 0,5 à 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ utilisés par les systèmes classiques d'introduction de l'échantillon. De nouvelles interfaces ont été développées dans notre équipe de recherche ces dernières années pour autoriser ces couplages. Une première interface a été spécialement conçue pour le couplage de l'HPLC capillaire à l'ICP-MS par Schaumlöffel *et al* (314). Cette interface utilise un micronébuliseur (DS5) fonctionnant à des débits de 3 à 7 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. L'introduction totale de l'aérosol par le biais d'une chambre de nébulisation à simple passage, sans drain et à volume réduit, se traduit par des limites de détection absolues de seulement 150 fg pour le sélénium. Une nouvelle interface a ensuite été développée entre la nanoHPLC et l'ICP-MS par Giusti *et al* (315) (Figure 27). Cette nouvelle interface délivre de façon stable et sans débit d'appoint des débits de 50 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à quelques $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Elle utilise un nébuliseur (nDS-200) de type microconcentrique, c'est-à-dire avec introduction de l'effluent liquide au

centre du flux d'argon. Le nébuliseur permet une consommation totale de l'aérosol dans le sens où la totalité de l'aérosol est introduite dans le plasma après vaporisation dans une chambre de nébulisation à volume réduit (3 cm^3). L'aiguille de nébulisation avec un orifice de diamètre de $10 \text{ }\mu\text{m}$ est du même type que l'aiguille utilisée en nanospray. Cette interface a été utilisée pour les analyses effectuées en nanoHPLC ICP-MS dans ce travail de thèse. La Figure 28 représente le montage expérimental utilisé, lors de ces travaux de thèse, pour des couplages parallèles nanoHPLC ICP-MS et nanoHPLC ESI-MS/MS. Ce montage est constitué d'une nano-pompe HPLC capable de délivrer un gradient eau acétonitrile avec un débit stable de $300 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ utilisé pour la nano-colonne HPLC de phase inverse (C18 PepMap100, $75 \text{ }\mu\text{m}$ diamètre interne x 150 mm , $3 \text{ }\mu\text{m}$, 100 Angströms). L'échantillon est introduit par une vanne 6 voies en fermant un volume de $1 \text{ }\mu\text{L}$. Les analytes d'intérêt de l'échantillon sont ensuite préconcentrés sur une cartouche (C18 PepMap100, $300 \text{ }\mu\text{m}$ diamètre interne x 5 mm , $5 \text{ }\mu\text{m}$, 100 Angströms) à l'aide d'une pompe seringue. Le capillaire de sortie de la nano-colonne est alors connecté dans un premier temps au nanonébuliseur ICP-MS puis à l'aiguille nanospray ESI-MS/MS.

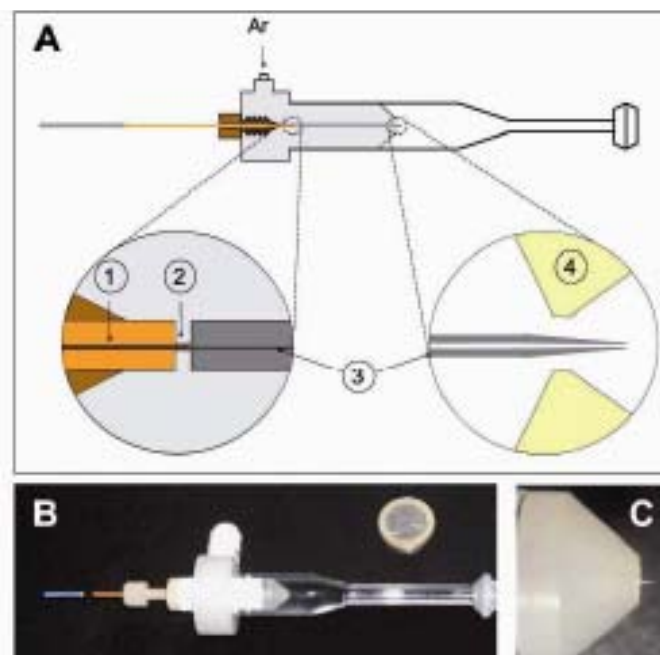


Figure 27 : Nébuliseur de nano-débits pour le couplage direct nanoHPLC ICP-MS

A : Vue schématique avec agrandissements. (1) Extrémité de sortie de la nano-colonne ; (2) Connexions sans volumes morts entre la nano-colonne et l'aiguille de nébulisation ; (3) Aiguille creuse en silice fondue ; (4) Orifice en saphir industriel. B : Photographie de l'interface complète (nanonébuliseur et chambre d'ablation). C : Photographie de l'orifice du nanonébuliseur.

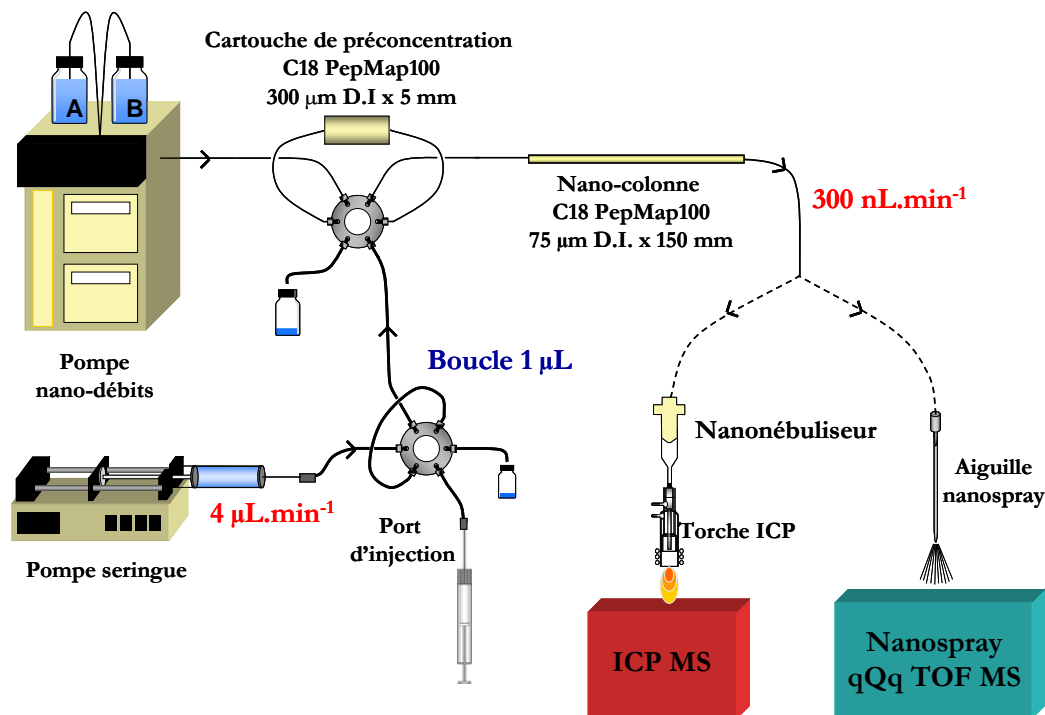


Figure 28 : Couplage nanoHPLC ICP-MS et ESI-MS avec cartouche de préconcentration.

La limite de détection estimée pour ce couplage est de 50 fg de sélénium. La recherche de massif isotopique typique du sélénium aux temps de rétention indiqués par l'analyse ICP-MS permet d'estimer la masse moléculaire du peptide sélénié. Son spectre MS/MS permet de retrouver sa séquence qui soumise aux banques de données appropriées permet l'identification de la sélénoprotéine. Dans les mêmes conditions de nanoHPLC, l'absence d'un massif isotopique dans le spectre obtenu en Q-TOF MS aux temps de rétention indiqués par l'ICP-MS, montre qu'une co-élution a empêché l'ionisation par électrospray du peptide sélénié et qu'une étape de préparation supplémentaire est nécessaire pour la résoudre ou bien que l'échantillon n'est pas suffisamment concentré.

Alors que les méthodes de détection sont en plein essor, les exemples de caractérisation restent marginaux. C'est dans ce contexte que les développements en (HPLC)-ICP-MS ont été effectués pour la détection spécifique de peptides séléniés à partir de bandes de gel 1D (travaux de cette thèse) ou de spots de gel 2D (316). Ces travaux représentent les seuls essais effectués à ce jour. L'approche de la double détection en spectrométrie de masse élémentaire et moléculaire pour l'identification de sélénoprotéines sur gel d'électrophorèse a également été entreprise dans ces travaux de thèse. Cette double approche a été récemment utilisée avec succès pour la caractérisation de protéines riches en sélénométhionine dans la levure et dans les noix du Brésil (313).

Conclusions de la partie bibliographique - Présentation du sujet de thèse

Les sélénoprotéines sont retrouvées dans les 3 domaines du vivant Eucarya (eucaryotes), Bacteria et Archae (procaryotes); toutefois, tous les organismes n'en produisent pas. Plus surprenant, ni les plantes supérieures, ni les levures ne sont capables de synthétiser des sélénoprotéines. Avant l'émergence des analyses bioinformatiques, les jeux de sélénoprotéines procaryotes et eucaryotes décrits étaient réduits et clairement distincts avec pour seule famille commune, celle de la sélénophosphate synthase. Les résultats apportés par la bioinformatique ont considérablement complétés ces sélénoprotéomes tout en démontrant que procaryotes et eucaryotes ont plusieurs sélénoprotéines en commun telles la glutathion peroxydase, ou les protéines de type SelW et desiodases. Les sélénoprotéines partagent peu de similitudes de séquences et leur grande diversité reflète leur implication dans des fonctions biologiques diverses qui n'ont pas encore pu être déterminées pour certaines d'entre elles. Les sélénoprotéines ne constituent pas une famille de protéines au sens strict du terme, puisqu'elles ne dérivent pas d'un ancêtre commun. Une meilleure compréhension de leur rôle physiologique passe par la vérification expérimentale de leur présence et par l'étude de la régulation de leur expression. L'analyse protéomique classique n'a pas pour vocation de cibler une classe de protéines particulières qui plus est minoritaire. Dans ce contexte, il apparaît nécessaire de développer des techniques complémentaires aux techniques existantes pour cibler de façon spécifique ces sélénoprotéines. La technique principalement utilisée dans ce but est l'autoradiographie de ⁷⁵Se qui souffre de tous les inconvénients inhérents à l'utilisation des isotopes radioactifs (274). Une alternative peut être l'excision des spots ou bandes, suivie de leur analyse par des techniques comme l'analyse par activation neutronique ou l'absorption atomique électrothermique au détriment de la résolution. Le PIXE et fluorescence X à rayonnement synchrotron sont des techniques d'analyse in situ semi-quantitatives qu'il faut aussi évoquer et qui permettent d'avoir accès à des quantités totales relatives en métaux. Dans la même optique, l'ablation laser suivie par la spectrométrie de masse à torche à plasma est une alternative séduisante plus sensible et robuste. Ainsi, un procédé d'ablation laser ICP-MS après séparation par électrophorèse sur gel a été mis au point pour la recherche spécifique et sensible de sélénoprotéines sur gel. Les mises au point ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans les 3 premiers chapitres de cette thèse. Une fois détectée, ces protéines peuvent être identifiées de façon également ciblée par l'utilisation parallèle des techniques nanoHPLC ICP-MS et nanoHPLC ESI-MS/MS. Le dernier chapitre de cette thèse illustre cette approche.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1 : Solutions et échantillons

1.1. Produits chimiques et enzymes

Les produits chimiques et solvants ont été achetés chez Sigma–Aldrich (St. Quentin- Fallavier, France), sauf exceptions précisées dans le texte. L'eau ultrapure ($18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) est fournie par un système Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). La trypsine porcine diméthylée de qualité certifiée pour les analyses protéomiques (proteomics grade) a été achetée chez Sigma–Aldrich (St. Quentin- Fallavier, France) et chez Promega (trypsin gold, mass spectrometry grade, Charbonnières-les-Bains, France).

1.2. Souches bactériennes et sélénoprotéines

La souche bactérienne *Escherichia coli* MG1655 et le plasmide pVU1CaM sont issus de la banque de souches bactériennes et de plasmides du laboratoire d'environnement et microbiologie UMR 5254, CNRS Pau, France. La souche bactérienne *Escherichia coli* MC4100 et le plasmide pFM20 nous ont été fournis par le Professeur August Böck (Université de Munich, Allemagne). La souche bactérienne *Desulfococcus multivorans* DSM2059 nous a été donnée par le Professeur Matthias Böll (Université de Leipzig, Allemagne). La sélénoprotéine thiorédoxine réductase de rat est un don du Dr Elias Arner (Karolinska Institute, Suède). La glutathion peroxydase a été achetée chez Sigma–Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France). Les gels effectués sur les extraits protéiques de la bactérie *Cupriavidus metallidurans* CH34 ont été effectués par le Docteur Laure Avoscan (CEA Saclay, France).

2 : Instrumentations

2.1. Chromatographies préparatives

Les cellules bactériennes ont été cassées par une presse de French (Thermo Spectronic, New York, USA). La calmoduline sélénée a été purifiée par une série de chromatographies préparatives FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) réalisées sur un système ÄKTA purifier 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède). La première étape de chromatographie d'interaction hydrophobe a été réalisée en utilisant 20 mL de résine Phenyl-Sepharose CL 4-B dans une colonne HR (16 mm x 10 cm). La seconde chromatographie d'interaction hydrophobe a été réalisée dans une colonne RESOURCE PHE (6.4 mm id x 3 cm) achetée chez Amersham Biosciences (Uppsala, Suède). Un DNA Speed Vac (Model DNA120, Thermo Quest, NY, USA) a été utilisé pour l'évaporation de solvant.

2.2. Électrophorèses sur gel

2.2.1. 1D SDS-PAGE

Les 1D SDS-PAGE ont été réalisées avec des systèmes d'électrophorèse Mini Protean 3 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) avec des gels de concentrations à 4% et des gels de séparation à 12.5% (8 x 7 x 0.75 cm).

2.2.2. 2D SDS-PAGE

La première dimension des 2D SDS-PAGE a été réalisée avec un système de focalisation isoélectrique (IEF) IPGphor (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Les bandelettes de gel Immobiline[®] à gradient de pH de 3 à 10 immobilisé et non linéaire ont été achetées chez Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). La seconde dimension a été réalisée avec le systèmes d'électrophorèse Mini Protean 3 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) avec des gels de séparation à 12.5% (8 x 7 x 0.75 cm).

2.3 Systèmes d'ablation laser

2.3.1. Laser ALFAMET

Un dispositif d'ablation laser (Alfamet, Novalase S.A., France), intégrant une source laser femtoseconde (S-Pulse, Amplitude Systèmes, France), un système de focalisation et de régulation de la puissance du faisceau laser ainsi qu'une chambre d'ablation a été utilisé. La source laser S-Pulse utilisée est un amplificateur laser femtoseconde à haute cadence de tirs. Le milieu actif est un cristal de KGW dopé Yb pompé par une diode laser. Il émet ainsi un faisceau directionnel et monochromatique de longueur d'onde de 1030 nm, avec une durée d'impulsion de 360 fs, une énergie fournie de 0,1 à 100 μ J par impulsion à la surface de l'échantillon. Cette source laser permet de travailler sur une gamme de fréquence de 1 à 10 000 Hz. La stabilité entre 2 impulsions a été évaluée à 0,5 %. La source laser présente l'avantage d'être intégrée dans une structure compacte et mobile permettant un couplage aisé avec un ICP-MS. La cellule d'ablation (4.5 cm de diamètre, 10 cm³ de volume) est montée sur une platine XYZ motorisée pour un déplacement précis de l'échantillon dans les trois directions de l'espace (résolution de 1 μ m). Un système de deux caméras macroscopique et microscopique ($\times 110$) permet de visionner avec précision la zone à impacter. La source laser étant de faible énergie, seule une taille de spot réduite (de l'ordre de 30 μ m) permet de maintenir une fluence (ou flux d'énergie) supérieure au seuil d'ablation pour les échantillons considérés. Un arrangement optique utilisant un balayage galvanométrique a été spécifiquement conçu pour cet instrument. Il permet de déplacer le faisceau laser extrêmement rapidement (jusqu'à 280 mm/s) horizontalement avec une très grande précision de repositionnement (1 μ m). Le logiciel autorise un

déplacement simultané du faisceau laser et de l'échantillon pour des trajectoires d'ablations de quelques micromètres carrés à quelques millimètres carrés dans l'échelle de temps de l'acquisition ICP-MS.

2.3.2. Laser Cetac LSX-100

Un laser nanoseconde de type Nd:YAG (LSX-100, Cetac Omaha, NE, USA) a été utilisé. Cet appareil délivre un faisceau laser d'une longueur d'onde de 266 nm et d'une durée d'impulsion de 8 ns. L'énergie maximale par impulsion est de 3 mJ et la fréquence maximale est de 20 Hz. La taille du faisceau laser focalisé à la surface de l'échantillon varie de 5 à 160 μm . Cet appareil comporte un système motorisé permettant le déplacement de l'échantillon dans les trois directions de l'espace. L'aérosol ablaté est introduit via un tube de 70 cm de long dans la torche de l'ICP-MS. Les principaux paramètres de ces systèmes d'ablation laser sont reportés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Caractéristiques des systèmes d'ablation laser utilisés.

	ALFAMET	CETAC LSX 100
Constructeur	Novalase (Pessac, France)	Cetac Technologies (NE, USA)
Milieu actif	Cristal KGW, Yb, pompé par diodes	Cristal Nd :YAG quadruplé
Longueur d'onde	1030 nm	266 nm
Durée d'impulsion	360 fs	8 ns
Ecart type relatif de l'énergie	0.5 %	5 %
Taille du spot	5 à 30 μm	5 à 160 μm
Maximum d'énergie par impulsion	100 μJ / impulsion	3 mJ / impulsion
Cadence de tirs	1 à 10 000 Hz	1 à 20 Hz
Forme du faisceau	Gaussien	Gaussien
Dimensions de l'appareil	130 \times 90 \times 180 cm	100 \times 70 \times 130 cm
Chambre d'ablation	Volume interne de 10 cm^3	Volume interne de 30 cm^3
Gaz vecteur	He	Ar ou He

2.4. Rugosimétrie

Un rugosimètre confocal (STIL, Aix en Provence, France) muni d'un spectromètre CH5150-N équipé d'un crayon optique de dynamique 1000 μm et fonctionnant avec un pas horizontal de 0.313 μm a été utilisé pour réaliser la mesure de profil des zones ablatées.

2.5. Spectrométries de masse à ionisation par couplage induit ICP-MS

Deux ICP-MS quadripolaires équipés d'une cellule de collision, le X7 series CCT (Thermo Electron, Winsford, UK) et le 7500 cs/ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japon) ont été utilisés respectivement pour des analyses d'ablation laser et pour des analyses de quantification par ajouts dosés, d'ablation laser, et des analyses après chromatographie liquide haute performance (HPLC, capHPLC et nanoHPLC).

2.6. Chromatographies analytiques

2.6.1. HPLC d'exclusion stérique

Les séparations en chromatographies d'exclusion stérique ont été réalisées en utilisant une pompe HPLC (Agilent Technologies, Série 1100, Waldbronn, Allemagne) fournissant un débit stable de $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Les colonnes Superdex Peptide HR 10/30 (10 mm x 300 mm x $13\mu\text{m}$) et Superdex 200 HR 10/30 (10 x 300 mm x $13\mu\text{m}$) ont été achetées chez Amersham Biosciences (Uppsala, Suède).

2.6.2. HPLC capillaire

Les séparations en HPLC capillaire ont été réalisées en utilisant une pompe HPLC capillaire (Ultimate, Dionex, Sunnyvale, USA). Une colonne HPLC capillaire de phase inverse de $300 \mu\text{m}$ de diamètre interne (C18 PepMap, $300 \mu\text{m}$ id x 15 cm, $3 \mu\text{m}$, LC Packings, Sunnyvale, USA) avec un débit de $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ a été utilisée. Les injections ont été faites avec une unité d'injection automatisée (Famos, Dionex, Sunnyvale, USA) permettant des injections d'échantillons reproductibles soit de 500 nL pour les expériences de capHPLC-ICP-MS ou de $1 \mu\text{L}$ pour les expériences de capHPLC-ESI-MS. Toutes les connexions de la pompe à l'unité d'injection et de l'unité d'injection à la colonne sont faites de capillaires en silice fondue de diamètre interne $50 \mu\text{m}$. Les connexions de la colonne au nébuliseur sont faites de capillaire en silice fondue ($75 \mu\text{m}$ id, $280 \mu\text{m}$ od, LC Packings, Sunnyvale, USA) pour éviter une dispersion de l'échantillon.

2.6.3. NanoHPLC

Les séparations en nanoHPLC ont été réalisées en utilisant une pompe nanoHPLC (Agilent, Technologies, Waldbronn, Allemagne) fournissant un débit stable de $300 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$. Les injections ont été faites avec une unité d'injection automatisée (Agilent, Technologies, Waldbronn, Allemagne). Une nanocolonne de phase inverse (C18 PepMap 100, $75 \mu\text{m}$ id x 15 cm, $3 \mu\text{m}$, LC Packings, Sunnyvale, USA) avec une étape de préconcentration sur cartouche de phase inverse (C18 PepMap 100, $300 \mu\text{m}$ x 5 mm, LC Packings, Sunnyvale, USA) a été employée.

2.7. Couplages des chromatographies analytiques à l'ICP-MS.

Les analyses en HPLC-ICP-MS, capHPLC-ICP-MS et nanoHPLC ICP-MS ont été faites avec un ICP-MS Agilent 7500ce (Yokogawa Analytical Systems, Tokyo, Japon) équipé d'une cellule de collision avec respectivement un nébuliseur concentrique, un micronébuliseur DS-5 (CETAC, Omaha, NE) et un nanonébuliseur nDS-200. Le micronébuliseur à consommation totale équipé d'une chambre de nébulisation de faible volume mort de l'ordre de 8 cm³ permet de délivrer des débits de l'ordre du $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Le nanonébuliseur équipé d'une chambre de nébulisation de faible volume mort de l'ordre de 3 cm³ permet de nébuliser de façon stable et continue des débits compris entre 50 et 450 nL.min⁻¹. Les différentes caractéristiques des systèmes chromatographiques utilisés sont décrites dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Chromatographies analytiques utilisées et leurs caractéristiques.

Pompes	Colonnes	Nébuliseur	Débit
HPLC (1100 series, Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne)	- Superdex Peptide HR 10/30 (10 mm x 300 mm x 13 μm) (Amersham Biosciences, Suède) - Superdex 200 HR 10/30 (10 x 300 mm x 13 μm) (Amersham Biosciences, Suède)	Concentrique (Meinhard Associates, California, USA) avec une chambre de nébulisation Scott à double passage	0,7 mL.min ⁻¹
HPLC capillaire (Ultimate, Dionex, Sunnyvale, CA)	Colonne capillaire de phase inverse (C ₁₈ PepMap, 300 μm x 15 cm, 3 μm , Dionex)	DS-5	5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
NanoHPLC (1100 series, Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne)	- Colonne de phase inverse (Agilent Zorbax 300SB-C18, 75 μm x 150mm, 3.5 μm) - Cartouche de préconcentration : colonne de phase inverse (C18 PepMap100, 300 μm x 5 μm , Dionex, Sunnyvale, CA)	nDS-200	300 nL.min ⁻¹ 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

2.8. Spectrométrie de masse à ionisation MALDI

Un MALDI-TOF MS Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Foster City, CA) a été utilisé en mode linéaire avec un délai d'extraction pour les mesures en masse de 3500 à 60000 Da et en mode réflectron avec un délai d'extraction pour les mesures en masse de 500 à 3500 Da.

2.9. Spectrométries de masse à ionisation électrospray

Les spectres de masse de la calmoduline sélénée ont été obtenus en utilisant un spectromètre de masse exclusivement quadripolaire à ionisation électrospray API 300 (Perkin-Elmer SCIEX, Thornhill, ON, Canada) avec une introduction de l'échantillon par une pompe munie d'une seringue de modèle 22 Harvard (Instech Laboratories, Inc., Winsum, Pays-Bas). Dans les autres analyses de protéines entières (thiorédoxine réductase, glutathione peroxydase), les spectres de masse ont été obtenus avec un spectromètre de masse hybride quadripôles et temps de vol Q-TOF (QSTAR XL, Applied Biosystems, Foster City, CA) équipé d'une source microionspray ou nanospray.

Les expériences en capHPLC et nanoHPLC couplées à l'ESI-MS/MS ont été réalisées en utilisant un spectromètre de masse en tandem Q-TOF (QSTAR XL, Applied Biosystems, Foster City, CA) équipés respectivement d'une source microionspray et d'une source nanoionspray (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le Q-TOF comporte une cellule de collision à haute pression accélérant linéairement les ions (LINAC) afin de les stocker et les envoyer sous forme de paquets d'ions vers le TOF. Ceci permet d'obtenir une sensibilité et une résolution plus élevée et améliore la précision en masse. Le logiciel Analyst QS a été utilisé pour le traitement des données.

3 : Procédures et conditions expérimentales

3.1. Préparation de l'étalon sélénié

3.1.1. Surexpression de la calmoduline séléniée

La souche *Escherichia coli* MG1655 pVU1- CaM a été cultivée toute une nuit à 37°C dans 100 mL de milieu LB (Luria – Broth) contenant 1 g de tryptone, 0,5 g d'extrait de levure et 10 mg d'ampicilline. Les cellules ont été centrifugées à 15000 rpm pendant 20 min. Le culot a été lavé avec du milieu M9 et resuspendu dans un volume du même milieu. La suspension cellulaire a été utilisée pour inoculer 2 L de milieu M9 additionné de glucose (0.2% w/v) et d'ampicilline (100 µg.mL⁻¹). Les cellules ont été cultivées à 37°C avec agitation à 100 rpm. Quand la culture atteint une densité optique à 600 nm de 0,5, l'expression de la calmoduline sélénométhionylée a été induite par 50 µg.mL⁻¹ d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) en présence de 1 mM de L-SeMet. L'expression de la calmoduline a été effectuée pendant 3H à 37°C. Les bactéries ont été récupérées par centrifugation à 15000 rpm pendant 20 min. Les culots cellulaires ont ensuite été stockés à -80°C.

3.1.2. Purification de la calmoduline séléniée

Les suspensions cellulaires et les extraits protéiques ont été conservés à 4°C durant l'entière procédure. Les protéines ont été détectées tout au long du processus de purification par mesure de leur absorbance à 280 nm. Une quantité de 5,5 g de cellules (conservées à -80°C) a été décongelée dans 16,5 mL de tampon d'extraction (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 200 µg.mL⁻¹ DNase). Les cellules ont été cassées par un passage au travers de la presse de French à 40000 psi. Le matériel insoluble a été enlevé par centrifugation à 15000 rpm pendant 30 min. à 4°C. 5 mM CaCl₂ ont été ajouté au surnageant, ici appelé extrait brut puis le tout a été incubé 10 min dans de la glace. L'extrait brut (15 mL) a été injecté sur une colonne Phenyl-Sepharose CL 4-B à 1 mL.min⁻¹ équilibrée avec du tampon A (25 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM CaCl₂, 1 mM DTT). La colonne a ensuite été lavée avec 40 mL de tampon A et 40 mL de tampon B (tampon A + 0,2 M KCl) pour enlever les protéines liées non spécifiquement. La calmoduline séléniée (SeMet-CaM) a été éluée par 100 mL de tampon C (25 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Par la suite, la colonne a été lavée avec 40 mL de tampon A. Les fractions contenant la SeMet-CaM ont ensuite été complétées avec 5 mM CaCl₂ et chargées sur une colonne RESOURCE PHE préalablement équilibrée avec 4 mL de tampon A puis 4 mL de tampon B. La SeMet-CaM a été éluée avec 5 mL de tampon C. Les fractions contenant de la SeMet-CaM ont été conservées à -80°C.

3.2. Préparation des milieux de culture en anoxie

3.2.1. Milieu de culture d'*Escherichia coli* pour l'expression de la formiate déhydrogénase

Le milieu LB (Luria – Broth) (10 g.L^{-1} de tryptone, 5 g.L^{-1} d'extrait de levure et 10 g.L^{-1} de NaCl) est préparé dans une fiole conique (Figure 29) puis stérilisé à l'autoclave pendant 21 minutes à 121°C sous une pression de 1 bar. Dès la sortie de l'autoclave, le milieu est refroidi sous gaz (mélange N_2/CO_2 dans un rapport 9/1 (v/v)) jusqu'à température ambiante. Les solutions suivantes sont alors ajoutées stérilement :

- $5 \mu\text{M}$ de Na_2SeO_3
- $2 \mu\text{M}$ de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0.8% (w/v) glucose
- 30 mg.L^{-1} chloramphénicol.

3.2.2. Milieu de culture de *Desulfococcus multivorans* DSM 2059 pour l'expression de sélénoprotéines

Un milieu liquide synthétique de composition suivante a été préparé : 0,25 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de NH_4Cl , 0,05 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,42 g de Na_2SO_4 , 10 g de NaCl, 0,6 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mL solution SL12 sans EDTA et 940 mL H_2O de qualité ultrapure. La solution d'oligo-éléments SL12B sans EDTA (317) contient pour 1 L d'eau distillée : 1,1 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 190 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 50 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 42 mg de ZnCl_2 , 24 mg de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 18 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 300 mg de H_3BO_3 , 2 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La solution est stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes, puis stockée à l'obscurité. Le milieu est préparé dans une fiole conique (Figure 29) puis stérilisé à l'autoclave pendant 21 minutes à 121°C sous une pression de 1 bar. Dès la sortie de l'autoclave, le milieu est refroidi sous gaz (mélange N_2/CO_2 dans un rapport 9/1 (v/v)) jusqu'à température ambiante. Les solutions suivantes sont alors ajoutées stérilement :

- Solution de NaHCO_3 : 2.5 g de NaHCO_3 dans 50 mL d'eau distillée, préparée dans un tube fermé hermétiquement par un bouchon en butyl sous atmosphère de N_2/CO_2 (9/1 v/v) et stérilisée à l'autoclave (20 min., 121°C).

- Solution de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$: 0.2 g ($800 \mu\text{M}$) de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ dans 10 mL d'eau distillée, préparée dans un tube fermé hermétiquement par un bouchon en butyl sous atmosphère d'argon ou d'azote et stérilisée à l'autoclave (20 min., 121°C).

- Solution de vitamine V7 stérilisée par filtration ($0.2 \mu\text{m}$) : 1 mL.
- 150 nM de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

- 20 nM de Na_2SeO_3
- Benzoate de sodium (10 mM) stérilisé par filtration (0.2 μm) ou lactate de sodium (30 mM) stérilisé par filtration (0.2 μm).

La solution de vitamines V7 contient pour 1 L d'eau distillée : 2 mg de biotine; 10 mg de *p*-aminobenzoate, 10 mg de thiamine; 5 mg de pantothénate; 50 mg de pyrodoxamine, 20 mg de vitamine B12 et 20 mg de nicotinate. La solution est stérilisée par filtration (membrane filtrante de porosité 0,2 μm) et stockée à l'obscurité.

Le milieu est ajusté à pH=7.3 à l'aide de solutions stériles de H_2SO_4 et/ou NaOH (1M). Le milieu est ensuite distribué dans des flacons de type pénicilline bouchés avec du coton et préalablement stérilisés au four Pasteur (170°C, 30 min.). Les flacons sont remplis aux deux tiers, fermés par des bouchons butyls, sertis avec une capsule en aluminium, puis gazés stérilement avec un mélange N_2/CO_2 (rapport 9/1 (v/v)) et stockés à l'obscurité. Un léger précipité noir de sulfure de fer doit apparaître dans les 24 heures suivant la préparation du milieu.

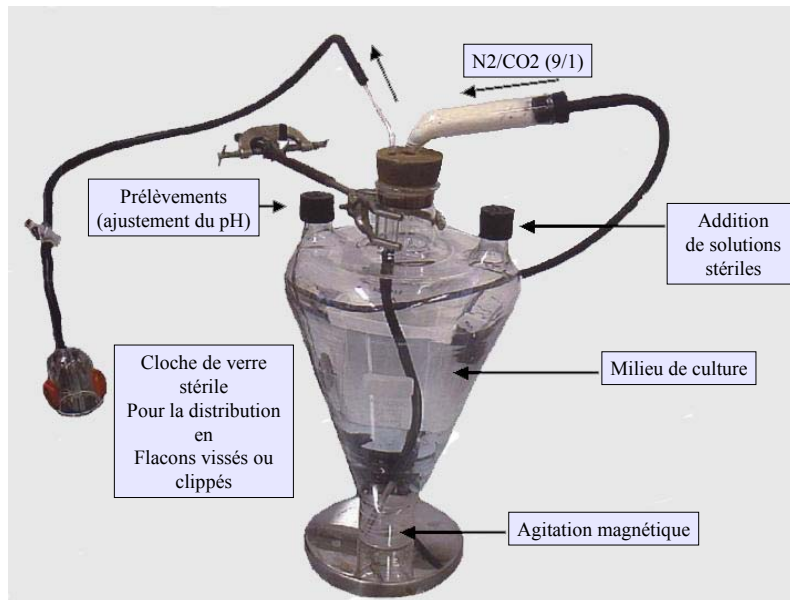


Figure 29 : Fiole conique utilisée pour la préparation et la distribution des milieux en anoxie.

3.3. Préparation des extraits protéiques bruts

3.3.1. Expression de la formiate déshydrogénase chez *Escherichia coli* et préparation des extraits cellulaires

Les cellules ont été cultivées à 37°C sans agitation dans le milieu de culture LB modifié et préparé comme précédemment décrit. Lorsque la culture a atteint une densité optique à 600 nm de 0,12 ; l'expression de la FDH a été induite par 30 mM de formiate de sodium. Après une incubation de 3 h, les cellules ont été collectées par centrifugation à 15 000 rpm pendant 20 min à 4 °C et resuspendues dans 2 mL de tampon d'extraction (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM DTT, 200 µL d'un cocktail d'inhibiteur de protéases. Les cellules ont ensuite été cassées par un passage au travers de la presse de French à 40000 psi. Le matériel insoluble a ensuite été enlevé par centrifugation à 15000 rpm pendant 30 min à 4°C. 30 µL de DNase I à 1 mg.mL⁻¹ et 30 µL de RNase A à 250 µg.mL⁻¹ dans 50 mM MgCl₂ ont été ajoutés au surnageant et incubé 10 min à 4°C. La concentration protéique dans le surnageant a été estimée à 14.6 mg.mL⁻¹ par la méthode de Bradford en utilisant l'essai Bio-Rad Protein[®].

3.3.2. Conditions de culture de *Desulfococcus multivorans* DSM 2059 pour l'expression de sélénoprotéines et préparation des extraits

D. multivorans a été fournie par le Pr Matthias Böll en croissance active dans un milieu de culture liquide avec du benzoate comme seule source de carbone et d'énergie. Cette culture a étéensemencée dans le milieu synthétique préparé dans les conditions décrites précédemment. La culture a été effectuée à 30°C, sans agitation et à l'obscurité. L'H₂S accumulé au cours de la croissance bactérienne a été expulsé par dégazage stérile quotidien avec un mélange N₂/CO₂ (un rapport 9/1 (v/v)). La croissance bactérienne a été contrôlée par mesure de la turbidité bactérienne à la DO₆₀₀ nm.

Durant toute la procédure, les suspensions cellulaires et les extraits protéiques ont été conservés à 4°C. Les extraits ont été effectués sur des cultures de 15 mL en phase exponentielle de croissance (DO₆₀₀ = 0.25). Après précipitation des protéines avec 5% (v/v) d'acide trichloroacétique (TCA), le culot protéique a été récupéré par 30 min de centrifugation à 10000 rpm. Ce culot a ensuite été lavé d'éventuelles impuretés deux fois avec 10% (v/v) de TCA et deux fois avec de l'acétone glacial avant d'être séché à l'air. Les protéines ont ensuite été analysées en 1D SDS-PAGE.

3.4. Préparation de la sélénoprotéine glutathione peroxydase

L'échantillon de 4,2 mg de solide avec une activité de 123 unités / mg de solide et 673 unités / mg de protéines a été resuspendu dans 1 mL de Tris (hydroxyméthyl) aminomethane hydrochloride à 50 mM contenant 1 mM de DTT (pH 7,5).

3.4.1. Stabilisation de la sélénoprotéine glutathion peroxydase par alkylation

Un aliquote de 0,5 mL de la solution de GPx a été incubée dans 1 mL d'urée à 5,4 M contenant 3 μ L de DTT à 0,125 M pendant 2 h. 12 μ L d'iodoacétamide ont été ajoutés et laissés 1,5 h à température ambiante pour la réaction d'alkylation (carboxyméthylation). L'iodoacétamide résiduel a été détruit par addition de 12 μ L de DTT et incubé pendant 40 min.

3.4.2. Digestion tryptique de la GPx alkylée en solution

Un aliquote de 500 μ L de GPx alkylée a été dilué 10 fois avec de l'eau dans le but de réduire la concentration d'urée à 0,6M. Un aliquote de 3 μ L d'une solution de trypsine à 1mg/mL a été ajouté dans le but d'obtenir un rapport trypsine sur protéine de 1/40 (w/w). La digestion a été effectuée sur la nuit à 37°C. La réaction a été stoppée par addition de 5 μ L d'acide acétique. Le volume d'échantillon a été réduit à 100 μ L en utilisant un système de séchage sous vide ("speed vac system"). Un aliquote de 30 μ L de l'échantillon a été injecté sur la colonne d'exclusion stérique couplée à un système de détection ICP-MS dans le but de vérifier le profil sélénié du digestat tryptique. Un aliquote de 70 μ L de l'échantillon a été injecté et la fraction séléniée correspondant aux peptides séléniés a été collecté, séché avec un système de séchage sous vide puis resolubilisé dans 10 μ L d'eau. Des aliquotes de 2 et 3 μ L ont été analysés par HPLC en phase inverse avec détections parallèles ICP-MS et ESI MS/MS.

3.5. Quantification du sélénium par ICP-MS

La concentration de sélénium dans les différents échantillons protéiques (thiorédoxine réductase, glutathione peroxydase, calmoduline séléniée, extraits protéiques bruts) a été déterminée par ICP-MS selon la méthode des ajouts dosés ou par étalonnage externe. Les ajouts ont été réalisés à partir d'une solution étalon de sélénium à 1000 g.L^{-1} (diluée si nécessaire) contenant 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Rh servant d'étalon interne. Cette solution étalon a été également utilisée pour réaliser une droite d'étalonnage sur une gamme de concentration de 0 à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Se.

3.6. Électrophorèses sur gel

3.6.1. 1D SDS-PAGE

Les 1D SDS-PAGE ont été réalisées selon le protocole décrit par Laemmli (175). Les protéines précipitées ont été dissoutes dans une solution contenant 50 mM de tampon Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA, 2% (w/v) SDS, 15% (v/v) glycérol, 0.01% (w/v) bleu de bromophénol et 5% (v/v) β - mercaptoéthanol, chauffées pendant 5 min à 95°C et chargées sur le gel. L'électrophorèse a été réalisée dans 25 mM de Tris contenant 3.5 mM SDS et 192 mM L-glycine à 180 V pendant 45 min. Après électrophorèse, le gel a été rincé avec de l'eau ultrapure (18,2 M Ω .cm⁻¹), coloré avec 0.25 g.L⁻¹ Coomassie Blue G-R250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, San Francisco, USA) dans 10 % (v/v) d'acide acétique dissous dans 25 % de méthanol et séché sous vide pendant 2 h sur un papier filtre. Une feuille de papier Saran a été déposée à la surface du gel pour le protéger des contaminations avant analyse. Les masses moléculaires apparentes des protéines ont été déterminées par une solution de marqueurs de poids moléculaires (Amersham Biosciences) contenant les six protéines suivantes : α -lactalbumin (14.4 kDa), inhibiteur de la trypsine (20.1 kDa), anhydrase carbonique (30.0 kDa), ovalbumine (45.0 kDa), albumine (66.0 kDa) et phosphorylase b (97.0 kDa).

3.6.2. 2D SDS-PAGE

1,34 μ g de calmoduline sélénée ont été solubilisés dans une solution contenant 8 M d'urée, 4% (w/v) de CHAPS (Amersham Biosciences), 60 mM de DTT (dithiothreitol, Amersham Biosciences), 2% (v/v) Pharmalyte[®] pH 3–10 (Amersham Biosciences) et 0.0002% (w/v) bleu de bromophénol. L'échantillon a ensuite été centrifugé 10 min à 15000 rpm pour enlever toutes particules ou protéines précipitées. La première dimension IEF a été effectuée avec une bandelette Immobiline[®] réhydratée avec 125 μ L de surnageant pendant 12 h à 20 °C. La focalisation isoélectrique des protéines a ensuite été réalisée par un gradient de tension de 500 V pendant 30 min, suivie par 1000 V pendant 30 min et d'un gradient linéaire jusqu'à 5000 V pendant 1 h 40 min. Avant d'effectuer la seconde dimension en électrophorèse, les bandelettes ont été équilibrées 15 min dans du tampon 1,5 M tris pH 8.8, 6 M d'urée, 2% (w/v) de SDS, 30% (w/v) de glycérol, 0.0002% (w/v) de bleu de bromophénol et 65 mM DTT. Les bandelettes sont ensuite placées sur un gel de polyacrylamide à 12,5 % et scellées par 1% (w/v) d'agarose préalablement liquéfiés par chauffage. L'électrophorèse a été réalisée dans 25 mM de Tris contenant 3.5 mM SDS et 192 mM L-glycine à 180 V pendant 55 min. Les mêmes marqueurs de taille moléculaire et la même procédure de détection des protéines au bleu de Coomassie qu'en 1D SDS-PAGE ont été utilisés.

3.7. Ablation laser ICP-MS

Les gels séchés ont été coupés en sections de 3,75 cm x 1 cm pour rentrer dans la cellule d'ablation. Le papier sur lequel repose le gel a été fixé sur une plaque en aluminium par un ruban adhésif double face. Cette opération empêche le gel de se recroqueviller sur lui-même, maintenant ainsi une surface horizontale parfaitement plane durant l'ablation laser. Les conditions d'ablation laser sont répertoriées dans le Tableau 12. Les lasers ont été couplés soit avec un ICP-MS X7 soit avec un ICP-MS 7500 cs. Les isotopes suivis en ICP-MS sont ^{52}Cr , ^{53}Cr , ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se , ^{82}Se , ^{124}Xe , et ^{126}Xe .

Tableau 12 : Conditions expérimentales d'ablation laser.

	ALFAMET	CETAC LSX 100
Vitesse de déplacement de l'échantillon en $\mu\text{m/s}$	50	60
Vitesse de déplacement latéral du faisceau en $\mu\text{m/s}$	100	0
Fréquence de tirs en Hz	10000	20
Fluence en J.cm^{-2}	13	14
Energie par impulsion en μJ	39	1600
Défocalisation en μm (en dessous de la surface)	50	1000
Largeur d'ablation attendue en μm	2000	130
Gaz de transport dans la cellule	He	He

Les couplages entre un laser et les ICP-MS ont nécessité des interfaces différentes schématisées en Figure 30. Une question clé est la partition du débit de gaz vecteur ($\sim 1 \text{ L.min}^{-1}$) entre la cellule d'ablation pour une haute efficacité de transport, et le nébuliseur pour assurer la formation d'un aérosol stable pour l'optimisation de l'ICP-MS. Ceci a été obtenu pour un débit de gaz nébuliseur entre $0,4$ et $0,6 \text{ L.min}^{-1}$ et un flux dans la cellule d'ablation autour de $0,6 \text{ L.min}^{-1}$. Lors des réglages instrumentaux (étalonnage en masse, optimisation des lentilles et de débit de gaz vecteur, etc.), une solution multiélémentaire à $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Li, Y, In, Ce, Tl) est nébulisée par un nébuliseur ultrasonique (U5000AT+, Cetac). L'optimisation de la cellule de collision a été effectuée avec de l'hélium et hydrogène introduits comme gaz collisionnels. Le rapport He/H_2 a été optimisé pour obtenir un signal bruit de fond $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ minimal ($< 100\text{-}200$ coups) et un signal ^{115}In maximal. Après l'étape d'optimisation et durant l'ablation du gel, la nébulisation ultrasonique a été éteinte pour éviter d'obstruer la torche de l'injecteur par des particules de gel humides. Les conditions expérimentales optimisées de l'ICP - MS sont données dans le Tableau 13.

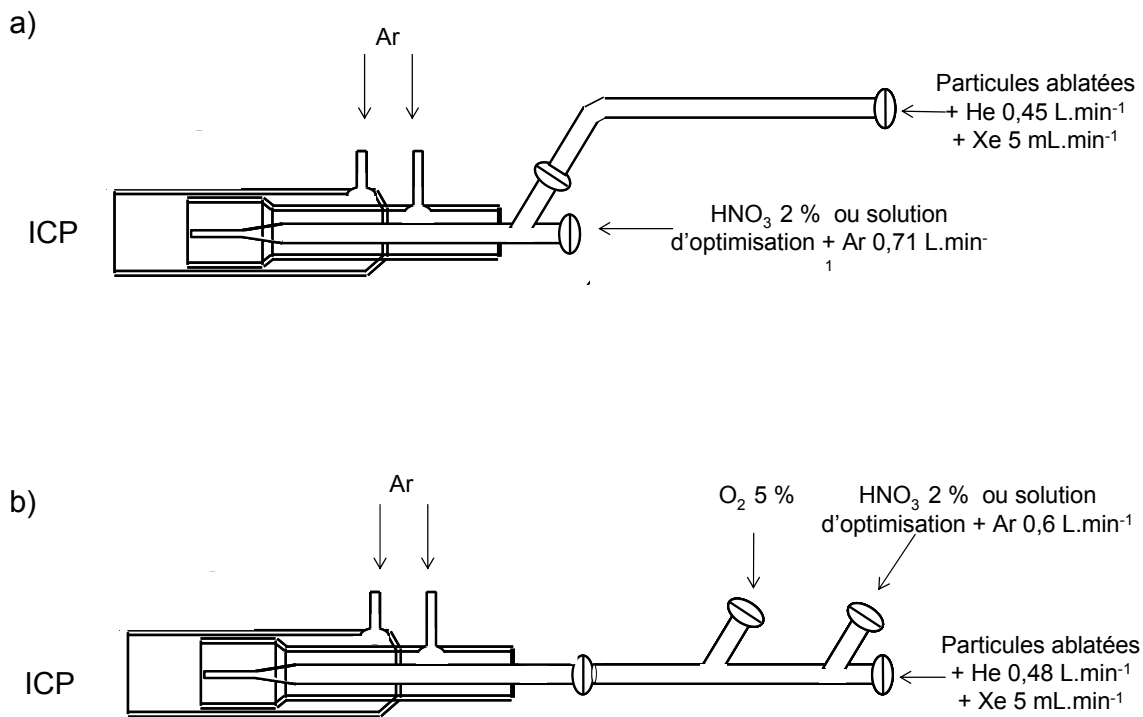


Figure 30 : Schémas des interfaces (connecteur et torche) entre la sortie laser et l'ICP.

(a) : Interface pour l'ICP-MS X7 Thermo Electron en configuration ablation laser. Une torche à double entrée (Thermo Electron, Winsford, UK) avec un connecteur à simple entrée sont utilisés.

(b) : Interface de l'ICP-MS 7500 Agilent en configuration ablation laser. Une torche à simple entrée avec un connecteur à triple entrée sont utilisés).

Tableau 13 : Conditions expérimentales de l'ICP-MS à ablation laser.

ICP-MS	X7 Série CCT (Thermo Electron)	7500 (Agilent technologies)
Cônes	Nickel	Platine
Torche	2 entrées avec un injecteur de diamètre interne 1,5 mm	1 entrée avec un injecteur de diamètre interne 1,5 mm
Chambre de nébulisation	2°C	2°C
Débit de gaz de nébulisation (Ar)	0,71 L.min ⁻¹	0,6 L.min ⁻¹
Débit de gaz de transport (He)	0,45 L.min ⁻¹	0,48 L.min ⁻¹
Débit de gaz auxiliaire (Ar)	0,7 L.min ⁻¹	0,9 L.min ⁻¹
Débit de gaz plasmagène (Ar)	15 L.min ⁻¹	15 L.min ⁻¹
Puissance radiofréquence	1400 W	1500 W
Isotopes (temps d'acquisition)	77, 78, 80, 82 (110 ms) pour Se 63, 65 (20 ms) pour Cu 52, 53, 124, 126 (10 ms) pour Cr et Xe	77, 78, 80, 82 (110 ms) pour Se 63, 65 (20 ms) pour Cu 52, 53, 124, 126 (10 ms) pour Cr et Xe
Débit de H ₂ CCT	0,36 mL.min ⁻¹	4 mL.min ⁻¹
Débit de He CCT	4 mL.min ⁻¹	0 mL.min ⁻¹

3.8. Spectrométries de masse à ionisation électrospray et MALDI de protéines entières

Les échantillons collectés après la procédure de purification de la calmoduline sélénée ont été dessalés par chromatographie de phase inverse sur des micro colonnes de phase C4 dans des cônes ZipTip (Millipore, Billerica, MA) selon les recommandations du constructeur et séchés en utilisant un DNA Speed Vac (Model DNA120, Thermo Quest, NY, USA) pendant 4 h. Les résidus secs contenant la SeMet–CaM ont été dissous dans 100 µL de méthanol 50 % (v/v) contenant à 0,1 % TFA (v/v). Les spectres ESI MS ont été acquis avec un spectromètre API 300 dans les conditions analytiques décrites dans le Tableau 14.

Les solutions de thiorédoxine réductase, de glutathion peroxydases non stabilisées et stabilisées par alkylation ont été analysées par un spectromètre Q STAR XL dans les conditions analytiques répertoriées dans Tableau 14.

Les calibrations en masses des spectromètres API 300 et Q STAR XL ont été effectuées par infusion d'une solution de rénine porcine à 2 pmoles/µl ($M = 1757,9$). L'étalonnage se fait à partir des ions multi-chargés. Les analyses MALDI-TOF-MS ont été effectuées dans les conditions analytiques données dans le

Tableau 15. Les calibrations en masses en MALDI-TOF-MS ont été effectuées avec un mélange d'insuline ($M = 5734.59$), de thiorédoxine ($M = 11674.48$) et d'apomyoglobine ($M = 16952.56$).

Tableau 14 : Conditions analytiques pour l'analyse de protéines entières par ESI MS.

ESI MS	Q STAR XL Source Microspray	Q STAR XL Source Nanospray	API300 Source Ionspray
Mode d'analyse	Positif	Positif	Positif
Tension de l'ionspray	4500 V	1200 V	5000 V
Tension de l'orifice	60 V	60 V	50 V
Tension du détecteur	2200 V	2200 V	2700 V
Masses balayées (m/z)	800-2000 uma	800-1800 uma	800-2300 uma
Temps d'intégration	10 ms	10 ms	10 ms

Tableau 15 : Conditions analytiques pour l'analyse de protéines et peptides par MALDI TOF MS.

MALDI-TOF-MS	Voyager-DE-STR
Mode d'analyse	Linéaire (masses > 15000 Da) Reflectron (masses < 15000 Da)
Tension (accélération)	20 kV
Tension (grid)	94 %
Fréquence	20 Hz
Nombre de tirs par spectre	1000
Mode d'extraction	Retardé (1000 ns)

3.9. Digestion enzymatique des protéines sélénées dans le gel

Le protocole utilisé est basé sur la méthode développée par Aebersold *et al* (194). Le morceau de gel contenant la protéine sélénée a été excisé et décoloré avec deux volumes de 100 mM de bicarbonate d'ammonium/ 50 % d'acétonitrile durant 45 min. Il a été placé pendant 5 min à température ambiante dans un volume de 100 % d'acétonitrile (150 μ l) puis séché pendant 10 min à 30°C. 10 μ L de solution de trypsine (1 mg.mL⁻¹ de trypsine dans 50 mM d'acide acétique) ont été préparés et dilués avec 790 μ L de 40 mM de NH₄HCO₃ et 5 mM de CaCl₂ dans 10 % (v/v) d'acétonitrile pour avoir une concentration finale de 12.5 μ g.mL⁻¹. Le morceau de gel a été réhydraté dans un volume minimum de la solution de trypsine (soit 30 μ L) à 4°C pendant 45 min. La solution de trypsine n'ayant pas pénétré dans le gel est remplacée par du tampon sans trypsine puis l'échantillon est incubé 17 h à 37°C pour digestion tryptique. Les peptides sont ensuite extraits du morceau de gel par agitation rapide en trois étapes : premièrement avec 150 μ l d'eau pendant 10 min et puis deux fois avec 5 % (v/v) de TFA dans 50 % (v/v) d'acétonitrile durant 60 min. Les trois extraits sont rassemblés et le liquide est évaporé sous vide (model DNA120, Thermo Quest, NY) pendant 2 h. L'échantillon est conservé à -20°C. Les échantillons ont été repris dans un minimum d'eau Milli-Q (> 18,2 M Ω .cm⁻¹) contenant soit 0,1 % de TFA.

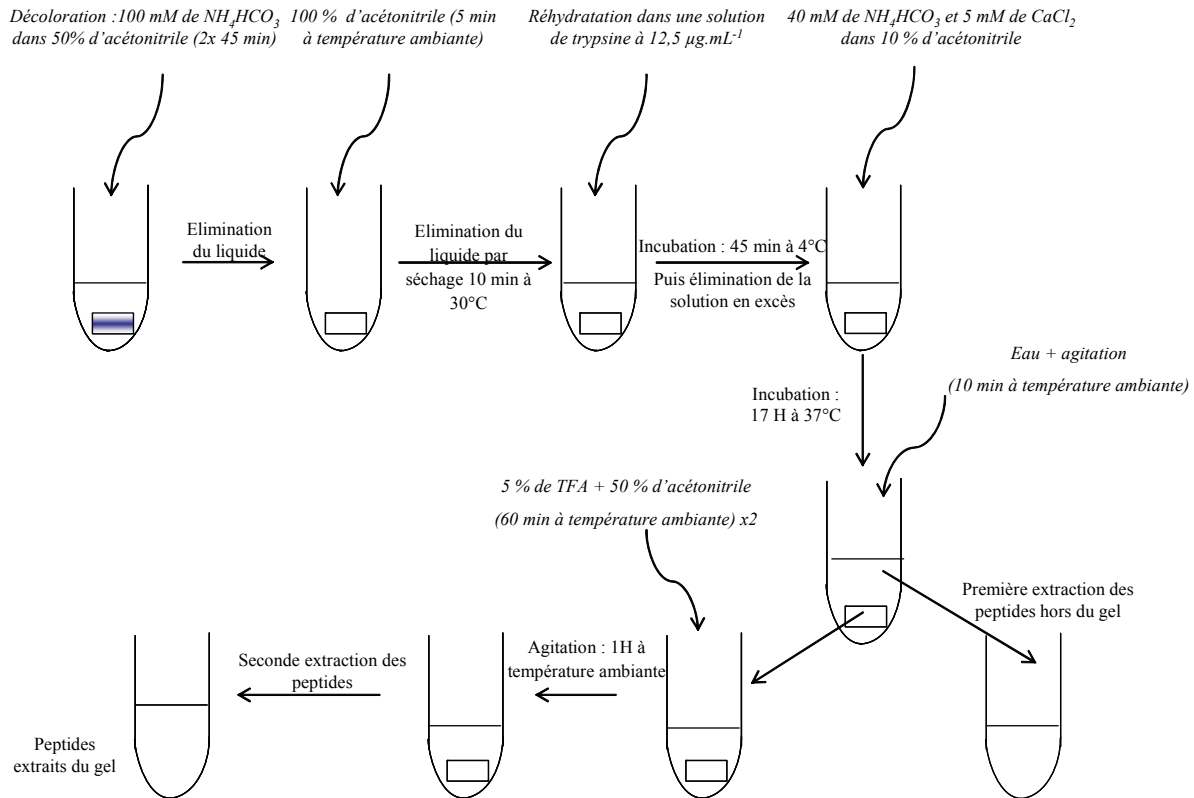


Figure 31 : Protocole de digestion enzymatique dans le gel.

3.10. Analyse en chromatographies d'exclusion stérique-ICP-MS des protéines et peptides sélénisés

Les composés sélénisés ont été séparés sur des colonnes Superdex 200 HR 10/30 et Superdex peptide HR 10/30 avec une phase mobile constituée de 200 mM d'ammonium acétate au pH 7,8 à un débit de 0,7 mL.min⁻¹. La colonne Superdex 200 a été calibrée avec la thyroglobuline (670 kDa), la ferritine (474 kDa), la transferrine (90 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), la calmoduline sélénisée (17 kDa) et la sélénocystine (334 Da). Les conditions ICP-MS utilisées pour les couplages SEC ICP-MS sont données dans le Tableau 17. Les analyses ont été effectuées avec 100 µL d'échantillon.

3.11. Analyse en capillaire LC-ICP-MS et nanoLC-ICP-MS des peptides sélénisés

Les conditions chromatographiques utilisées sont listées dans le Tableau 16. L'isotope ⁸⁰Se a été mesuré en ICP-MS dans le but de détecter les peptides contenant du sélénium. Les conditions de mesure en ICP-MS (débit de gaz nébuliseur, puissance rf et tension des lentilles) ont été optimisées quotidiennement en utilisant une solution multiélémentaire (Li, Y et Tl) pour trouver les meilleurs paramètres ICP-MS par rapport à la position de la torche, aux tensions des lentilles, puissance rf, à la calibration en masse, au refroidissement et aux flux auxiliaires. Les conditions ICP-MS optimisées sont données en Tableau 17.

Tableau 16 : Conditions analytiques optimales des HPLC pour les différents couplages.

Instrumentations	HPLC capillaire ICP-MS	NanoHPLC ICP-MS
Phases mobiles	A : 0,05 % TFA + eau B : 0,05 % TFA + acétonitrile	A : 0,05 % TFA + eau B : 0,05 % TFA + acétonitrile
Gradient	0–3 min 5% B isocratique, 3–10 min 5–20% B linéaire, 10– 40 min 20–60% B linéaire, 40–41 min 60–90% B linéaire, 41–45 min 90% B isocratique, 45–50 min 90-5% B linéaire.	0–3 min 5% B isocratique, 3–10 min 5–20% B linéaire, 10– 60 min 20–90% B linéaire, 60–65 min 90% B isocratique, 65–70 min 90-5% B linéaire.
Solution d'optimisation	5 µg L ⁻¹ de Li, de Y, et de Tl ajoutée aux phases mobiles A et B	200 µg L ⁻¹ de Li, de Y, et de Tl ajoutée aux phases mobiles A et B
Débit en sortie de colonne	5 µL.min ⁻¹	200 nL.min ⁻¹
Débit de la cartouche de préconcentration	5 µL.min ⁻¹	5 µL.min ⁻¹

Tableau 17 : Conditions expérimentales de l'ICP-MS couplé à l'HPLC, la capHPLC ou la nanoHPLC.

ICP-MS	(Agilent 7500ce)
Puissance rf	1500 W
Cônes	Nickel
Octopôle bias	-18 V
Quadrupôle bias	-17 V
Débit de gaz auxiliaire (Ar)	0,9 L.min ⁻¹
Débit de gaz plasmagène (Ar)	15 L.min ⁻¹
Débit du gaz de nébulisation	1.05 L.min ⁻¹
Débit du gaz de la cellule de collision	3.8 mL.min ⁻¹ H ₂
Isotopes (temps d'acquisition)	77, 78, 80, 82 (110 ms)

3.12. Analyse en nanoLC-ESI MS/MS des peptides séléniés.

Les conditions chromatographiques sont les mêmes que celles utilisées en nano LC ICP-MS listées en Tableau 16. Les conditions en ESI MS/MS sont listées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Conditions expérimentales de la nanoLC ESI-MS/MS.

ESI MS/MS	Q STAR XL Source nanospray
Mode d'analyse	Positif
Tension de l'ionspray	1800 V
Tension de l'orifice	60 V
Tension du détecteur	2200 V
Gamme de masses balayée (m/z)	300-1800 uma
Temps d'intégration	10 ms

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

1 : Le problème de disponibilité des étalons protéiques sélénisés

Au début de ces travaux de thèse, la seule sélénoprotéine commercialement disponible était la glutathion peroxydase qui présente un seul résidu sélénocystéyl dans sa séquence. Cette protéine est vendue lyophilisée par le fournisseur sans apporter d'information sur sa pureté et son contenu en sélénium ce qui pose un problème en raison de l'instabilité connue de la sélénocystéine après oxydation (248). De plus, le développement de méthodes analytiques avec une telle protéine nécessite bien entendu une consommation et un coût conséquents ce qui nous a conduit à envisager d'autres solutions pour accéder à des étalons protéiques contenant du sélénium. Trois solutions ont été envisagées : la synthèse chimique de protéines contenant du sélénium, la purification de protéines contenant du sélénium à partir d'un échantillon naturel ou la biosynthèse recombinante avec un système de surexpression. Différentes méthodes de synthèse chimique ont été décrites. En général, ces méthodes consistent en la synthèse chimique de sélénopeptides suivie de leur ligation dans une protéine cible. Ces synthèses se font en plusieurs étapes difficiles à maîtriser en raison de la haute réactivité de la sélénocystéine. Les procédures de purification à partir de sources naturelles sont souvent longues, laborieuses et aboutissent à de faibles rendements de purification ce qui rend difficilement envisageable cette solution. Certaines sélénoprotéines ont toutefois été purifiées pour des analyses ESI-MS ou MALDI-MS à partir de sérum (ex : selenoprotein P) (318) alors que les protéines sélénisées SIP18 et HSP12 contenant de la sélénométhionine l'ont été à partir de la levure sélénisée (319). En ce qui concerne les sélénoprotéines, les plasmides portant les gènes codant pour ces sélénoprotéines sont difficiles d'accès. La transfection de cellules eucaryotes pour la surexpression de sélénoprotéines eucaryotes est une possibilité mais a jusqu'ici été limitée par les faibles rendements obtenus. En 1992, Chen *et al* ont montré que la bactérie *Escherichia coli* a la capacité de surexprimer des sélénoprotéines recombinantes (320). Cependant, l'expression hétérologue directe de protéines recombinantes dans *E. coli* est complexe en raison de l'incompatibilité de la machinerie d'insertion bactérienne de la sélénocystéine avec les gènes sélénoprotéines eucaryotes. Une possibilité pour contourner ce problème est l'utilisation d'une souche auxotrophe pour la cystéine laquelle permet la substitution du résidu cystéyl par le résidu sélénocystéyl dans un milieu de culture déficient en soufre (60). Toutefois, la disponibilité limitée de sélénocystéine libre a orienté nos recherches vers la surproduction d'une protéine riche en méthionine où l'on peut remplacer les résidus méthionyles avec des sélénométhionyles par mimétisme chimique. Le chapitre suivant présente la biosynthèse, la purification et enfin la caractérisation du standard protéique sélénisé choisi.

1.1. La calmoduline sélénée

1.1.1 Choix

Les critères dont nous avons tenu compte lors du choix d'une telle protéine sont un nombre conséquent de méthionine, une distribution relativement uniforme dans sa séquence, la disponibilité d'un plasmide porteur d'un gène codant pour la protéine avec les séquences permettant son expression dans une culture d' *E. coli* et une procédure de purification simple.

Ces critères sont réunis dans la protéine calmoduline (CaM), une protéine ubiquitaire de 148 acides aminés liant le calcium et dont l'activité régulatrice permet l'activation d'une large gamme de protéines cibles et d'enzymes (321). La CaM contient 8 résidus méthionyles ce qui en fait une protéine riche en méthionine (6.1%) comparé au contenu moyen classique en méthionine de 1.5%. La séquence protéique de la calmoduline est donnée en Figure 32.

```
ADQLTDEQIAEFKEAFSLFDKGDGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDA
DGNGTIDFPEFLNLMARKMKDTDSEELKEAFRVFDKDGNGFISAAELRHVMTNLGE
KLTDEEVDEMIREADV DGDGQVNYEEFVQVMMAK
```

Figure 32 : Séquence en acides aminés de la protéine calmoduline.

Les résidus méthionyles sont indiqués en gras et soulignés

1.1.2 Biosynthèse et purification de la calmoduline sélénée (*SeMet*-CaM)

La disponibilité d'un plasmide pVU1 porteur du gène CaM nous a permis d'effectuer la biosynthèse de la protéine (322). Afin d'incorporer de façon maximisée la sélénométhionine en lieu et place des résidus méthionyles tout en évitant la toxicité du sélénium, une optimisation des paramètres de croissance bactérienne a été réalisée. Les meilleurs taux de croissance ont été obtenus en utilisant la sélénométhionine et non le sélénite comme source de sélénium avec une addition durant la phase exponentielle de croissance lorsque la culture atteint une absorbance à 600 nm de 0,5. Dans la littérature, les méthodes de purification de la calmoduline sont basées sur des chromatographies d'interaction hydrophobes. Celles-ci utilisent du calcium qui en se liant à la calmoduline dans un rapport 4:1 permet sa rétention sur la colonne par un changement de conformation. Puisque la CaM de type sauvage et la *SeMet*-CaM ont des structures très similaires sinon identiques (323), nous avons supposé que la propriété de liaison de la calmoduline aux chromatographies d'interaction hydrophobes en présence de calcium autoriserait la purification de la *SeMet*-CaM dans les mêmes conditions.

La purification a ainsi été effectuée en 2 étapes de chromatographies d'interaction hydrophobe (HIC). Dans la première, l'extrait brut de protéines a été fractionné sur une colonne phényl-sépharose CL-4B

constituée d'une matrice d'agarose greffée de groupements phényles. La fraction protéique contenant la SeMet-CaM a ensuite été purifiée des protéines concomitantes en utilisant sa forte affinité en présence de Ca^{2+} avec la colonne phényl-resource constituée de ligands hydrophobes phényles greffés à une matrice de polystyrène/divinylbenzène rigide monodispersée. Un lavage avec une phase mobile de 0.2 M KCl permet d'éluer 95% des protéines dans le volume mort, comme en témoigne les mesures d'absorbance à 280 nm, alors que la SeMet-CaM dans sa conformation modifiée par le calcium adhère à la résine phényl-resource (Figure 33). Le chromatogramme montre clairement que cette affinité est cassée par addition de 1 mM d'EDTA, ce qui résulte en la destruction du complexe SeMet-CaM- Ca^{2+} . La SeMet-CaM est éluée en un pic fin et symétrique. Le pic a été collecté et conservé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour de futures analyses.

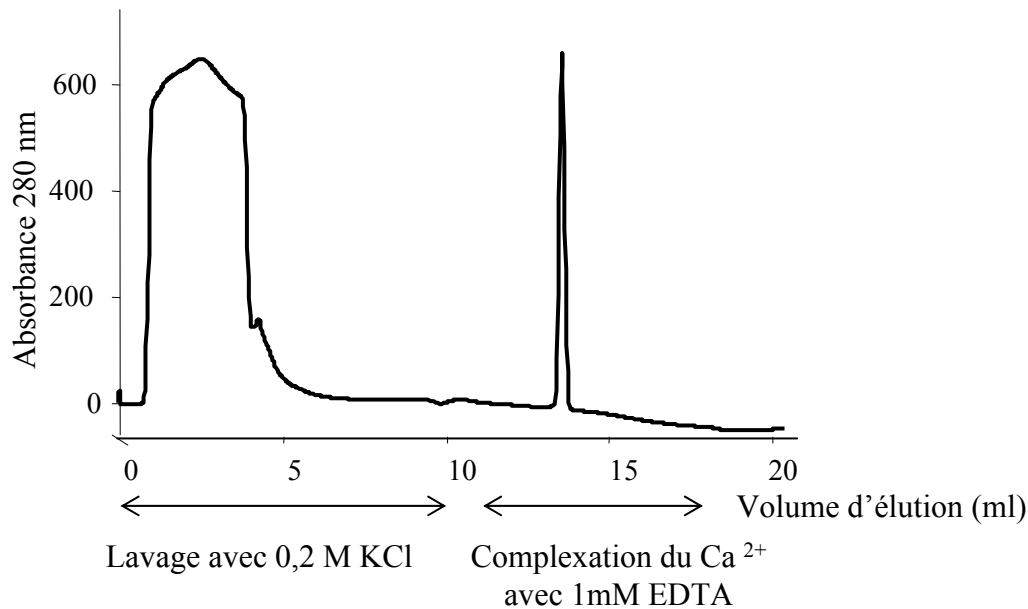


Figure 33 : Purification de la calmoduline sélénée par HIC sur colonne phényl-resource.

L'élution des protéines de la colonne phényl-resource a été suivie par mesure de l'absorbance à 280 nm en fonction du volume d'élution. L'ajout de Ca^{2+} à l'extrait brut permet à la SeMet-CaM d'être retenue par la colonne. Après avoir élué les protéines retenues non spécifiquement, la SeMet-CaM est éluee par ajout d'1mM d'EDTA à la phase mobile.

1.1.3. Pureté de l'étalon protéique et confirmation de son identité SeMet-CaM par ESI-MS

L'identification des protéines présentes dans le pic élué (Figure 34) a été effectuée par l'utilisation d'un électrospray MS. Le spectre de masse obtenu montre une enveloppe de pics multichargés (+10 à +17) (Figure 34 **a**). Après traitement informatique (déconvolution) deux ensembles sont observés de 16627 à 16755 Da et de 17002 à 17130 Da, respectivement (Figure 34 **b**). En considérant la masse moléculaire de la calmoduline de 16627 Da calculée *in silico*, le premier cluster (16627–16755 Da) est constitué de la forme non sélénée et non oxydée de la calmoduline à 16627 Da majoritaire suivie par 8 pics minoritaires correspondant aux résidus méthionyles oxydés en méthionyles sulfoxydes. Le second ensemble (17002–

17130 Da) correspond à la calmoduline sélénée et à ces différents états d'oxydation. Il comprend la forme non oxydée (17002 Da), suivie par les formes partiellement oxydées jusqu'à la SeMet-CaM complètement oxydée (17130 Da). Ces résultats montrent que seules 2 protéines ont co-éluées, la calmoduline sélénée et non sélénée. Le fait que la forme sélénée soit plus oxydée que la forme soufrée est en accord avec les observations déjà faites. Ma *et al* rapportent en effet que les sélénioéthers sont beaucoup plus enclin à l'oxydation en sélénoxydes que les thioéthers en sulfoxydes (248). Aucune autre protéine n'a été détectée et aucune forme de calmoduline dans laquelle les méthionines ne sont qu'en partie substituées par des sélénométhionines n'a été observée. La présence de calmoduline non sélénée peut s'expliquer par une expression basale du gène CaM dans la première phase de la culture cellulaire sans sélénométhionine.

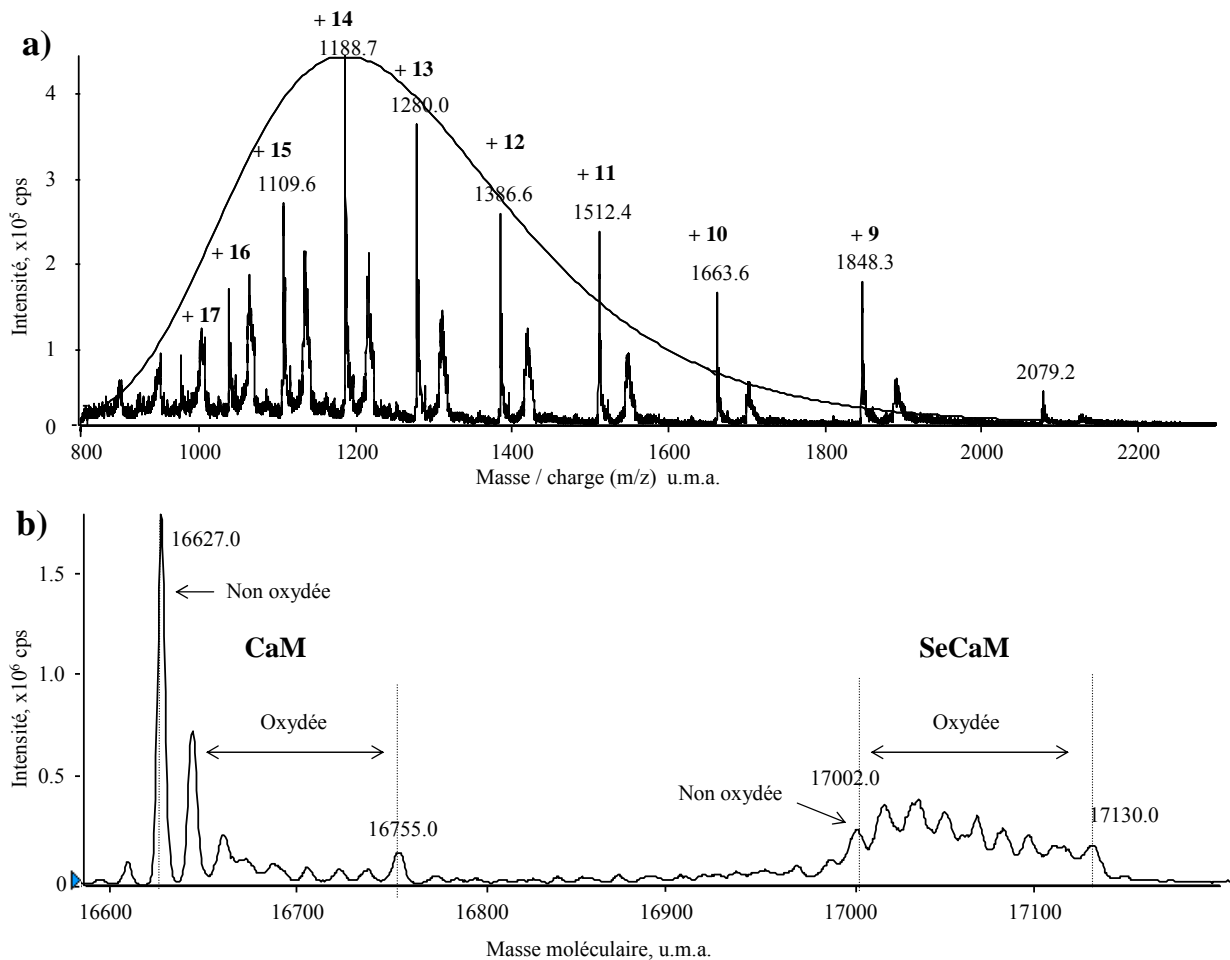


Figure 34 : Spectre de masse électrospray de la fraction collectée après HIC.

a : Spectre brut : la charge des ions multichargés est indiquée.

b : Spectre déconvolué. Le traitement informatique du spectre brut met en évidence la présence de formes non oxydées et oxydées de la CaM et de la SeMet-CaM

1.1.4. Electrophorèse sur gel en conditions dénaturantes SDS-PAGE de l'étalon calmoduline séléné

Une analyse du pic élué a également été effectuée en SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie. L'électrophérogramme (Figure 35) montre clairement 2 bandes d'intensités différentes (la calibration avec les marqueurs de poids moléculaires est également donnée). Puisque aucune autre protéine que la calmoduline n'a été détectée par spectrométrie de masse, ces 2 bandes sont supposées correspondre aux formes sélénée et non sélénée de la calmoduline (Figure 34). Une migration électrophorétique de la calmoduline en 2 bandes par analyse SDS-PAGE a déjà été rapportée en présence de calcium (323). Pour étudier cette possibilité, nous avons effectué une analyse SDS-PAGE de notre préparation de calmoduline en présence de CaCl_2 ou d'EDTA, chélateur d'ions bivalents. Dans les 2 conditions, les 2 bandes étaient présentes dans la même quantité relative indiquant que leur origine est certainement indépendante du Ca^{2+} .

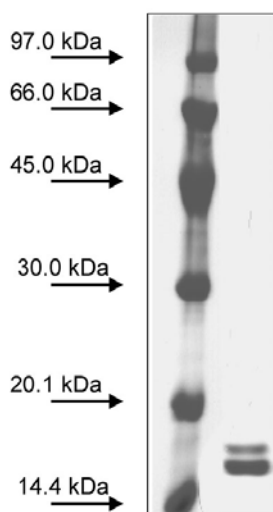


Figure 35 : Pureté de la préparation de calmoduline sélénée en 1D SDS-PAGE.

Piste de gauche : marqueurs de taille moléculaire, piste de droite : 780 ng de protéines de la fraction éluée en HIC sont déposées pour analyse. La révélation des protéines a été réalisée par coloration au bleu de Coomassie.

1.2. La thiorédoxine réductase de rat

1.2.1. Surproduction de la sélénoprotéine thioredoxine réductase TrxR

Une méthode a récemment été mise au point pour la surproduction de la sélénoprotéine thioredoxine réductase (TrxR). En 1999, Arner *et al.* ont surproduit et purifié la sélénoprotéine TrxR de rat avec un rendement de 20 mg par litre de culture dont 25 % présente l'activité de l'enzyme native (324). La méthode développée met en jeu la bactérie *E. coli*. En 2004, l'amélioration des conditions de production a permis d'atteindre des rendements jusqu'à 40 mg de TrxR par litre de culture (325). La sélénoprotéine TrxR peut être ensuite purifiée par chromatographie sur une colonne phénylarsine oxyde sépharose avec

un rendement d'environ 15 à 20 mg de sélénoprotéines par litre de culture bactérienne. Cette sélénoprotéine est commercialisée par la société SIGMA ALDRICH depuis fin 2006. Le contenu en sélénium par une méthode spécifique n'est toutefois pas évalué avant la fourniture de l'échantillon.

1.2.2 Caractérisation de l'échantillon de thiorédoxine réductase fourni

Un échantillon de 500 µg de sélénoprotéine TrxR recombinante préparée, comme précédemment décrit (324), nous a été fourni par le Dr Elias Arner de l'institut Karolinska (Stockholm, Suède). Le pourcentage de la TrxR active (et donc sélénée) est estimée à environ 50 % par mesure de l'activité enzymatique. Selon Arner *et al*, cet échantillon est un mélange de la protéine intacte de 54500 Da avec 499 acides aminés dont un résidu sélénocystéyl en pénultième position et d'une forme tronquée des deux derniers acides aminés, donc sans le résidu sélénocystéyl, estimée à 54293 Da. Tandis que l'analyse de cet échantillon en MALDI-TOF MS révèle un unique et large pic centré à 54674.9 Da (Figure 36 a), une analyse du même échantillon en ESI-MS montre la présence d'autres composés aux masses 54468, 54770 et 54978 Da (Figure 36 b). Ces composés pourraient être des adduits de la thiorédoxine réductase à 54673 Da avec des ions comme Cl⁻ (composé à 54779 Da) ou avec des molécules comme le glutathion (composé à 54978 Da). Le composé à 54468 serait une forme tronquée des deux derniers acides aminés (205 Da) de la thiorédoxine réductase à 54673 Da. L'échantillon analysé s'avère beaucoup plus complexe qu'initialement décrit avec plusieurs composés de poids moléculaires avoisinant les 54673 Da. Toutefois, ces analyses ne permettent pas de conclure en la présence de thiorédoxine réductase sélénée dans cet échantillon.

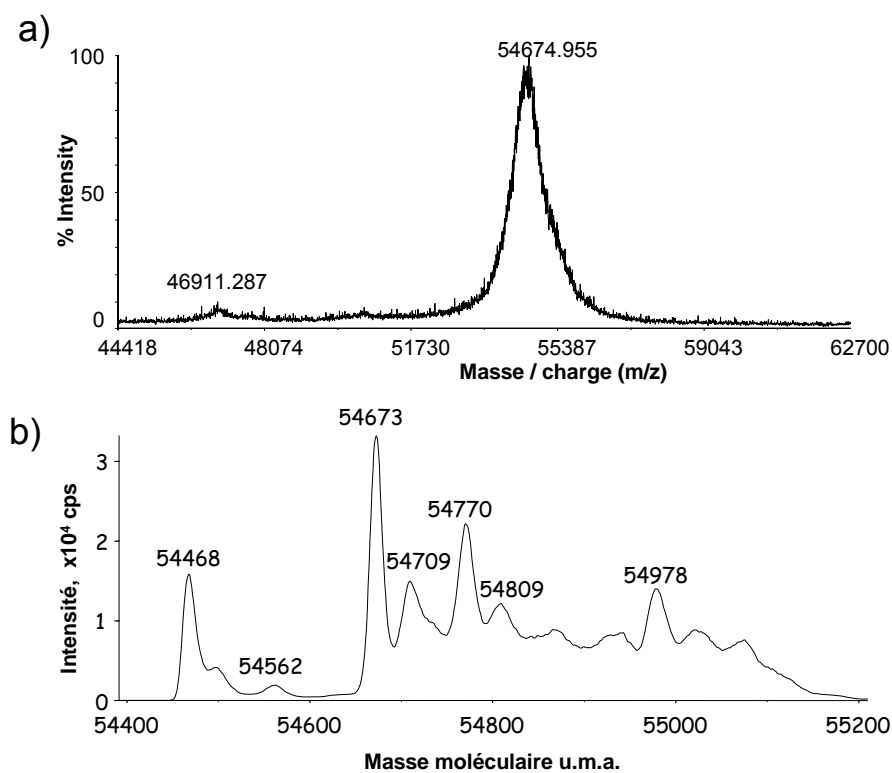


Figure 36 : Analyses de l'échantillon thiorédoxine réductase en spectrométries de masse moléculaire
(a) Spectre MALDI-MS. 5 μ L de la solution thiorédoxine réductase (1.11 mg protéines/mL) ont été mélangés avec 5 μ L d'une solution d'acétonitrile 30% (v/v) contenant 10 mg/mL d'acide sinapinique et 0.3% (v/v) de TFA. 1 μ L du mélange ont été déposés sur la plaque et analysés par MALDI-MS.
(b) Spectre ESI-MS déconvolué. 20 μ L de la solution de thiorédoxine réductase (1.11 mg protéines/mL) ont été mélangés à 10 μ L de méthanol contenant 0.3 % (v/v) d'acide formique pour une analyse en ESI-MS.

1.3. Caractérisation de la glutathion peroxydase commerciale par spectrométries de masse ESI et MALDI

La glutathion peroxydase, purifiée à partir de globules rouges, a longtemps été la seule sélénoprotéine commercialement disponible. Un échantillon de GPx a été analysé par spectrométries de masse MALDI-MS et ESI-MS. Le spectre de masse électrospray (Figure 38) montre une protéine dominante avec une masse moléculaire de 21512 Da avec des adduits de sodium aux masses 21533 et 21556 Da. La masse moléculaire a été confirmée par MALDI-TOF MS (21513 Da). Un pic majoritaire correspondant au monomère ; ainsi que des pics moins intenses du dimère jusqu'au tétramère sont présents dans le spectre MALDI-MS. La séquence en acides aminés de la GPx-1 bovine, donnée en Figure 37, donne une masse moléculaire moyenne de 22658.67 Da, lequel est 1145,6 Da plus grand que la valeur mesurée. Cette valeur correspond à la perte de 12 résidus d'acides aminés du N-terminal MCAAQRSAAALA (théoriquement 1146.371 Da) qui a été rapportée (sans données MS) suite à la protéolyse de la protéine (326).

```
MCAAQRSAAA LAAAAPRTVY AFSARPLAGG EPFNLSSLRG KVLLIENVAS LZGTTVRDYT
QMNDLQRRLG PRGLVVLGFP CNQFGHQENA KNEEILNCLK YVRPGGGFEP NFMLFEKCEV
NGEKAHPLFA FLREVLPTPS DDATAALMTDP KFITWSPVCR NDVSWNFEEKF LVGPDGVPVR
RYSRRFLTID IEPDIETLLS QGASA
```

Figure 37 : Séquence en acides aminés de la glutathion peroxydase
GPx1_BOVIN (UniProtKB/Swiss-Prot P00435) (où Z correspond au résidu sélénocystéyl)

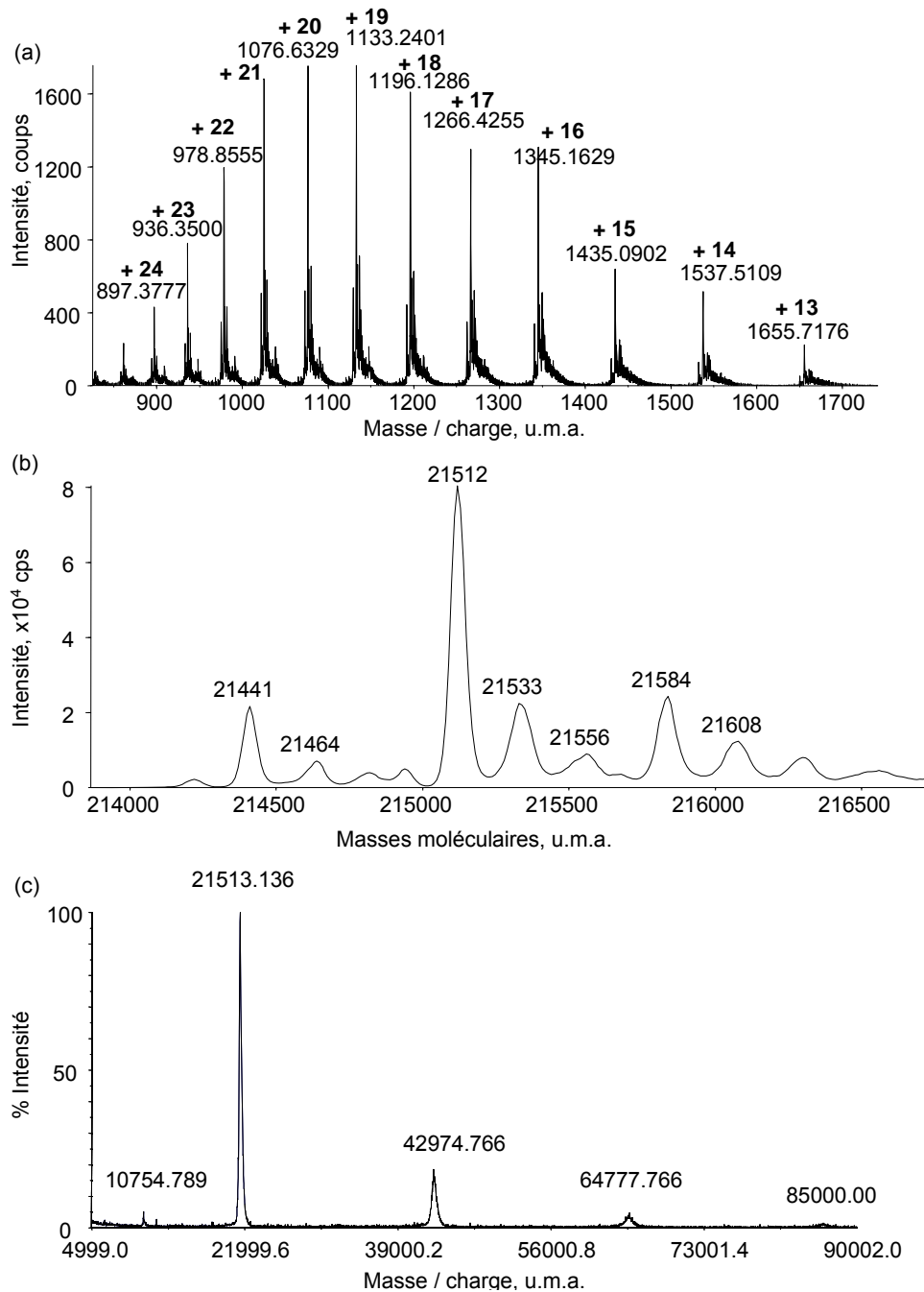


Figure 38 : Analyses de la glutathione peroxydase commercialisée en spectrométries de masse moléculaire

(a) Spectre ESI-MS : spectre non déconvolué

(b) Spectre ESI-MS : spectre déconvolué. 2 μ L de solution GPx ont été mélangés avec 38 μ L d'une solution d'acétonitrile 30% (v/v) contenant 0.1% TFA. L'analyse ESI-MS a été faite avec 6 μ L du mélange.

(c) Spectre MALDI-MS. 1 μ L de solution GPx ont été mélangés avec 9 μ L d'une solution d'acétonitrile 30% (v/v) contenant 10 mg/mL d'acide sinapinique et 0.3% (v/v) TFA. 1 μ L du mélange ont été déposés sur plaque pour l'analyse en MALDI-MS.

2 : Ablation laser ICP-MS pour la détection du sélénium protéique après électrophorèse sur gel

2.1. Développement méthodologique avec la calmoduline sélénée

2.1.1. Optimisation des conditions d'analyses

A ce jour, toutes les applications rapportées pour l'analyse de gel par ICP-MS à ablation laser ont utilisé un laser UV (193 nm ArF, 266 nm Nd:YAG) à impulsions nanoseconde avec une fréquence de tirs entre 5 et 20 Hz. Dans nos expériences, les pistes du gel SDS-PAGE ont été analysées avec un laser UV 266-nm à impulsions nanosecondes (8 ns) par un balayage translationnel (et monodimensionnel) suivi par une détection du sélénium en ICP-MS. Plusieurs conditions d'analyses ont été testées à savoir, deux conditions de plasma (sec et humide), différentes vitesses de balayage, fréquences de tirs et modes de détection (^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se , ^{82}Se avec la cellule de collision activée et ^{77}Se , ^{82}Se sans la cellule de collision). La détection la plus sensible a été obtenue avec l'isotope ^{80}Se mesuré avec la cellule de collision activée dans des conditions de plasma humide, pour une fréquence de tirs de 20 Hz et une vitesse de balayage à 60 $\mu\text{m/s}$. Ces conditions d'analyse ont été retenues pour la suite des analyses présentées ci-dessous.

2.1.2. Analyse par ICP-MS à ablation laser de la SeCaM après électrophorèse sur gel

Le résultat obtenu pour la détection du sélénium dans l'échantillon de calmoduline sélénée après analyse du gel en ICP-MS par ablation laser est montré dans la Figure 39. Une seule bande contient du sélénium, ce qui élimine l'hypothèse avançant que la seconde bande observée serait due à la présence de calcium. Par contre, un balayage du même gel avec une détection spécifique du soufre a montré que cet élément est présent dans les 2 bandes. Comme l'analyse en spectrométrie de masse n'a pas révélé la présence de molécules de calmoduline contenant à la fois du soufre et du sélénium, il a été conclu que la bande dans les plus hauts poids moléculaires serait de la calmoduline non oxydée et celle migrant le plus vite comprendrait les formes oxydées de la calmoduline sélénée et non sélénée. L'oxydation des résidus méthionyls a déjà été rapportée durant le processus SDS-PAGE par le persulfate résiduel utilisé pour la polymérisation du gel de polyacrylamide (327). Ces résultats nous ont conduit à améliorer le protocole de préparation de l'échantillon afin de n'obtenir qu'une bande en SDS-PAGE. L'ajout de SeMet à la culture avant une DO_{600} de 0,5 a permis de diminuer la quantité de calmoduline soufrée et d'obtenir un gel ne présentant qu'une seule bande en coloration au bleu de Coomassie.

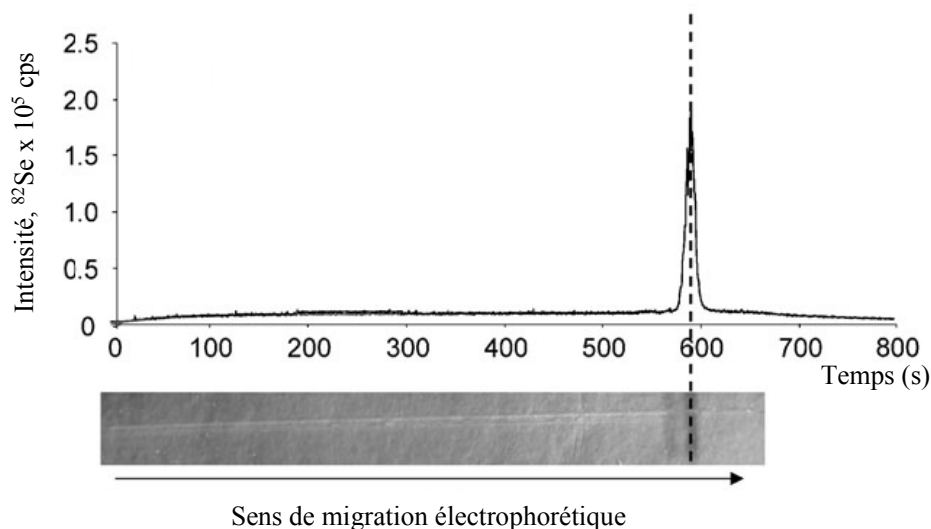


Figure 39 : Analyse par ablation laser ICP-MS de l'étalon sélénié SeCaM après SDS-PAGE.

612 ng de SeCaM ont été déposés pour l'analyse en 1D-SDS-PAGE. Les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie avant l'analyse par ablation laser-ICP-MS.

2.1.3. Performances analytiques de la méthode : Gamme de linéarité et sensibilité

Dans le but de définir les performances analytiques de la méthode, une série de solutions SeMet-CaM a été analysée en 1-D SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de Coomassie avant détection du sélénium par LA-ICP-MS. Les concentrations analysées couvrent la gamme entre 2.5 ng.mL^{-1} (Se dans la solution appliquée sur le gel) et 640 ng.mL^{-1} . En terme de quantité absolue en sélénium et protéines appliquées sur le gel, ces concentrations couvrent la gamme de 27 pg à 6.7 ng de Se, et 1.8 ng à 436 ng de protéines, respectivement. La courbe d'étalonnage LA-ICP-MS dans cette gamme est linéaire ($r^2 = 0.9999$) (Figure 40). La concentration minimale chargée, 2.5 ng.mL^{-1} de sélénium, donne un signal environ 6 fois plus important que le triple de la déviation standard du blanc (mesuré sur un gel « blanc » où aucun signal sélénium n'a été détecté). Ceci correspond à une limite de détection de 1.3 ng.mL^{-1} , 13 pg dans le gel ou 300 fg en terme de quantité absolue de sélénium détectée. La bande la moins concentrée et détectée dans le gel par coloration au bleu de Coomassie correspond à une concentration en sélénium de 20 ng.mL^{-1} lequel est 10 fois plus intense que le signal détectable en ablation laser ICP-MS. Ces valeurs sont un peu plus basses que celles obtenues par l'utilisation de techniques similaires. En effet, Chery *et al.* ont rapporté une limite de détection de 70 ng Se g^{-1} gel pour l'ablation d'un spot (applicable à l'électrophorèse 2D) et 150 ng Se g^{-1} pour l'ablation avec translation (applicable à l'électrophorèse 1D) en utilisant un ICP-DRC-MS (257). Chassaing *et al.* ont également rapporté une limite de détection de 40 pg Se par bande pour 1-D PAGE (par ETV-ICP-MS (268) et 0.5 pg de Se par cratère ou 70 ng Se g^{-1} gel par 2-D PAGE-LA-ICP-MS (312).

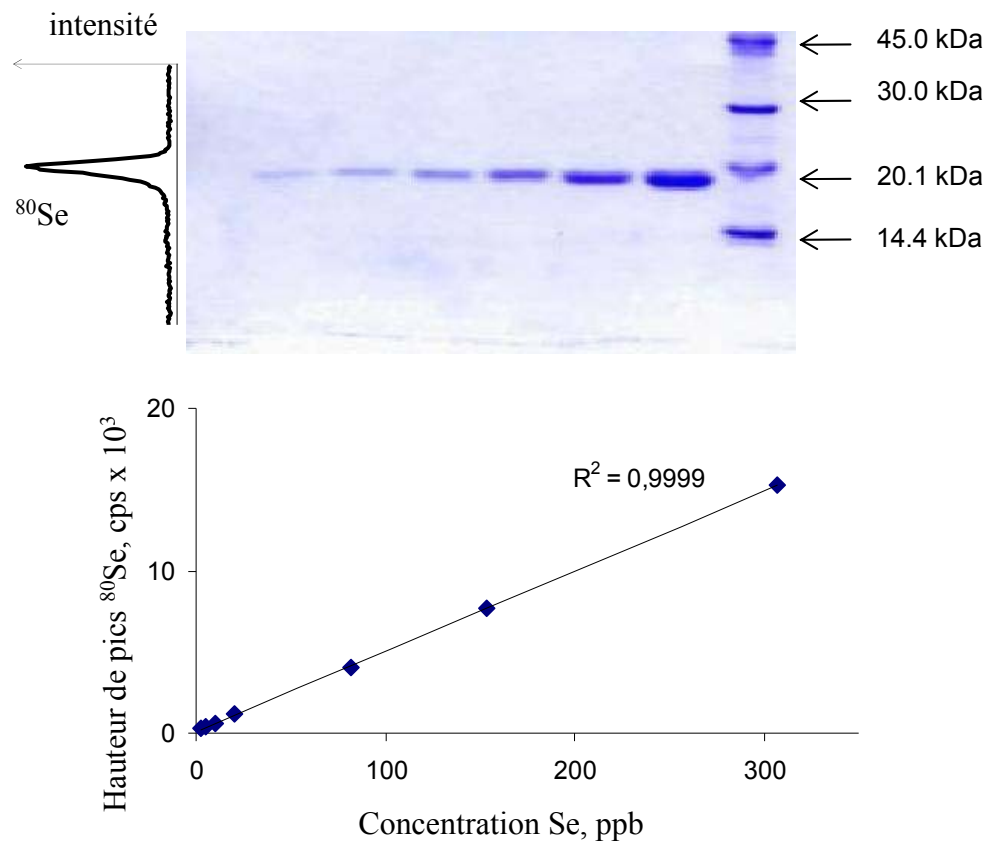


Figure 40 : Droite d'étalonnage d'une protéine sélénée sur gel par LA-ICP-MS

Des concentrations de SeMet-CaM couvrant une gamme de concentration en sélénium de 2,5 à 640 ng.mL^{-1} ont été déposées pour une analyse en 1D-SDS-PAGE. Après coloration au bleu de Coomassie, les pistes de gel ont été analysées en LA-ICP-MS. Une droite d'étalonnage a été obtenue en faisant correspondre l'intensité mesurée en ^{80}Se en fonction de la concentration en sélénium déposée (ng.mL^{-1}).

2.2. Applications sur les sélénoprotéines

2.2.1. Détection du sélénium de la thiorédoxine réductase après électrophorèse sur gel

L'analyse SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de Coomassie a été effectuée avec 5 µg de thiorédoxine réductase, une quantité importante bien que seulement 50% ait été rapporté actif et donc sélénié. Une bande protéique étalée aux environs de 55 kDa est observée sur le gel. Le balayage du gel par un mouvement de translation avec un laser UV à impulsions nanosecondes couplé à une détection en ICP-MS du sélénium a permis de détecter du sélénium uniquement dans cette bande (Figure 41). L'intensité du signal est relativement peu importante par rapport à la quantité de protéines déposée sur gel. Les sélénoprotéines ne possèdent en général qu'un résidu sélénié dans leur séquence ce qui contraste avec la calmoduline séléniée qui en possède huit et est de ce fait un étalon sélénié de choix. Ce résultat montre d'ores et déjà la difficulté à laquelle nous sommes confrontés lors de l'analyse de sélénoprotéines dont le taux d'expression *in vivo* est généralement beaucoup plus faible.

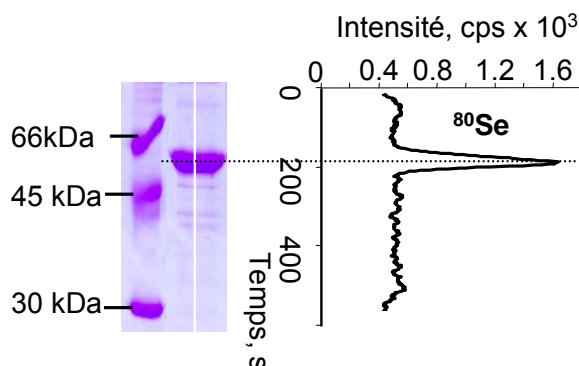


Figure 41 : Analyse de la sélénoprotéine thiorédoxine réductase par ICP-MS à ablation laser après électrophorèse sur gel.

5 µg de thiorédoxine réductase ont été déposés pour une analyse en 1D-SDS-PAGE. Après coloration au bleu de Coomassie, la piste de gel a été analysée en LA-ICP-MS avec détection du ^{80}Se .

2.2.2. Détection du sélénium de la glutathion peroxydase après électrophorèse sur gel

La Figure 42 a présente un chromatogramme en exclusion stérique (SEC₂₀₀) couplée avec une détection du sélénium par ICP-MS. Un pic sélénié majoritaire (94% des composés séléniés élués) est élué entre 17 et 81 kDa correspondant soit au monomère de GPx (21 kDa), soit aux formes di ou trimériques (respectivement 42 et 64 kDa). Deux espèces séléniées très minoritaires, pouvant correspondre à un acide aminé sélénié et à du sélénium inorganique sont également observées. Ce résultat est en accord avec les résultats observés en spectrométries de masse à ionisation MALDI et ESI qui révélaient la présence d'un composé majoritaire à 21 513 Da. Ce résultat est également conforté par l'analyse du sélénium dans le même échantillon en ablation laser ICP-MS après SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie (Figure

41 b). Le profil en sélénium obtenu montre une seule bande protéique sélénée autour de 22 kDa dans la piste du gel. La reproductibilité de la détection en ablation laser ICP-MS sur gel a été estimée par une série de 5 analyses successives (Figure 42 b). L'écart type relatif calculé (RSD) de 1.9 % en aire de pics et 3.8 % en hauteur de pics témoigne d'une analyse très reproductible (< 5%) avec le système utilisé.

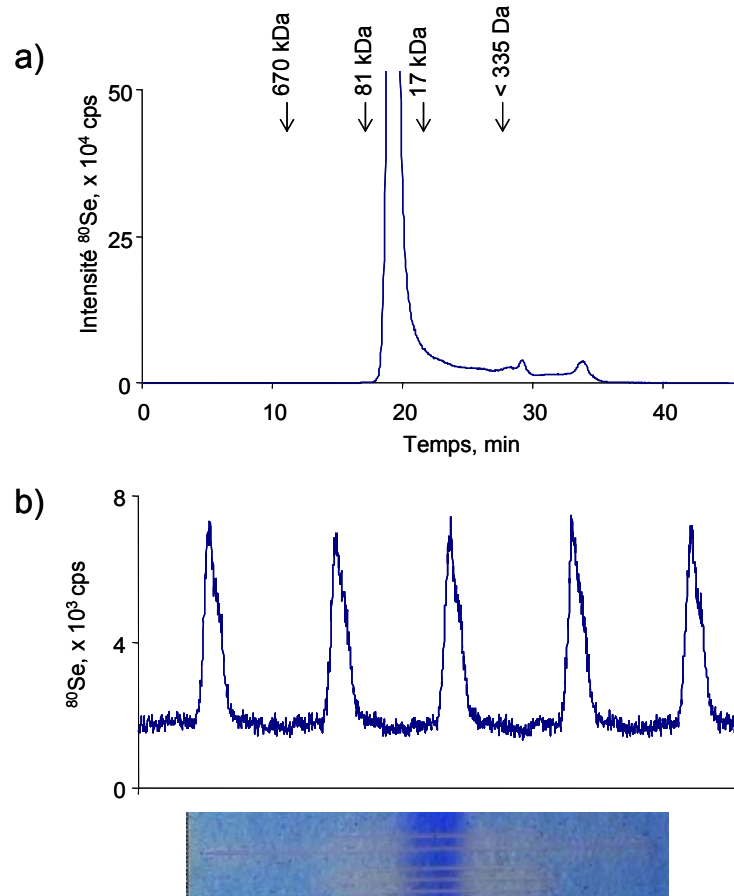


Figure 42 : Analyse du contenu sélénié de la glutathion peroxydase.

(a) Analyse en SEC-ICP-MS de l'échantillon de glutathion peroxydase. Les marqueurs de taille moléculaire utilisés sont indiqués.

(b) Photographie du gel 1D-SDS-PAGE du même échantillon avec coloration au bleu de Coomassie des protéines et analyse (5 répliqués) en ablation laser ICP-MS.

2.3. Etude de l'incorporation non spécifique du sélénium dans les protéines : l'exemple de *Cupriavidus metallidurans* CH34

Un exemple d'incorporation non spécifique du sélénium est donné ici. Ce travail a été effectué en collaboration avec les Drs B. Gouget et L. Avoscan du Laboratoire Pierre Süe CEA/CNRS (Saclay). *Cupriavidus metallidurans* CH34 est une bactérie résistante aux oxyanions sélénite et séléniate. L'étude de cette résistance en terme d'accumulation, de localisation et de transformation du sélénium a été réalisée au cours des travaux de thèse du Dr Avoscan (273). Avoscan *et al.* ont montré que *C. metallidurans* CH34 transforme les espèces sélénite et séléniate majoritairement en sélénométhionine (328). Afin de déterminer si la bactérie incorpore ensuite aléatoirement ou spécifiquement le sélénium dans ces protéines, une séparation d'extraits protéiques bruts a été effectuée en SDS-PAGE à partir de différentes conditions de culture de la bactérie. Mon travail dans cette étude a consisté à analyser par ICP-MS à ablation laser nanoseconde avec un balayage monodimensionnel le contenu en protéines sélénées d'extraits de *C. metallidurans* CH34. La préparation des échantillons a été effectuée comme décrit par Avoscan (273). Les résultats obtenus montrent clairement que le sélénium est incorporé tant dans des protéines membranaires que dans des protéines cytosoliques de *C. metallidurans* CH34 exposée à plusieurs mM de sélénite ou séléniate (Figure 43). Un préfractionnement des protéines par chromatographie dans un premier temps avant séparation sur SDS-PAGE permettrait de savoir si toutes les protéines incorporent le sélénium ou si certaines l'incorporent de façon plus spécifique. Ces expériences ont été réalisées avec des bactéries exposées à une concentration de sélénium de 2 mM. Cette concentration semble conduire à une incorporation non spécifique du sélénium dans les protéines. Il serait intéressant de reproduire ces expériences à des concentrations plus faibles (du μM au nM) afin de rechercher une éventuelle variation de la distribution des protéines sélénées.

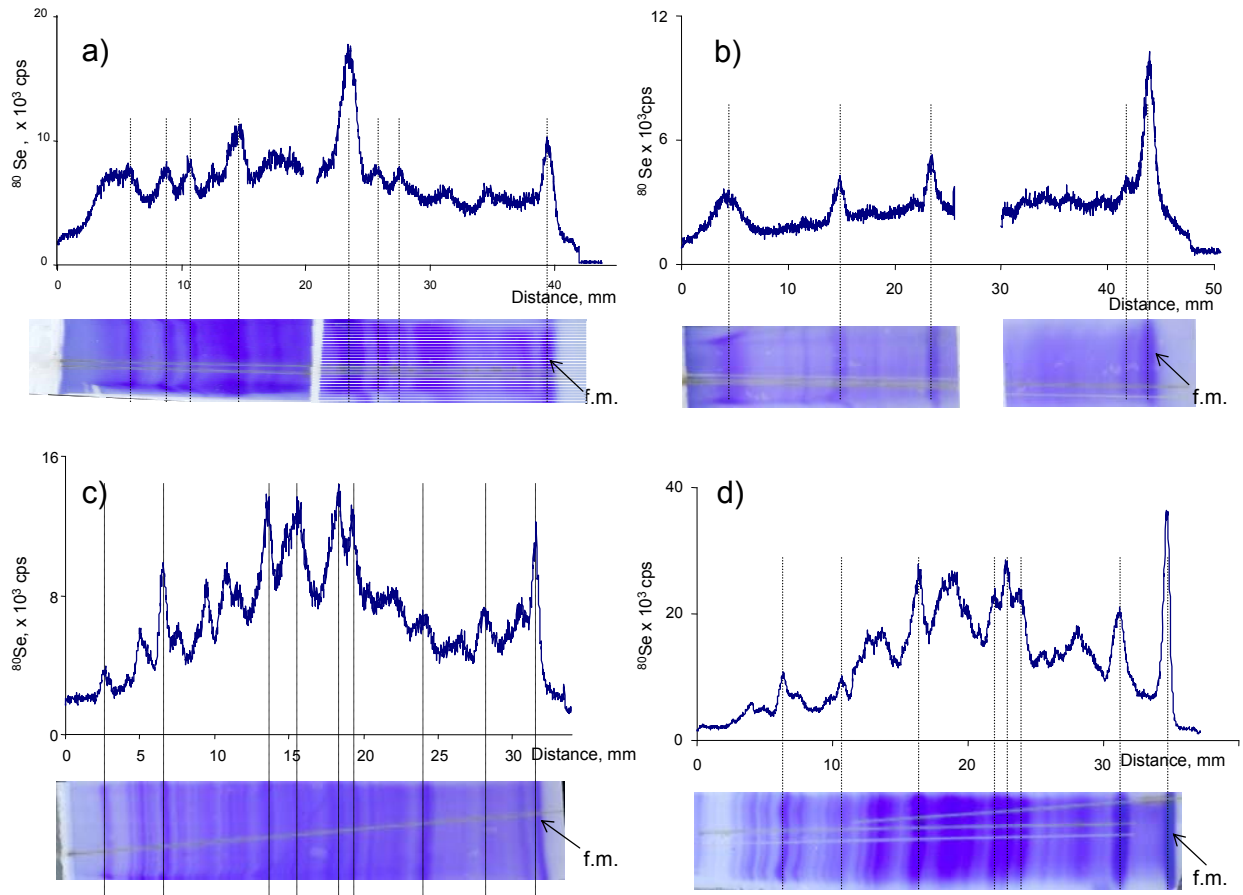


Figure 43 : Analyses du sélénium protéique chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 par ablation laser ICP-MS sur gel.

Les électrophorèses sur gel ont été réalisées avec différents types d'extraits cellulaires :

- a) Extraits membranaires d'une culture exposée au séléniate lors de la phase stationnaire
- b) Extraits membranaires d'une culture exposée au sélénite lors de la phase stationnaire
- c) Extraits solubles d'une culture exposée au sélénite lors de la phase stationnaire
- d) Extraits solubles d'une culture exposée au sélénite en fin de phase exponentielle de croissance

f.m. : front de migration.

2.4. Détection de sélénoprotéines dans des échantillons protéiques bruts après électrophorèse sur gel : l'exemple de la sélénoprotéine formiate déhydrogénase chez *E. coli*

La bactérie *E. coli* synthétise la sélénoprotéine formiate déhydrogénase H pour dégrader le formiate en CO₂ et ceci uniquement en conditions fermentatives. Afin de s'assurer que les cultures d'*E. coli* effectuées sur glucose expriment la sélénoprotéine formiate déhydrogénase, nous avons effectué un test révélant la présence de l'enzyme FDH par addition de benzylviologène et de formiate à la culture cellulaire comme décrit par Axley *et al* (91). Ce test colorimétrique permet de révéler la présence de l'enzyme dans une culture par transformation du substrat benzylviologène oxydé et non coloré en benzylviologène réduit et coloré comme montré en Figure 44. Ce simple test nous a permis de vérifier que les conditions de culture que nous utilisons permettaient l'expression de la sélénoprotéine formiate déhydrogénase.



Figure 44 : Test colorimétrique de la présence de la sélénoprotéine formiate déhydrogénase H dans une culture bactérienne.

a) cuve de gauche : aspect clair témoignant d'une culture d'*E. coli* ne contenant pas de formiate déhydrogénase, b) cuve de droite : coloration violette caractéristique d'une culture d'*E. coli* contenant la sélénoprotéine formiate déhydrogénase responsable de la coloration.

Un extrait brut d'une de ces cultures d'*E. coli* MC4100 pFM20 cultivée sur glucose en conditions anoxiques a été analysé en électrophorèse sur gel en présence de SDS. Les essais de détection ICP-MS du sélénium protéique par balayage monodimensionnel du gel avec un laser nanoseconde n'ont pas permis de mettre en évidence de protéines contenant du sélénium dans la région de poids moléculaire attendu. La formiate déhydrogénase n'a pas pu être repérée dans cet extrait par la méthode développée en raison du faible taux d'expression des sélénoprotéines *in vivo* et donc d'un manque de sensibilité. Le paragraphe suivant présente une nouvelle technique de détection des sélénoprotéines sur gel par ablation laser ICP-MS.

3 : Développement de l'ablation laser ICP-MS pour une détection sensible de sélénoprotéines après électrophorèse sur gel.

Les méthodes de détection de sélénoprotéines par balayage d'un gel en ablation laser ICP-MS utilisent des faisceaux lasers d'un diamètre de 100 à 150 μm envoyées sous forme d'impulsions de quelques nanosecondes. Ainsi, seulement 1% d'une bande protéique de 10 à 15 mm est utilisée pour l'analyse. En ICP-MS à ablation laser, l'échantillonnage par ablation laser peut être optimisée séparément de la détection ICP-MS. Ceci représente un réel avantage car l'intensité du signal généré est dépendante de la quantité de masse ablatée. Par conséquent, plus grande est la quantité de matière apportée au plasma dans l'échelle de temps d'une acquisition ICP-MS et plus importante sera l'intensité du signal détecté. L'objectif de mon travail a été d'améliorer la sensibilité de détection en utilisant un balayage latéral ultrarapide ($280 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$) d'un faisceau laser pulsé avec une très haute cadence de tirs (10 kHz). Pour ce faire, un dispositif laser ALFAMET développé récemment au laboratoire a été utilisé (302). Ce chapitre présente les résultats obtenus avec ce dispositif en terme de performances analytiques et d'applications biologiques.

3.1. Ablation par balayage bi-dimensionnel à haute cadence de tirs et acquisition du signal

La quantité de matériel ablatée et ainsi la sensibilité de la détection est directement dépendante de la taille du spot laser et de la fluence définie comme l'énergie du laser par unité de surface (295). Le principal problème rencontré est dû à la faible énergie délivrée par un laser et la nécessité d'un faisceau suffisamment étroit pour assurer une fluence au dessus du seuil d'ablation. L'utilisation d'un tel faisceau résulte toutefois en une faible quantité de matériel ablatée. Dans notre cas, les ablations sont produites par un faisceau laser de 20 μm de diamètre à 39 μJ par pulse (à la surface de l'échantillon) ce qui correspond à une fluence de $13 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Dans le but d'augmenter la quantité de matériel ablatée, le faisceau laser est déplacé rapidement parallèlement à la bande protéique (jusqu'à 100 mm s^{-1} avec une précision de positionnement de 1 μm selon l'axe appelé y) alors que le gel avance dans la direction perpendiculaire (notée comme x) à une vitesse environ 2000 fois plus lente. Un balayage bi-dimensionnel du gel en forme de Z est obtenu. Ce balayage 2D est délimité par la largeur de la ligne dans la direction y , fixée ici à 2 mm et la longueur de la piste du gel dans la direction x comme montré schématiquement en Figure 45. Les cratères de 20 μm se chevauchent partiellement (40 % dans l'axe y et 87 % dans l'axe x) ce qui permet l'ablation de la totalité de la surface balayée. La combinaison du mouvement du faisceau ($v_y = 10 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), du mouvement du gel ($v_x = 50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), et de la haute cadence de tir (fréquence = 10 kHz) permet l'ablation d'une zone large à la profondeur désirée. Pour ablater une ligne large par exemple de 2 mm, un

mouvement du laser d'un coté à l'autre de la ligne prend environ 20 ms (200 tirs). Ainsi, à l'échelle du temps de séjour typique dans le spectromètre de masse (100 ms), le laser effectuera 1000 tirs avec 5 mouvements aller retour. Durant ce temps, le gel avance de 5 μm ce qui résulte en une aire ablatée de 0.01 mm^2 . Cette aire est environ 100 fois plus grande que le balayage effectué lors de l'ablation monodimensionnelle du gel avec un laser classique utilisant le même diamètre de faisceau de 20 μm (Figure 45). L'ablation de matériel d'une aire d'environ 0.01 mm^2 correspond à un seul événement de mesure perçu par le spectromètre de masse. En d'autres termes, la haute fréquence de tir du laser combinée à un balayage rapide bidimensionnel est un moyen efficace pour ablater quasi simultanément, à l'échelle de temps de détection du spectromètre de masse, une aire d'échantillon beaucoup plus grande que lors d'un balayage monodimensionnel conventionnel. Il est important de noter qu'en raison de la distribution gaussienne en énergie du faisceau, l'intensité de l'ablation au milieu du cratère est différente de celle au bord du cratère. Cependant, les tirs sont spatialement proches et en raison de leur chevauchement une ablation homogène de la surface est obtenue. L'effet de ce mode de balayage bidimensionnel sur la sensibilité de détection est ici étudié en détails.

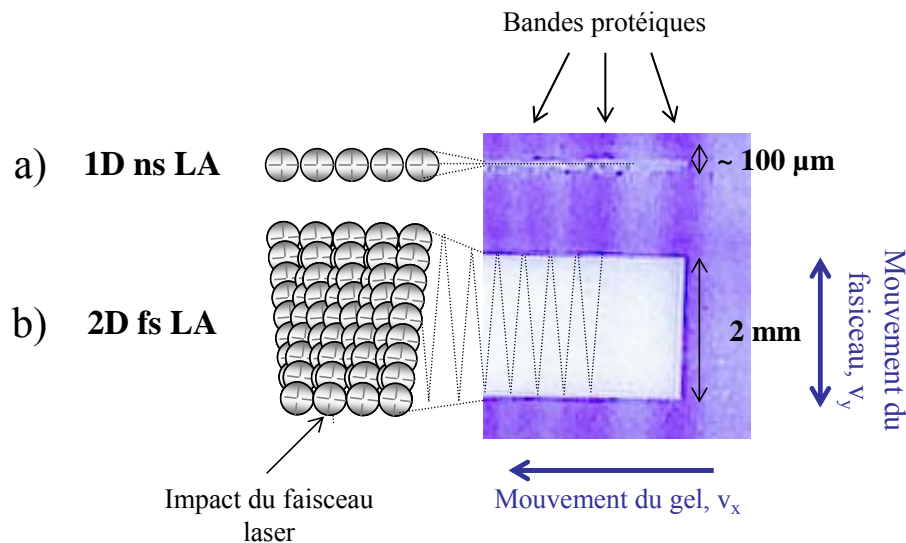


Figure 45 : Principe des ablations laser par balayage 1D avec une faible cadence de tirs et par balayage 2D avec une haute cadence de tirs

- a) Mode d'ablation conventionnel par balayage monodimensionnel avec un laser à impulsion nanoseconde (1D ns LA).
 b) Mode d'ablation par balayage bidimensionnel ultrarapide avec un laser à impulsion femtoseconde (2D fs LA).

3.2. Effet de l'ablation laser par balayage bi-dimensionnel à haute cadence de tirs sur la réponse ICP-MS

3.2.1. Reproductibilité de la détection ICP-MS

La Figure 46 montre un exemple d'analyses successives du sélénium par 2D fs LA-ICP-MS d'une bande de GPx. Dans cette expérience, une bande d'environ 8 cm de large a été coupée en 5 morceaux de 16 mm lesquels sont introduits un à un dans la chambre d'ablation puis analysés. L'écart type relatif a été estimée à 4.0 % et 4.1% en modes aire et hauteur de pics respectivement. Ces valeurs sont similaires à celles obtenues lors de l'ablation 1D ns LA-ICP-MS, 3.9 % et 3.8 % en modes aire et hauteur de pics respectivement (Figure 42 b). Il doit cependant être souligné qu'en raison d'une largeur d'ablation plus étroite, les 5 mesures effectuées en 1D ns LA-ICP-MS ont pu être effectuées sur le même morceau de gel sans le sortir de la chambre d'ablation, ce qui a pour conséquence de moins altérer les conditions d'ablation.

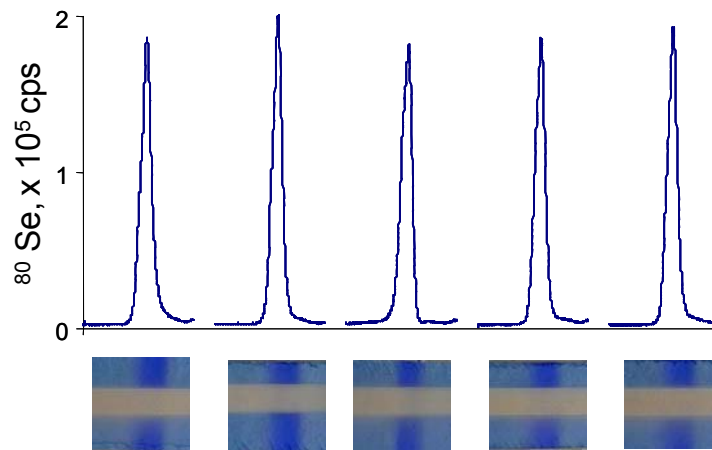


Figure 46 : Estimation de la reproductibilité de l'ablation laser 2D fs couplée à une détection du sélénium en ICP-MS.

La bande de GPx obtenue a une longueur de 8 cm et est homogène sur sa longueur. Elle a été découpée en 5 morceaux analysés un à un par 2D fs LA-ICP-MS. Les pics correspondent aux analyses individuelles de chacun d'entre eux.

3.2.2. Profondeur d'ablation

Les Figure 47 a et b montrent l'effet d'ablations répétitives avec une ablation de 2 mm (fs laser) et de 120 μm (ns laser), respectivement. Dans les 2 cas, trois ablations successives ont été nécessaires pour enlever entièrement la protéine du gel. Le signal relativement constant du cuivre (supposé être distribué de façon homogène dans le gel) indique que la protéine est plutôt concentrée à la surface car le bas du gel n'est pas atteint après la 4^{ème} ablation.

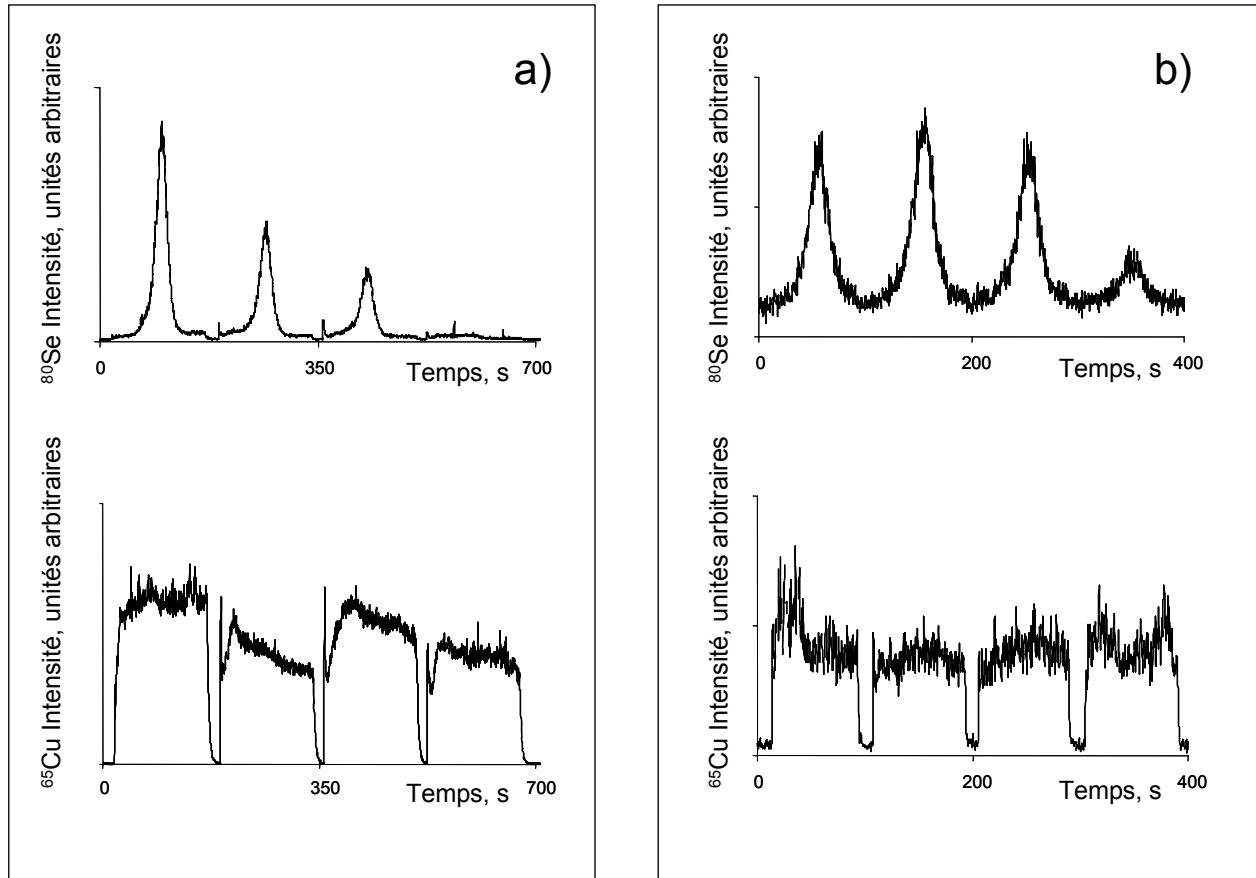


Figure 47 : Analyses des sélénoprotéines en profondeur dans le gel de polyacrylamide par ablations laser successives couplées à une détection ICP-MS.

(a) Balayage 2D du gel avec un laser fs à haute cadence de tirs couplée à une détection du ^{80}Se (graphe du haut) et à une détection du ^{65}Cu (graphe du bas).

(b) Balayage 1D du gel avec un laser ns à basse fréquence de tirs couplée à une détection du ^{80}Se (graphe du haut) et à une détection du ^{65}Cu (graphe du bas).

La même bande protéique a été balayée 4 fois aux mêmes coordonnées pour une analyse en profondeur du gel.

La Figure 48 présente la topographie des ablations effectuées et montre que l'efficacité de l'ablation en profondeur dans le gel avec les laser ns UV et fs IR sont relativement similaires ce qui est en accord avec les observations faites plus tôt sur d'autres matrices (329). Cependant, la section du gel ablaté vue en coupe transversale est rectangulaire dans le cas du balayage femtoseconde et triangulaire dans le cas du balayage nanoseconde ce qui résulte en un volume de matière ablatée plus important pour une surface équivalente (Figure 48). La surface ablatée est environ 16 fois plus large pour le balayage 1D fs IR que pour le balayage 2D ns UV. En tenant compte de la vitesse d'ablation selon l'axe x pour les 2 lasers, le volume ablaté par unité de temps est de $2.64 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ pour le laser ns UV et $71,5 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ pour le laser fs IR, ce qui représente un gain d'un facteur 27 en volume ablaté par unité de temps. L'utilisation d'un laser nanoseconde ultrarapide dans les mêmes conditions de balayage 2D devrait aboutir à un volume ablaté par unité de temps comparable à celui obtenu ici avec le laser femtoseconde. Des systèmes d'ablation laser utilisant des lasers à excimère permettent déjà d'effectuer des ablations de 1 mm de large comme récemment décrit par Woodhead *et al* (330).

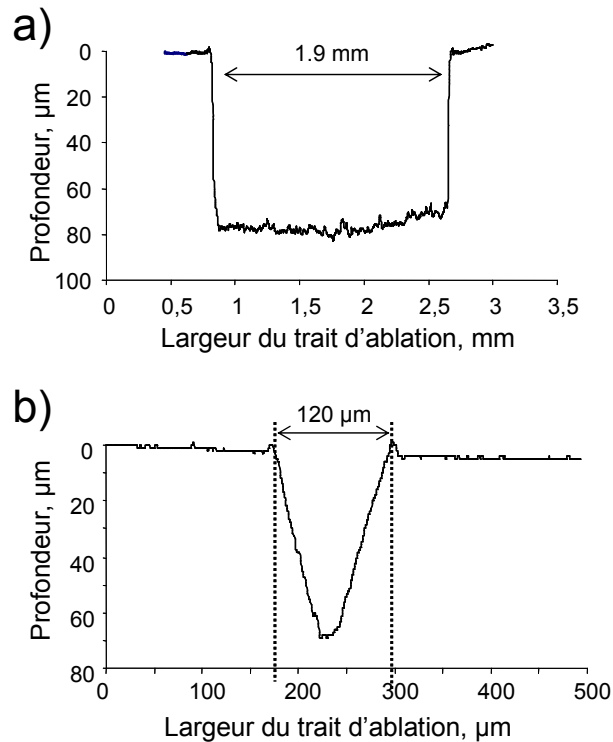


Figure 48 : Topographie des ablations par analyse de rugosimétrie

(a) Ablation par balayage 2D avec un laser fs à haute cadence de tirs

(b) Ablation par balayage 1D avec un laser ns à faible cadence de tirs

Les profils d'ablation ont été définis en rugosimétrie après un seul balayage du gel par le laser.

Le système d'ablation bidimensionnel ultrarapide avec un laser fs à haute cadence de tirs utilisé dans cette étude peut augmenter la profondeur d'ablation en délimitant une ligne d'ablation plus fine ce qui augmente la fréquence de passage du faisceau laser dans la zone balayée. Lorsqu'une ligne de 1 mm est ablatée, deux passages successifs du laser sont suffisants pour enlever toute la protéine du gel contrairement à 3 passages comme observé ici avec une ligne de 2 mm.

3.2.3. Gamme de linéarité et sensibilité de la détection en ICP-MS

Dans le but d'établir une courbe d'étalonnage, différents volumes d'une solution de GPx ont été soumis à une électrophorèse sur gel de type 1D-SDS-PAGE. Les quantités déposées couvrent la gamme de 5 à 80 pg de Se normalisés à la longueur de la bande en mm, en supposant que tout le sélénium dans la solution analysée est présent dans la GPx et est trouvé dans la bande protéique après l'électrophorèse sur gel. Les électrophérogrammes séléniés acquis par 1D ns LA-ICP-MS et 2D fs LA-ICP-MS pour les bandes les moins et les plus concentrées en GPx sont montrés en Figure 49 a et b, respectivement. La quantité la plus basse n'est pas détectable par coloration au bleu de Coomassie (encart de Figure 49 c) et seules les 2 concentrations les plus hautes produisent un signal détectable en 1D ns LA-ICP-MS. Le 2D fs LA-ICP-MS permet la détection spécifique de sélénium dans des bandes protéiques non détectées en coloration au bleu de Coomassie. La courbe d'étalonnage obtenue est linéaire et passe par l'origine (Figure 49 c).

Les données en Figure 49 montre un gain en sensibilité supérieur à un facteur 40 avec la procédure 2D fs LA-ICP-MS en comparaison avec la détection 1D ns LA-ICP-MS effectuée dans des conditions similaires à celles décrites ailleurs dans la littérature. Un tel gain en sensibilité ne peut pas seulement s'expliquer par une quantité de matière ablatée plus importante. Un autre facteur impliqué dans cette augmentation en sensibilité est certainement la fraction réduite de grosses particules dans l'aérosol. Une étude a montré que l'ablation laser nanoseconde produit des particules plus larges que celles observées avec un laser femtoseconde lors de l'analyse de polymères (331). Les particules plus grosses sont plus facilement perdues lors du transport de l'aérosol et si elles atteignent l'ICP elles ne sont qu'en partie évaporées. Les particules plus petites sont au contraire plus facilement digérées dans le plasma ce qui doit améliorer la sensibilité de mesure. Une étude détaillée de l'aérosol éjecté du gel est nécessaire pour comprendre l'effet de la distribution en taille des particules sur le gain en sensibilité observé.

Les bruits de fond enregistrés durant les balayages avec le laser fs IR et le laser ns UV sont similaires (Figure 49 a). Une comparaison *sensu stricto* de la stabilité du signal entre les impulsions femtoseconde et nanoseconde n'est toutefois pas possible. La quantité de matériel introduite dans le plasma est 27 fois plus grande en ablation laser femtoseconde ce qui doit certainement modifier les conditions de plasma. Il doit cependant être souligné que la très grande quantité de particules produites avec le laser fs IR n'engendre pas une instabilité du signal plus grande que celle observée avec le laser ns UV.

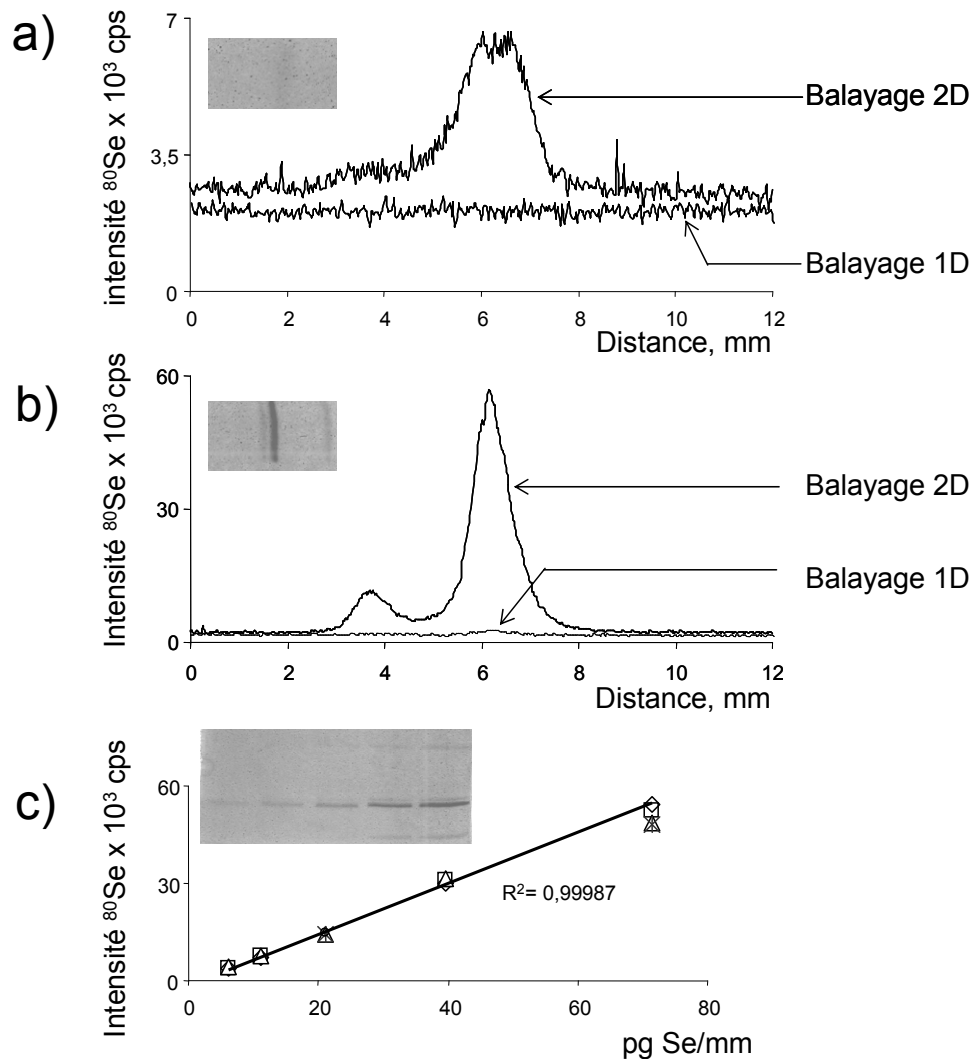


Figure 49 : Sensibilité et linéarité de la détection par ablation laser femtoseconde ICP-MS avec un balayage 2D à haute fréquence de tirs et comparaison à la détection par ablation laser nanoseconde ICP-MS avec un balayage 1D à faible fréquence de tirs.

Des quantités en GPx couvrant la gamme de 5 à 80 pg de Se par mm de bande ont été déposées pour une analyse 1D-SDS-PAGE. Les photographies des gels analysés sont montrées dans les encarts
 a) Comparaison des 2 modes d'ablation pour la détection en ICP-MS de la plus faible quantité en Se
 b) Comparaison des 2 modes d'ablation pour la détection en ICP-MS de la quantité la plus élevée en Se
 c) Droite d'étalonnage (5 répliquats sont effectués pour chaque quantité en Se analysée).

3.3. Détection de protéines contenant du sélénium à partir de cellules en culture

3.3.1. Détection de protéines sélénées après incorporation non spécifique du sélénium : l'exemple d'*E. coli*

De la même façon que *Cupriavidus metallidurans* CH34 peut incorporer de façon non spécifique du sélénium dans ses protéines, nous avons évalué la capacité de la bactérie *Escherichia coli* à incorporer du sélénium dans ses protéines à partir de différentes sources de sélénium, sélénite ou sélénométhionine. La recherche de sélénium protéique dans les extraits brut de protéines par ICP-MS à ablation laser femtoseconde suggère une incorporation aléatoire du sélénium dans les protéines quelle que soit la source de sélénium employée (Figure 50). Comme observé pour *Cupriavidus metallidurans* CH34, la bactérie *E. coli* incorpore de façon non spécifique le sélénium dans ses protéines en présence d'importantes quantités de sélénium sous forme de sélénite ou de sélénométhionine.

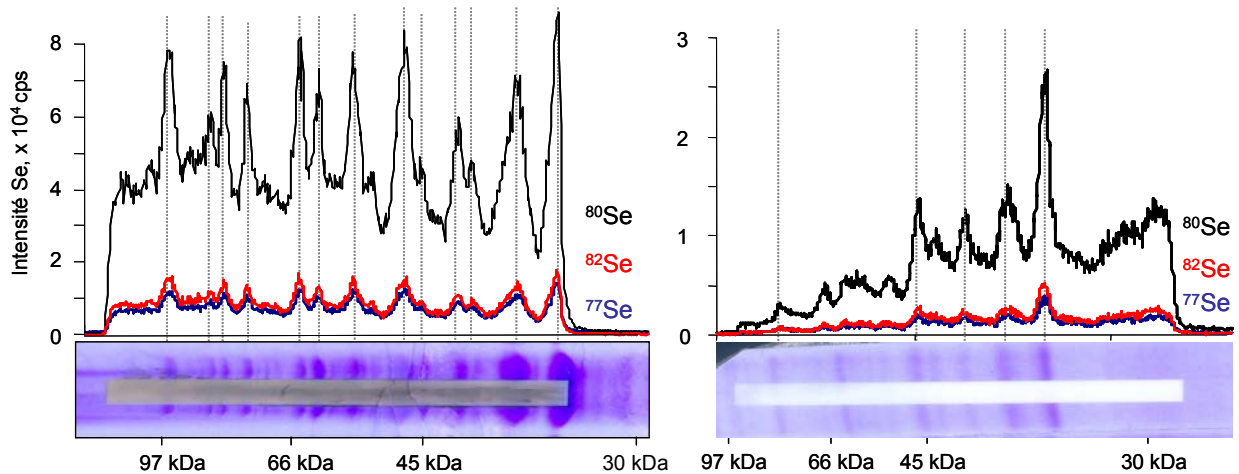


Figure 50 : Etude de l'incorporation non spécifique du sélénium dans les protéines d'*Escherichia coli* MG1655 par 2D fs LA-ICP-MS

Les cultures ont été faites sur la nuit dans du milieu M9 contenant soit 50 μM de sélénite de sodium soit 200 μM de sélénométhionine. Les protéines ont été précipitées au TCA puis lavées à l'acétone avant 1D-SDS-PAGE. Les gels 1D-SDS-PAGE ont été réalisés avec des extraits protéiques d'*E. coli* MG1655 cultivée en présence de 200 μM de sélénométhionine (à gauche) ou en présence de 50 μM de sélénite de sodium (à droite).

3.3.2. Détection de sélénoprotéines à partir de cellules en culture

La méthode de balayage 2D par ablation laser fs couplée à la détection ICP-MS a été appliquée à l'analyse de sélénoprotéines dans les cas où la détection ns LA ICP-MS par balayage 1D a échoué. Les exemples présentés ici incluent le contrôle de l'expression de la sélénoprotéine formiate déhydrogénase chez *Escherichia coli* et la détection de sélénoprotéines chez *Desulfococcus multivorans*.

3.3.2.1. Contrôle de l'expression de la formiate déhydrogénase chez *E. coli*

L'extrait protéique d'une culture d'*E. coli* MC4100 pFM20 cultivée sur formiate en conditions anoxiques a été fractionné par chromatographie d'exclusion stérique. En plus du sélénium, le molybdène et le fer ont été contrôlés comme la formiate déhydrogénase (FDH) est connue pour contenir ces éléments. Le chromatogramme SEC-ICP-MS (Figure 51 a, panneau du haut) obtenu sous conditions non dénaturantes présente un certain nombre de composés séléniés. Les trois fractions les plus intenses (F1, F2 et F3) ont été lyophilisées puis analysées en SDS-PAGE. Les images des gels colorés au bleu de Coomassie sont montrées en Figure 51 b. Malheureusement, des essais de détection ICP-MS du sélénium protéique par balayage 1D du gel avec un laser nanoseconde ont échoué comme le montre la Figure 51 c. Des balayages 2D par ablation laser du gel avec une détection du sélénium en ICP-MS ont par contre permis de repérer une protéine séléniée aux environs de 80 kDa dans les fractions séléniées les plus intenses de chromatographie d'exclusion stérique (Figure 51 d). La considérable quantité de sélénium exclue de la colonne n'est pas retrouvée sur le SDS-PAGE ce qui indique que la plupart du sélénium contenu dans la fraction F1 n'est pas lié de façon covalente aux protéines mais plutôt complexé de façon non spécifique aux composés de hauts poids moléculaires. Aucun autre élément trace n'a pu être détecté sur le gel en raison des conditions dénaturantes du SDS-PAGE. Ce type d'approche analytique apparaît intéressante pour distinguer le sélénium covalent du sélénium complexé aux protéines dans les échantillons biologiques.

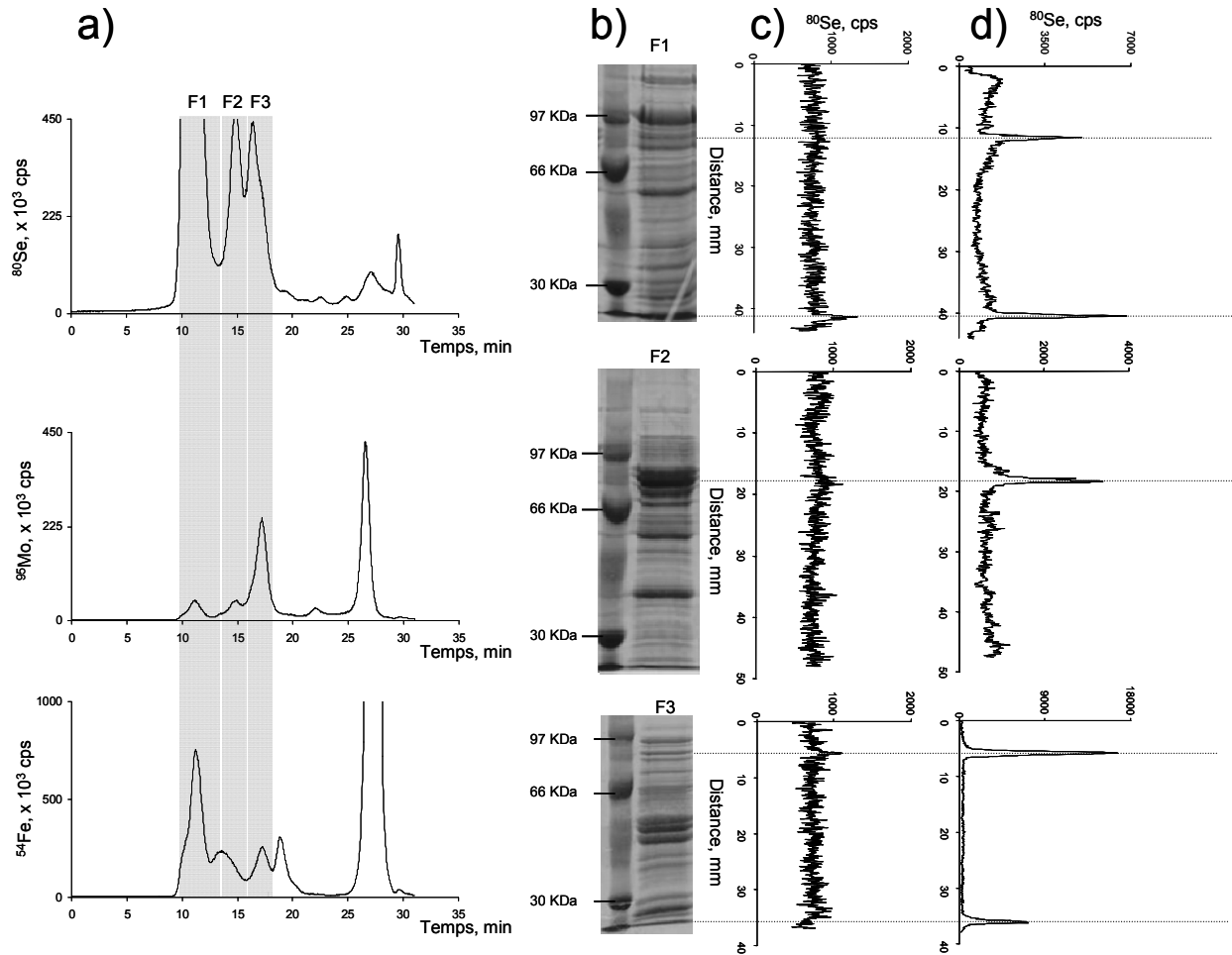


Figure 51 : Détection sur gel de la sélénoprotéine formiate déhydrogénase exprimée chez *E. coli*.

(a) Chromatogrammes d'exclusion stérique (SEC₂₀₀)-ICP-MS : panneau du haut : détection du ^{80}Se ; panneau du milieu : détection du ^{95}Mo ; panneau du bas : détection du ^{54}Fe . Les fractions collectées sont grisées. Les protéines ont été éluées avec une phase mobile de 10 mM d'acétate d'ammonium, pH 7.5 à un débit de $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. L'élution de composés contenant du ^{54}Fe , ^{78}Se , ^{80}Se , ^{92}Mo , et du ^{95}Mo a été contrôlée en ICP-MS. Les fractions contenant du sélénium ont été lyophilisées puis solubilisées dans 200 μL de 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 préalablement dégazé par du N_2/CO_2 (en rapport 9/1 (v/v)) ;

(b) Photographies des 1D-SDS-PAGE après coloration au bleu de Coomassie : panneau du haut, fraction 1; panneau du milieu, fraction 2; panneau du bas, fraction 3 ;

(c) Balayage 1D ns LA-ICP-MS des gels correspondants ;

(d) Balayage 2D fs LA-ICP-MS des gels correspondants.

3.3.2.2. Détection de sélénoprotéines chez *Desulfococcus multivorans*.

La bactérie sulfato-réductrice *D. multivorans* utilise différents composés aromatiques, comme le benzoate, comme seule source de carbone et d'énergie. Le sélénium est alors essentiel pour la croissance de la bactérie sur benzoate.

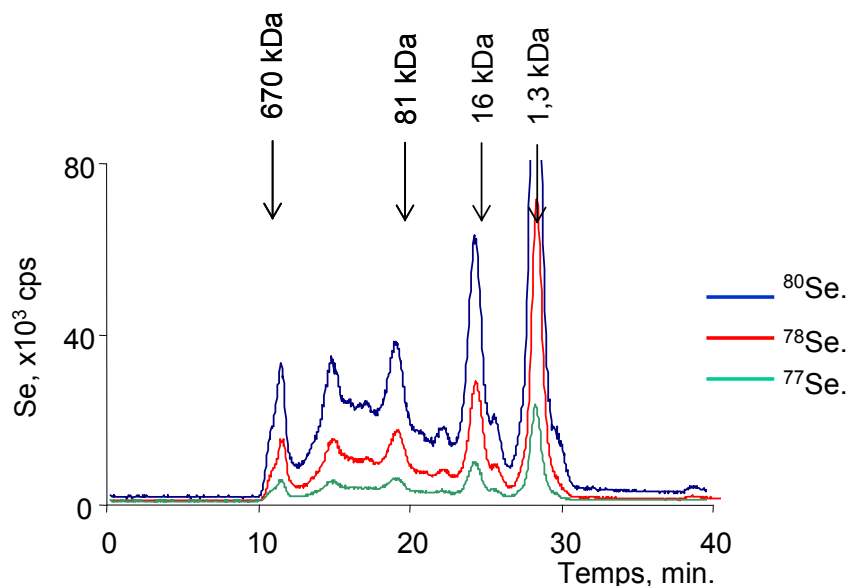


Figure 52 : Analyse du sélénium chez *Desulfococcus multivorans* cultivée sur benzoate par chromatographie d'exclusion stérique (SEC₂₀₀) couplée à une détection ICP-MS.

Une analyse d'un extrait brut de protéines de *D. multivorans* cultivée sur benzoate par chromatographie d'exclusion stérique couplée à l'ICP-MS fait apparaître de nombreux pics sélénés sur une gamme de masse très étendue (Figure 52). La culture ayant été effectuée en présence d'une faible quantité de sélénium et d'un large excès de soufre, les molécules sélénées sont issues soit d'une incorporation spécifique du sélénium conduisant à la formation de sélénoprotéines, soit une liaison du sélénium avec des molécules sous forme de complexes non covalents. Seule une étude SDS-PAGE permet de s'affranchir des complexes non covalents pour se focaliser sur l'étude des sélénoprotéines avec un fort pouvoir de résolution. Cette étude SDS-PAGE a été réalisée par Boll *et al* combinée à une détection des sélénoprotéines en autoradiographie (160). Trois protéines marquées radioactivement avec des masses moléculaires approximatives de 100, 30 et 27 kDa ont été détectées en SDS-PAGE à partir d'extraits cellulaires cultivés sur benzoate en présence de ⁷⁵Se-selenite. Cette expérience a été réitérée dans ce travail en utilisant une détection ns et fs LA ICP-MS.

La Figure 53 montre un électrophérogramme obtenu pour un extrait de *D. multivorans* cultivé sur benzoate. Aucune protéine sélénée n'a pu être détectée par ns LA-ICP-MS, seul du sélénium dans le front de migration (molécules inférieures à 10 kDa) a été mis en évidence. Par contre, l'électrophérogramme obtenu par fs LA-ICP-MS présente quatre pics sélénés. Deux d'entre eux dans la région de 30 kDa correspondant certainement aux bandes de 27 et 30 kDa mises en évidence dans l'autoradiogramme. La paire de pics présente dans la région de 100 kDa doit correspondre à la bande à 100 kDa de l'autoradiogramme (Figure 53 d). La résolution de l'électrophérogramme obtenu en fs LA ICP-MS est apparemment meilleure permettant la distinction de 2 sélénoprotéines dans la région 100 kDa avec des poids moléculaires trop proches pour être distingués en autoradiographie.

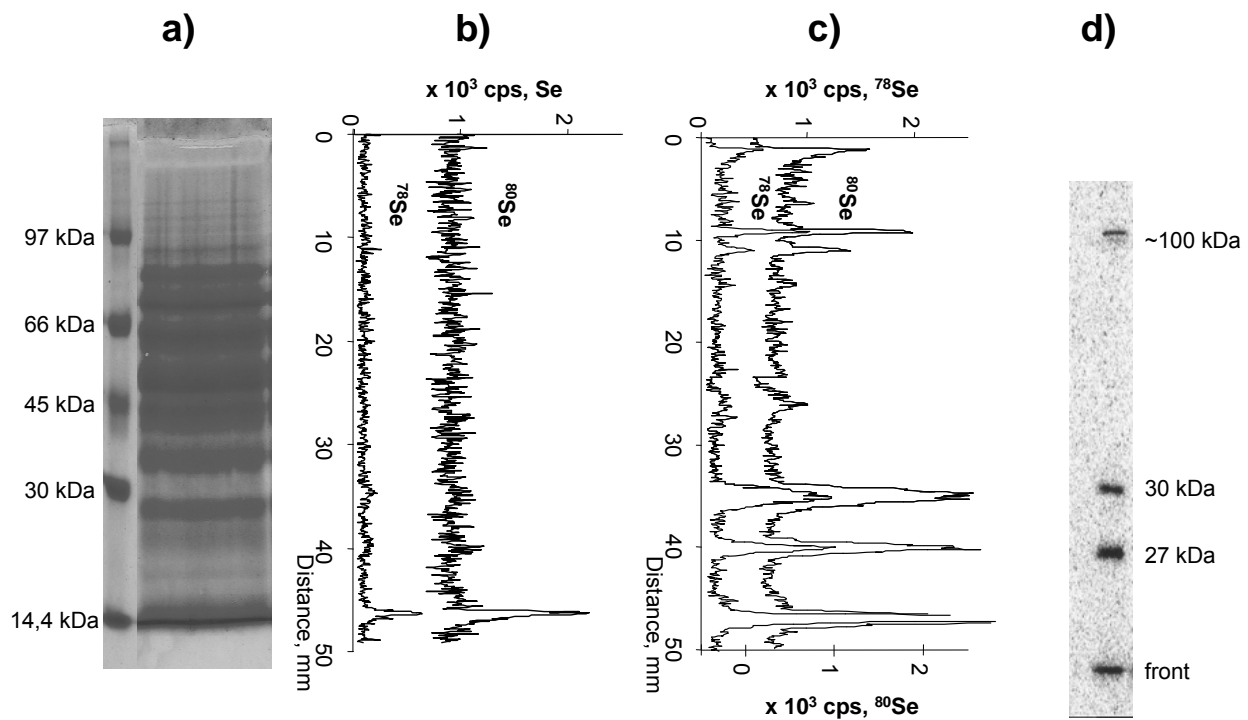


Figure 53 : Détection de sélénoprotéines de *Desulfococcus multivorans* DSM 2059 cultivée sur benzoate après électrophorèse sur gel.

- (a) Photographie du gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie;
 (b) Balayage 1D ns LA-ICP-MS pour la détection du ^{78}Se et du ^{80}Se ;
 (c) Balayage 2D fs LA-ICP-MS pour la détection du ^{78}Se et du ^{80}Se ;
 (d) Autoradiogramme obtenu ailleurs (160) avec une préparation d'échantillon similaire.

4 : Identification de sélénoprotéines dans des gels d'électrophorèse

L'identification d'une protéine en spectrométrie de masse nécessite la récupération de toute ou partie de la protéine. Notre tentative pour récupérer la calmoduline sélénée intacte du gel n'a pas aboutie. L'extraction efficace de protéines intactes du gel est difficile ; par contre, l'utilisation d'enzymes comme la trypsine pour fragmenter une protéine dans un gel est une procédure bien établie permettant une extraction efficace des peptides générés pour une analyse en spectrométrie de masse (194). Etant donné que le sélénium est lié de façon covalente à la protéine, il est présent dans la séquence de certains peptides tryptiques ce qui autorise leur détection spécifique pour une identification non équivoque des sélénoprotéines. Le chapitre suivant présente les stratégies employées pour l'identification des sélénoprotéines sur gel basées sur la recherche et l'identification des peptides sélénés.

4.1. Cartographie des peptides sélénés par spectrométrie de masse moléculaire à ionisation MALDI : l'exemple de la calmoduline sélénée

La Figure 54 présente un exemple de la procédure à utiliser pour rechercher des peptides sélénés en spectrométrie de masse à ionisation MALDI. Une électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide de l'étalon calmoduline sélénée suivie d'une étape de coloration au bleu de Coomassie a été réalisée (Figure 54 a, à gauche). La protéine sélénée est recherchée dans le gel par balayage 1D en ablation laser ICP-MS (Figure 54 a, à droite). Une digestion tryptique de la calmoduline sélénée repérée sur le gel est effectuée et le digestat est analysé en spectrométrie de masse à ionisation MALDI (Figure 54 b). Les peptides sélénés sont ensuite repérés dans le spectre MALDI-MS par recherche du profil isotopique du sélénium (Figure 54 c).

Comme observé dans le spectre de masse du digestat tryptique (Figure 54 b), les peptides sélénés dont on connaît la masse par digestion *in silico* (Figure 54 c) ne sont pas les peptides les plus intenses, et le profil isotopique caractéristique du sélénium est difficilement reconnaissable. Seule une recherche minutieuse aux gammes de masses appropriées permet la détection des peptides sélénés. Toutefois, la présence de certains peptides sélénés comme le peptide T4 dans le spectre de masse acquis n'est pas certaine en raison d'interférences isobariques aux masses recherchées. En considérant la quantité de protéines présentes dans le spot (1.34 µg), des limites de détection élevées sont obtenues en raison d'une ionisation de peptides contenant de la SeMet plus difficile que celles de peptides analogues soufrés, et de la présence d'autres pics multi-isotopiques interférents aux masses d'intérêt.

Sans la connaissance préalable de la séquence protéique, la recherche de peptides sélénés dans un spectre MALDI-MS semble très difficile. De plus, la plupart des protéines sélénées ou sélénoprotéines ne sont pas référencées dans les banques de données et de ce fait ne peuvent pas être retrouvées par empreinte peptidique avec soumission des masses du spectre aux banques de données. Il faut noter qu'aucun succès n'a été obtenu pour la détection par MALDI-MS de peptides extraits de la même quantité de protéines séparées par 1D-SDS-PAGE en raison de certains composés extraits du gel qui sont apparemment suffisamment abondants pour supprimer l'ionisation des peptides d'intérêt.

4.2. Identification de sélénoprotéines après électrophorèse sur gel par nanochromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem à ionisation électrospray (nanoHPLC-ESI-MS/MS) assistée de l'ICP-MS

Une alternative à la spectrométrie de masse moléculaire à ionisation MALDI est la nanochromatographie couplée à la spectrométrie de masse moléculaire à ionisation électrospray (nanoHPLC-ESI-MS). Cette procédure est généralement efficace pour l'identification des peptides mais l'ionisation des composés en électrospray est très sensible à la présence de sels et aux autres composés de la matrice qui vont supprimer l'ionisation des peptides et ainsi empêcher leur identification par cette technique. L'ICP-MS va alors être un outil incontournable pour s'assurer que l'échantillon contient des sélénopeptides. Le couplage nanoHPLC-ICP-MS récemment mis au point au laboratoire a été utilisé en complément de l'ESI-MS pour l'identification des sélénoprotéines après électrophorèse sur gel. Les paragraphes suivants présentent les résultats obtenus lors de la mise au point du couplage sur l'étalon sélénié calmoduline sélénié et lors de son application à l'identification d'une sélénoprotéine, la thiorédoxine réductase.

4.2.1. Mise au point sur la calmoduline séléniée

Notre expérience montre que le succès de l'identification en nanoHPLC-ESI-MS/MS dépend fortement de la pureté de l'échantillon analysé. Dans le but d'être détecté en ESI-MS, un sélénopeptide doit arriver pur à la source à un moment donné. Les composés séléniés sont alors localisés dans le spectre de masse grâce à leur profil isotopique caractéristique (313). La recherche est manuelle donc la connaissance préalable du temps de rétention est extrêmement importante. Le temps de rétention, auquel le composé sélénié doit être détecté, peut être déterminé par une détection ICP-MS en parallèle de l'analyse ESI-MS (218, 313). La récente mise au point du nanonébuliseur dans notre laboratoire autorise le couplage entre une séparation des peptides par nanochromatographie (nanoHPLC) et la recherche par ICP-MS des sélénopeptides. La méthode a été validée sur un digestat tryptique de calmoduline séléniée obtenu par digestion de la protéine en solution (332). Un avantage indubitable de la détection ICP-MS est sa sensibilité sous femtomolaire sans se soucier de la structure du composé, ni de composés co-éluants même à fortes concentrations. Ici, la détection ICP-MS apporte une information sur le nombre de composés devant être détectés en ESI-MS/MS, leurs concentrations, leurs temps de rétention, l'efficacité de digestion et le taux de recouvrement de la colonne.

La Figure 55 présente les résultats de l'analyse nanoHPLC-ESI-MS/MS avec détection parallèle en ICP-MS d'un extrait tryptique de calmoduline séléniée similaire à celui analysé précédemment en MALDI-MS. Une électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide de la calmoduline séléniée suivie d'une étape de coloration au bleu de Coomassie a été réalisée. Le spot protéique a été digéré à la trypsine

et les peptides formés ont été extraits de façon séquentielle avec des solutions d'eau et d'acétonitrile. L'analyse de cet extrait en nanoHPLC-ICP-MS met en évidence 4 pics séléniés alors que 6 peptides séléniés sont attendus après digestion tryptique de la calmoduline sélénié (cf. Figure 55 a). Le plus petit, le dipeptide SeMetK, n'est pas assez hydrophobe pour pouvoir être piégé sur la colonne de préconcentration. Le plus gros, T5, n'a apparemment pas été élué de la colonne. Des 4 peptides séléniés détectés en ICP-MS, trois seulement ont pu être retrouvés en ESI-MS (Figure 55 c et d). Aucun ion présentant le profil isotopique du Se n'a été détecté dans le spectre ESI-MS (Figure 55 b) au temps de rétention du pic 3 du chromatogramme nanoHPLC-ICP-MS probablement en raison d'une pureté insuffisante. Alors que l'intensité du peptide T4 ne permet pas d'obtenir de spectres MS/MS de bonne qualité, le rapport signal sur bruit des peptides T12 et T13 suffisamment intense a permis la fragmentation de ces ions en MS/MS (Figure 55 d et e). Les séquences des ions fragmentés ont été déterminées avec une majorité d'ions fils de série b (vert) et de série y (rouge) retrouvés dans les spectres. Cet exemple montre l'importance de l'étape nanoHPLC-ICP-MS pour vérifier si l'absence de signal en ESI-MS/MS est due à l'absence du peptide dans l'extrait ou à une suppression de son ionisation par des espèces interférentes auquel cas, un changement des conditions chromatographiques résoudrait le problème.

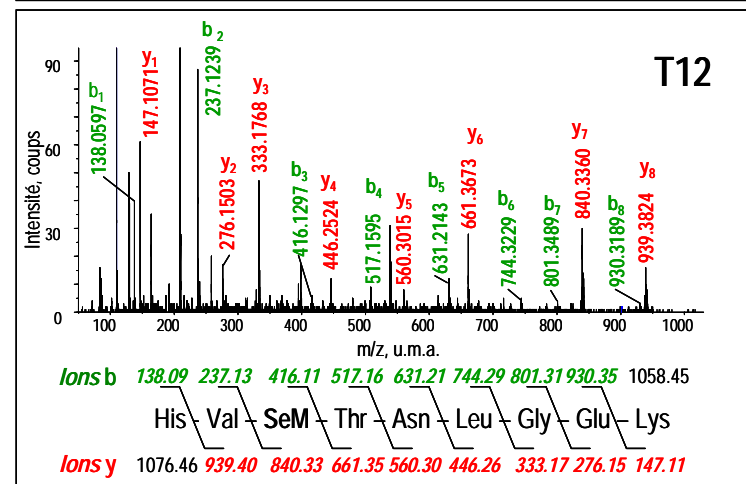
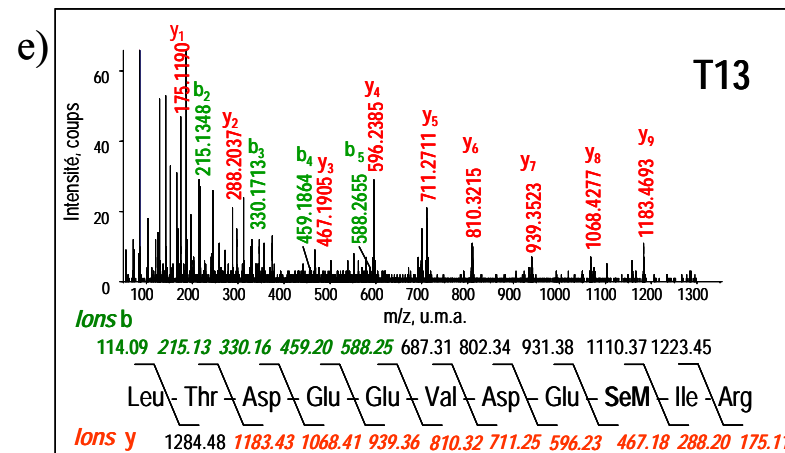
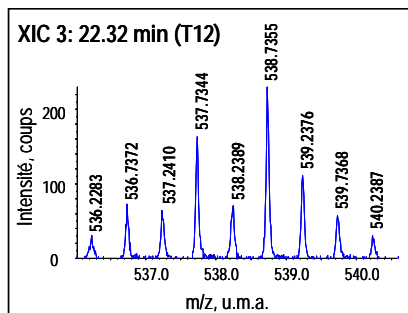
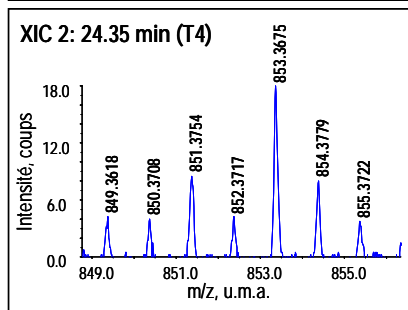
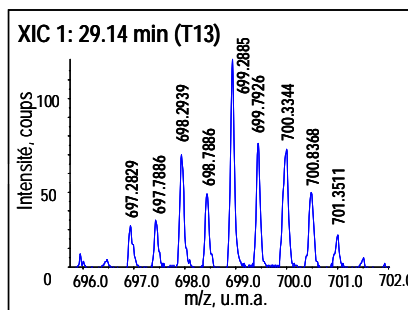
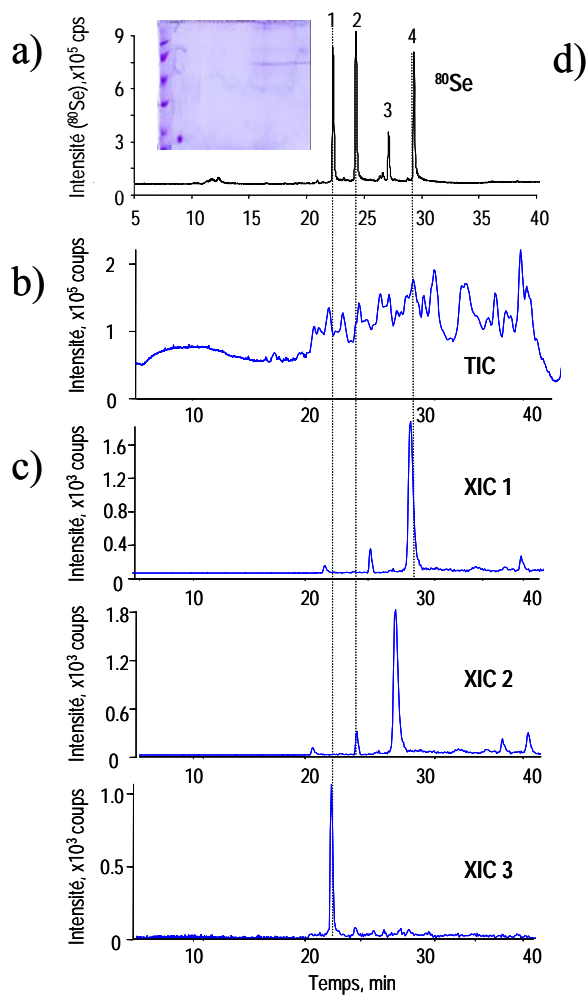


Figure 55 : Identification des peptides sélénisés de la calmoduline sélénisée après électrophorèse sur gel par nanoHPLC-ESI-MS/MS assistée par une détection du sélénium en nanoHPLC-ICP-MS.

- (a) Chromatogramme sélénié (^{80}Se) du digestat tryptique de la calmoduline sélénisée sur gel obtenu par nanoHPLC-ICP-MS. Encart : Electrophorèse bidimensionnelle de la calmoduline sélénisée. Le spot de calmoduline sélénisée a été découpé, digéré à la trypsine et les peptides extraits séquentiellement.
- (b) Chromatogramme du même échantillon avec détection de l'ensemble des ions en ESI-MS (TIC pour Total Ion Current)
- (c) Chromatogrammes des ions extraits (XIC pour eXtracted Ion Current)
- (d) Spectres de masse expérimentaux des ions extraits aux temps de rétention 29,14 min dans le XIC1 (panneau du haut), 24,35 min dans le XIC2 (panneau du milieu) et 22,32 min dans le XIC3 (panneau du bas). Les spectres sont présentés aux masses où le profil isotopique caractéristique du sélénium a été repéré.
- (e) Spectres de fragmentation des ions par nanoHPLC-ESI-MS/MS et séquences des peptides obtenues. Panneau du haut : spectre de fragmentation de l'ion 699,2885 détecté dans le XIC1. Panneau du bas : spectre de fragmentation de l'ion 538,7335 détecté dans le XIC3.
- Les analyses nanoHPLC-ICP-MS et nanoHPLC-ESI-MS/MS ont été réalisées dans les mêmes conditions chromatographiques.

4.2.2. Application sur la sélénoprotéine thioredoxine réductase

La Figure 56 illustre le principe de la détection d'une sélénoprotéine après électrophorèse sur gel suivie de son identification en nanoHPLC-ESI-MS/MS assistée par une détection parallèle du sélénopeptide en ICP-MS. Une électrophorèse 1D-SDS-PAGE a été effectuée avec l'échantillon fourni par le Dr Elias Arner (encart de la Figure 56 a). La sélénoprotéine, détectée par balayage du gel en ablation laser couplé à une détection du sélénium en ICP-MS, a été digérée avec de la trypsine et l'extrait peptidique a été analysé par nanoHPLC-ICP-MS. Un seul pic sélénié est observé dans le chromatogramme (Figure 56 a) comme prédit par la digestion tryptique *in silico* de la thiorédoxine réductase. Tandis que le TIC (Figure 56 b) montre une détection d'ions continue tout au long de l'analyse, seule la connaissance préalable du temps de rétention du sélénopeptide permet de le retrouver (encart de la Figure 56 b) dans ce spectre ESI-MS complexe. Le rapport signal sur bruit du chromatogramme de l'ion extrait (XIC) correspondant au sélénopeptide est comparable à celui de la détection ICP-MS en raison de la pureté de l'échantillon. La séquence du sélénopeptide détecté a ensuite été obtenue par analyse ESI-MS/MS avec une majorité d'ions de série b (vert) et de série y (rouge) retrouvés dans le spectre (Figure 56). La soumission du spectre de fragmentation obtenu aux banques de données a permis de confirmer l'identité de la sélénoprotéine thioredoxine réductase de rat dans l'échantillon analysé. Le spectre de fragmentation acquis a mis en évidence l'existence d'un pont interne S-Se entre les résidus sélénocystéyl et cystéyl voisins. La formation de ce pont interne est ici un avantage pour la réussite de l'identification car il permet de stabiliser le sélénium sur le sélénopeptide qui sinon aurait sûrement été perdu. Les sélénopeptides sont généralement instables en solution ce qui contraint l'ajout d'une étape de stabilisation du sélénium dans la procédure analytique afin de pouvoir repérer et identifier les sélénopeptides. Ce propos fait l'objet du paragraphe suivant.

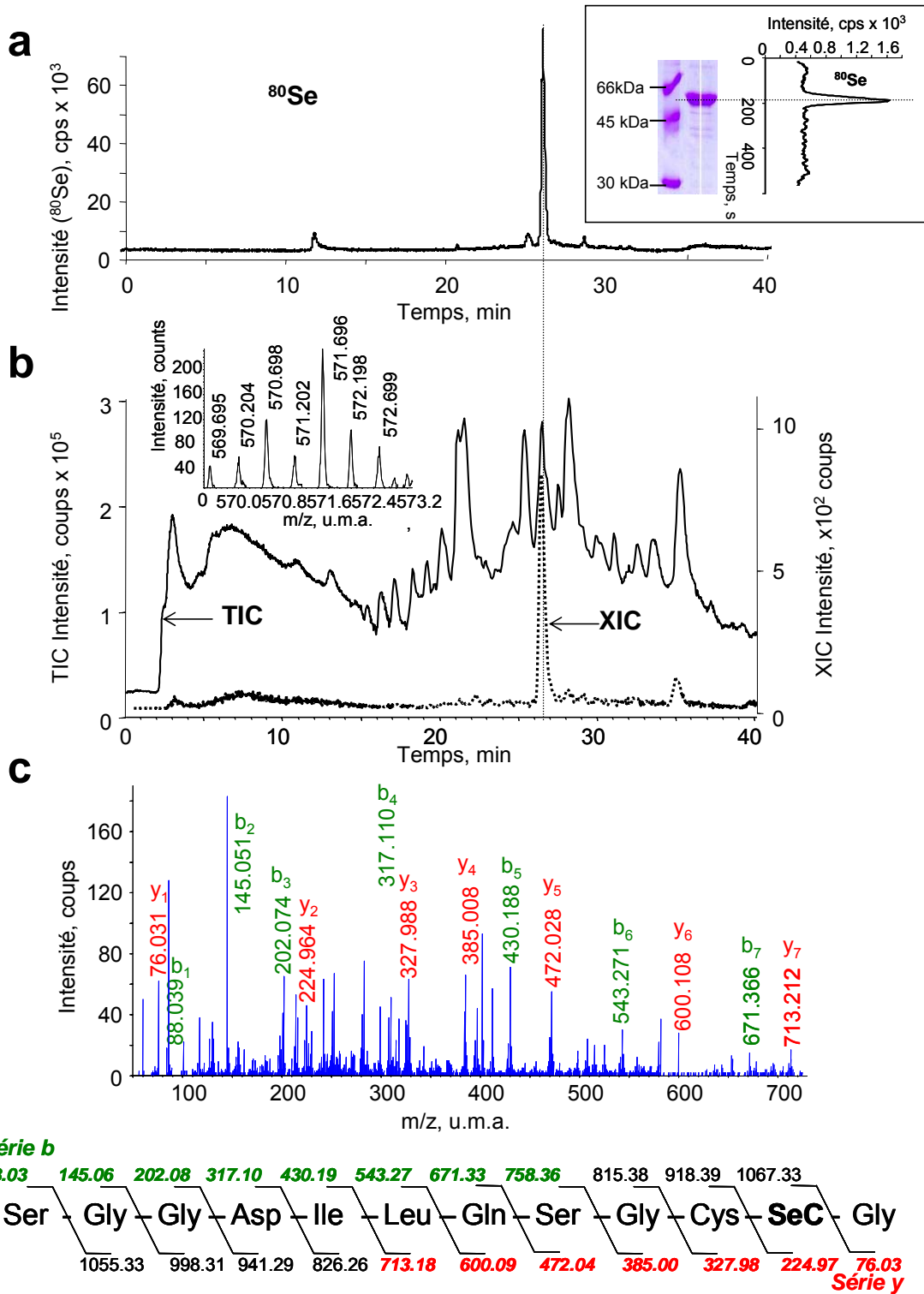


Figure 56 : Identification du sélénopeptide de la thiorédoxine réductase après électrophorèse sur gel par nanoLC-ESI-MS/MS assistée d'une détection du sélénium par nanoHPLC ICP-MS.

(a) Chromatogramme sélénié (^{80}Se) du digestat tryptique de la sélénoprotéine par nanoHPLC-ICP-MS. Encart : Electrophorèse 1D-SDS-PAGE de l'échantillon suivie d'une coloration au bleu de Coomassie. Un balayage monodimensionnel avec un laser nanoseconde couplé à une détection du sélénium (^{80}Se) en ICP-MS a permis de repérer la sélénoprotéine sur le gel. La bande protéique a été découpée, digérée à la trypsine et les peptides extraits séquentiellement.

(b) Chromatogramme du même échantillon avec détection de l'ensemble des ions en ESI-MS (TIC pour Total Ion Current). Le chromatogramme XIC (pour eXtracted Ion Current) de l'ion extrait est montré avec le spectre de masse correspondant.

(c) Spectres de fragmentation de l'ion 570,698 par nanoHPLC-ESI-MS/MS et séquence du peptide correspondant. Les analyses nanoHPLC-ICP-MS et nanoHPLC-ESI-MS/MS ont été réalisées dans les mêmes conditions chromatographiques.

4.3. Procédure de stabilisation du résidu sélénocystéyl d'une sélénoprotéine et caractérisation des produits de réaction : l'exemple de la glutathion peroxydase GPx

L'analyse des sélénopeptides en spectrométries de masse moléculaire est très délicate en raison de l'instabilité des sélénopeptides en solution. Cette instabilité a été rapportée sur la glutathion peroxydase plasmique de rat et sur la sélénoprotéine P par Ma *et al* (248). La perte de sélénium par les sélénopeptides est probablement due à un mécanisme d'oxydation du résidu sélénocystéyl en sélénoxyde suivi d'une β -élimination de l'acide sélénique pour laisser un peptide contenant un résidu déhydroalanyl en lieu et place du résidu sélénocystéyl. Afin de prévenir ces oxydations et pertes du sélénium, une stabilisation du sélénium sur le peptide a été envisagée par réaction de carboxyméthylation avec de l'iodoacétamide. Les produits de réaction ont été analysés en spectrométries de masse à ionisation ESI et MALDI puis caractérisés en spectrométrie de masse en tandem.

4.3.1. Analyses ESI-MS et MALDI-MS de la GPx stabilisée

La GPx fournie par SIGMA-ALDRICH est une protéine tronquée des 12 acides aminés du côté N-terminal (cf. 1.3. du chapitre résultats et discussion). L'alkylation de la sélénoprotéine GPx tronquée avec l'iodoacétamide produit un composé majoritaire de masse moléculaire mesurée en ESI-MS à 21798 Da, laquelle est très proche de la masse théorique de la protéine tronquée alkylée (Figure 57 a et b). Les autres composés observés dans le spectre peuvent correspondre à des adduits de la GPx avec des ions en solution mais seules des analyses en ESI-MS/MS permettraient de déterminer l'identité de ces composés. L'analyse en MALDI-MS donne une valeur expérimentale proche et mesurée à 21803,4 (Figure 57 c). La détection du dimère à 43467 Da dans la solution de GPx alkylée est certainement due à un dépliement incomplet de la sélénoprotéine. Ni les mesures ESI-MS, ni les mesures MALDI-MS ne permettent toutefois de confirmer la présence de sélénium dans la protéine.

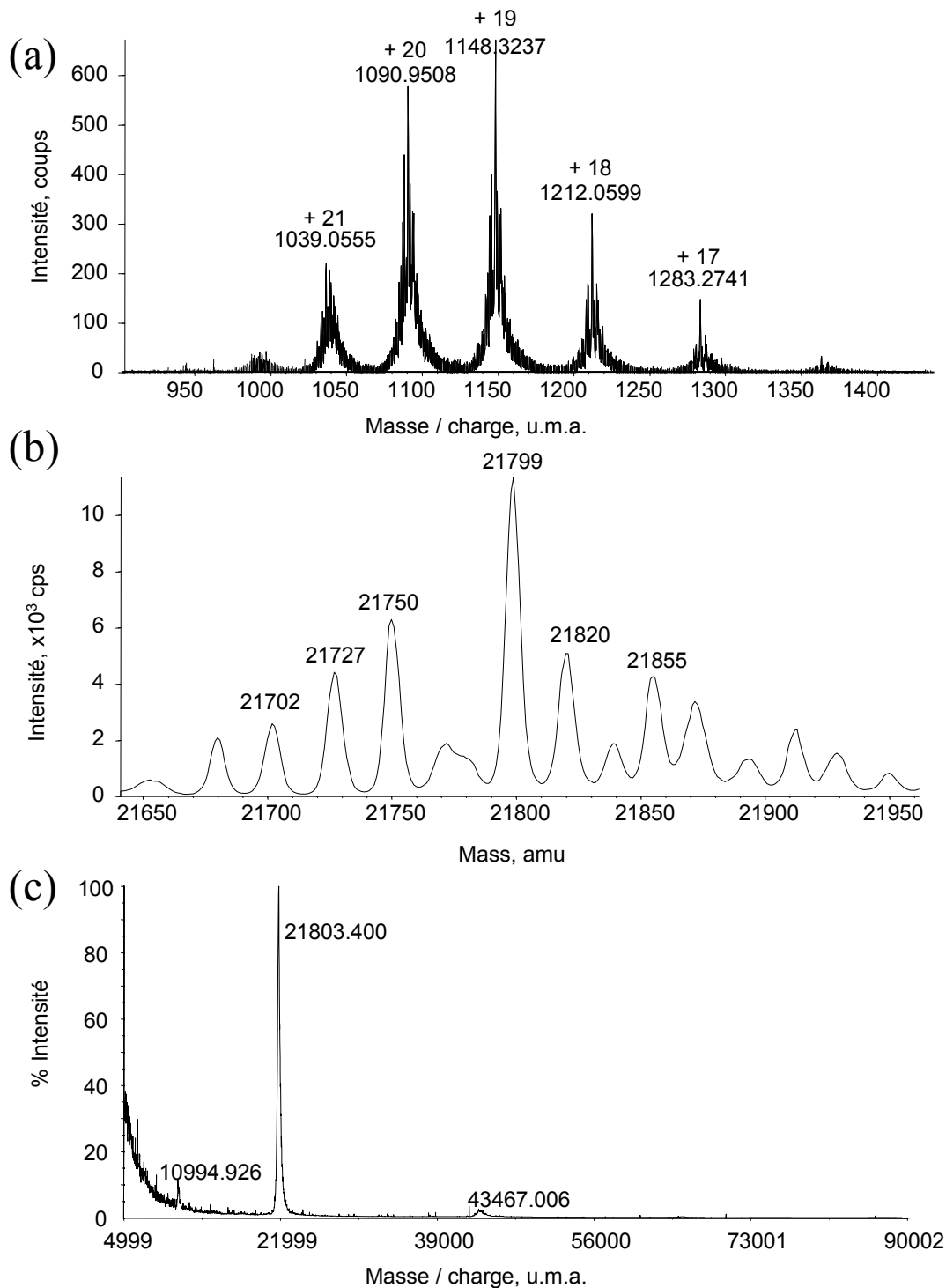


Figure 57 : Spectres de masses ESI et MALDI de la GPx après stabilisation du résidu sélénocystéyl par carboxyméthylation.

a) Spectre ESI-MS brut ; b) Spectre ESI-MS après déconvolution : 2 μ L de solution GPx stabilisée ont été mélangés avec 38 μ L d'une solution d'acétonitrile 30% (v/v) contenant 0.1% TFA. L'analyse ESI-MS a été faite avec 6 μ L du mélange ; c) Spectre MALDI TOF MS : 1 μ L de solution GPx stabilisée ont été mélangés avec 9 μ L d'une solution d'acétonitrile 30% (v/v) contenant 10 mg/mL d'acide sinapinique et 0.3% (v/v) TFA. 1 μ L du mélange ont été déposés sur la plaque et analysés par MALDI-MS.

4.3.2. Analyse du contenu sélénié dans la préparation de GPx stabilisée

La pureté de la préparation de GPx carboxyméthylée a été examinée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à l'ICP-MS afin d'obtenir le profil sélénié. Le chromatogramme SEC-ICP-MS de la GPx alkylée (Figure 58 a) présente 2 composés séléniés majeurs (pics 1 et 3) et un mineur (pic 2). D'après la calibration de la colonne en masse, les pics 1 et 3 correspondent respectivement à la sélénoprotéine carboxyméthylée et à du sélénium de faible poids moléculaire supposé être du sélénium inorganique. En tenant compte du taux de recouvrement de la colonne (98%) et de l'aire relative de ces pics, le chromatogramme permet d'estimer l'efficacité de la carboxyméthylation à moins de 50 %. L'analyse en 1D-SDS-PAGE faite parallèlement corrobore ces résultats avec une seule bande protéique d'environ 22 kDa après coloration au bleu de Coomassie. L'électrophérogramme du sélénium obtenu suite au balayage 1D du gel par le laser nanoseconde UV avec détection en ICP-MS met en évidence la présence de sélénium uniquement dans cette bande protéique (Figure 58 b). Le sélénium inorganique a pu être perdu lors des étapes de lavage et de coloration du gel. Aucune autre protéine n'a été observée ce qui confirme l'hypothèse d'une simple perte du sélénium du centre actif de la protéine.

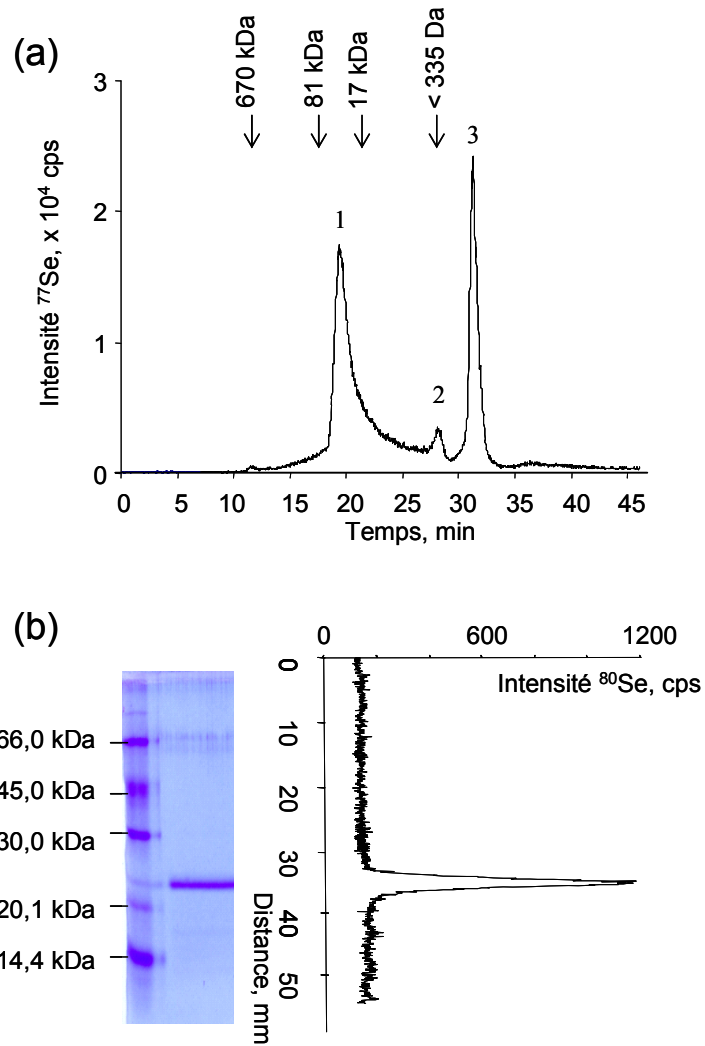


Figure 58 : Analyse du sélénium dans la préparation de GPx stabilisée

a) Chromatogramme d'exclusion stérique couplée à l'ICP-MS du ^{77}Se ; b) SDS-PAGE avec détection du ^{80}Se par 1D ns LA-ICP-MS.

4.3.3. Digestion tryptique de la GPx carboxyméthylée en solution et focalisation sur le sélénopeptide

Le chromatogramme d'exclusion stérique du digestat tryptique de la GPx carboxyméthylée avec détection du Se en ICP-MS (Figure 59) présente quatre pics sélénés et suggère une réaction de dérivatisation incomplète. Théoriquement, seulement un pic correspondant au peptide séléné carboxyméthylé VLLIENVASLZGTTVR devrait être obtenu (où Z correspond au résidu sélénocystéyl carboxyméthylé). Le composé séléné exclu de la colonne (pic 1) doit correspondre à la GPx non digérée alors que le dernier doit être du Se (IV). En tenant compte des deux pics au milieu du chromatogramme, l'efficacité de digestion est estimée à 78 %. Cette estimation est basée sur l'aire relative des pics en considérant un taux de recouvrement de la colonne en sélénium supérieur à 98%. L'identité de ces deux pics a ensuite été déterminée par HPLC de phase inverse couplée à des détections ICP-MS et ESI-MS/MS.

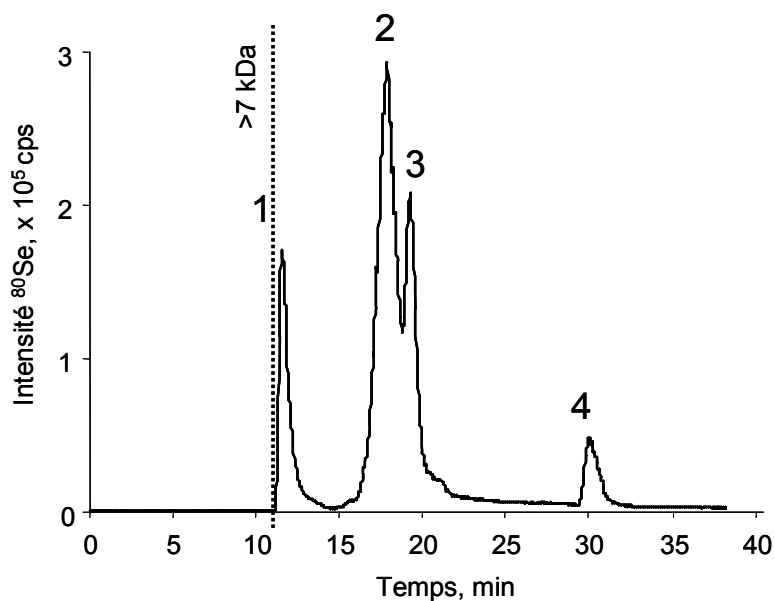


Figure 59 : Analyse du sélénium (^{80}Se) dans le digestat tryptique de la glutathion peroxydase stabilisée par chromatographie d'exclusion stérique ($\text{SEC}_{\text{peptide}}$) avec détection ICP-MS

L'analyse en HPLC capillaire de phase inverse couplée à l'ICP-MS montre que le pic 3 peut être considéré comme chromatographiquement pur étant donné que l'aire du pic représente 90% de sélénium injecté (Figure 60a). Les données nanoHPLC-ESI-MS/MS confirment la présence du peptide séléné VLLIENVASLZGTTVR (Figure 60a et Figure 61a). L'analyse capHPLC-ICP-MS montre que le pic 2 correspond à un mélange de composés sélénés (Figure 60b). L'analyse des données nanoHPLC-ESI-MS/MS pour le pic 2 indique la présence de deux enveloppes isotopiques sélénées, une correspondant au peptide VLLIENVASLZGTTVR (Figure 61b), l'autre à un peptide similaire plus long de deux acides

aminés (Gly-Lys) suite à un défaut de coupure par la trypsine (Figure 61c). Les séquences des sélénopeptides et des ions *b* et *y* détectés sont données en Figure 61. Aucun autre composé sélénié observé en ICP-MS n'a pu être détecté dans le spectre électrospray MS/MS. Ces résultats démontrent une nouvelle fois la possibilité de corrélation des données ICP-MS et ESI-MS/MS obtenues après séparation en HPLC et la complémentarité de ces techniques. En raison de sa haute sensibilité et de sa réponse indépendante de la matrice, la détection ICP-MS permet la détermination du nombre de sélénopeptides qui devraient être trouvées dans les données en nanoHPLC-ESI-MS, alors que certaines de ces espèces peuvent être manquées par la détection électrospray. Il est également important de noter que dans des conditions instrumentales théoriquement identiques, le même sélénopeptide peut apparaître doublement ou triplement chargés dans différents chromatogrammes.

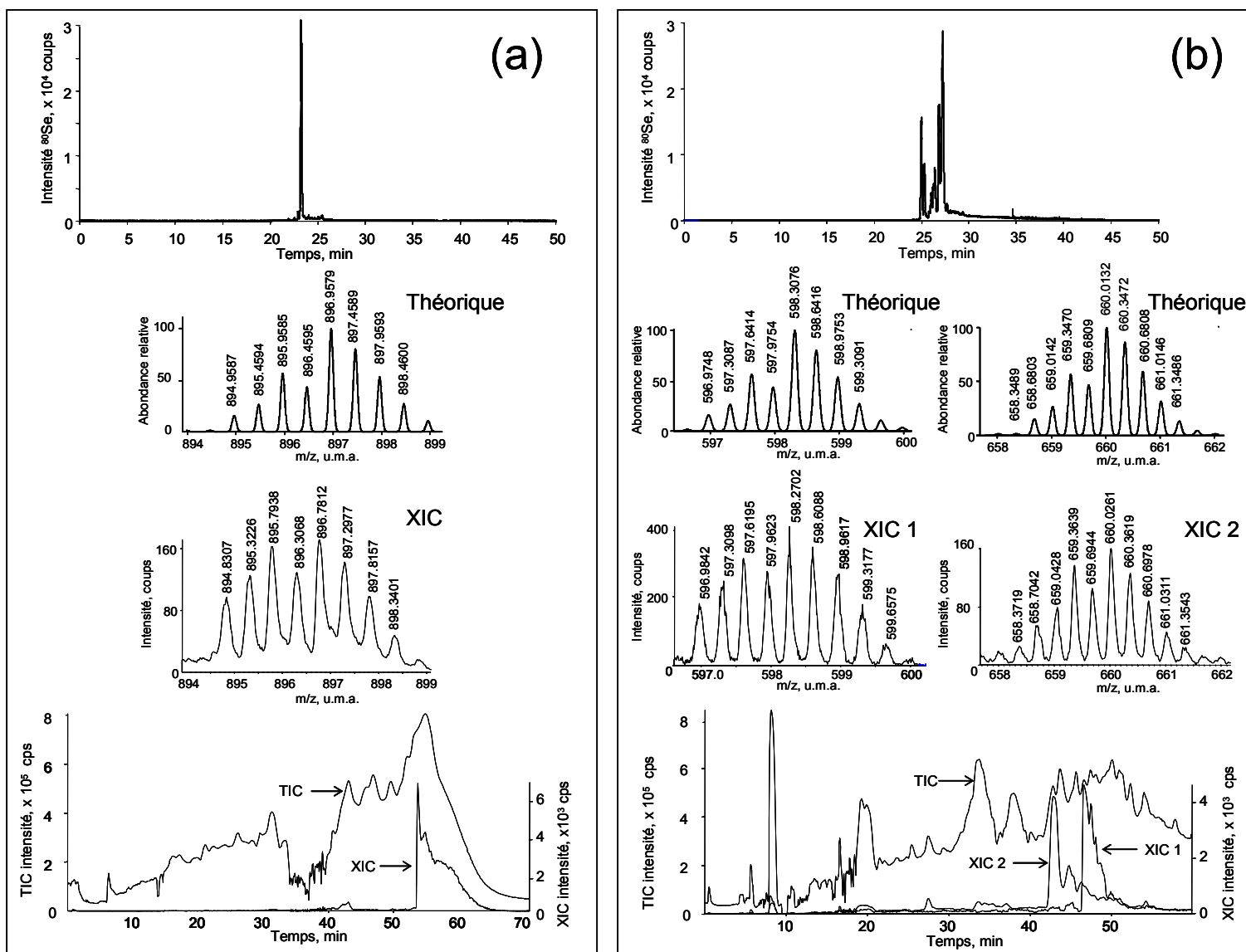


Figure 60 : Identification du sélénopeptide de la glutathion peroxydase stabilisée par nanoHPLC-ESI-MS/MS assistée d'une détection du sélénium par ICP-MS.

a) et b) : Analyses respectives des pic 3 et 2 du chromatogramme SEC-ICP-MS (figure 59)
 En haut : chromatogrammes séléniés (⁸⁰Se) des pics 3 (a) et 2 (b) par capHPLC-ICP-MS. Au milieu : spectres de masse théoriques et expérimentaux (XIC) des sélénopeptides. En bas : chromatogrammes des pics 3 (a) et 2 (b) avec détection de l'ensemble des ions en ESI-MS (TIC pour Total Ion Current) et des ions extraits XIC, XIC1 et XIC2 (pour eXtracted Ion Current).

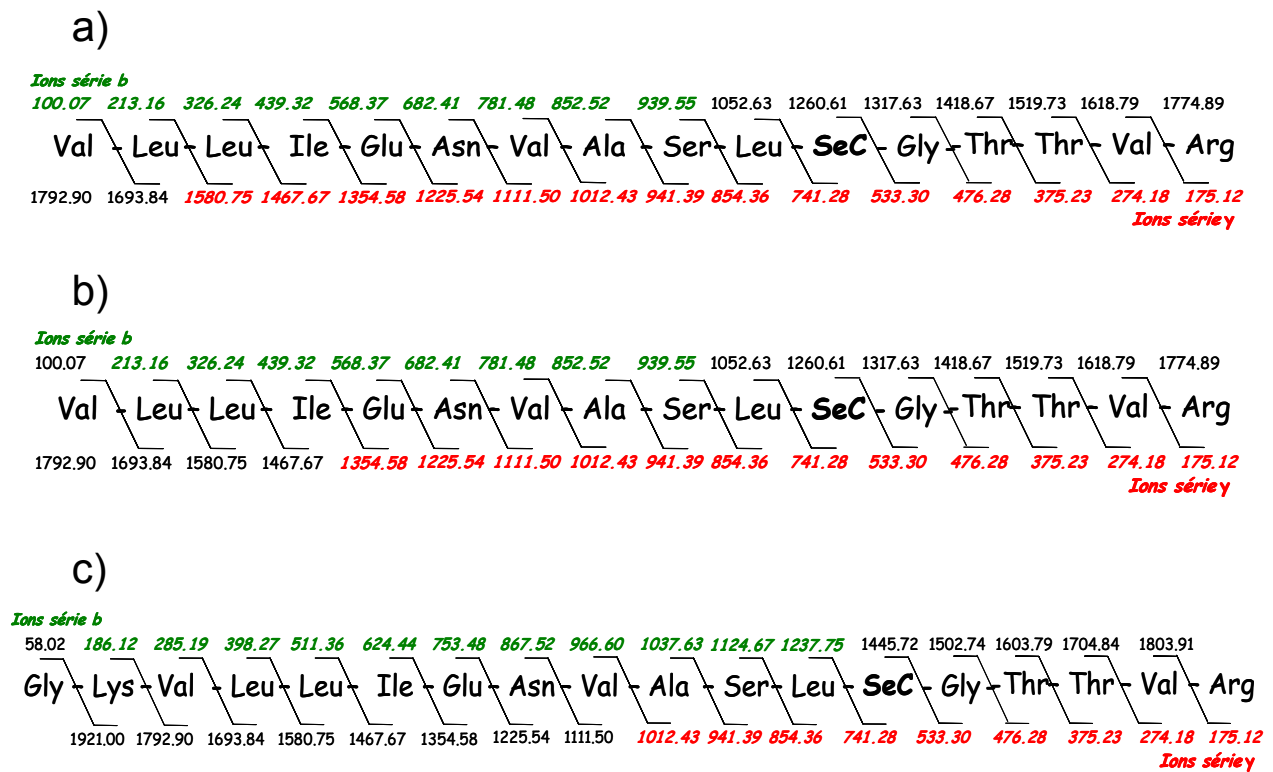


Figure 61 : Séquences des sélénopeptides déterminées en nanoHPLC-ESI-MS/MS dans la préparation de GPx stabilisée.

a) Séquence de l'ion à 898,78 Da détecté dans le XIC (figure 60 a); b) Séquence de l'ion à 598,27 Da détecté dans le XIC 1 (figure 60 b); c) Séquence de l'ion à 660,02 Da détecté dans le XIC 2 (figure 60 b). Les ions présents dans le spectre de fragmentation sont indiqués en vert (ions de la série b) et rouge (ions de la série y).

4.3.4. Electrophorèse sur gel de la GPx carboxyméthylée suivie de son identification par nanoLC-ESI-MS/MS assistée d'une détection des sélénopeptides en ICP-MS

La protéique sélénée détectée après SDS-PAGE par ICP-MS à ablation laser (Figure 58b) a été digérée dans le gel avec de la trypsine et l'extrait peptidique a été analysé en spectrométries de masse moléculaire (Figure 62). Une première tentative a été effectuée en MALDI-MS mais aucun profil isotopique du sélénium n'a pu être retrouvé dans le spectre acquis. Le chromatogramme cap HPLC-ICP-MS de l'extrait (Figure 62 a) présente un seul pic sélénié mais le faible taux de récupération (environ 110 pg de Se dans le pic) suggère qu'une partie de la protéine a été non digérée et n'a pas pu être récupérée du gel. La limite de détection estimée est de l'ordre de 1 pg ce qui est suffisant pour permettre la détection de la GPx dans les échantillons biologiques. L'identité du peptide a été confirmée en nanoLC-ESI-MS/MS comme étant le peptide VLLIENVASLZGTTVR (Figure 62 b). Cet exemple constitue à notre connaissance le premier exemple d'un sélénopeptide détecté et identifié par ICP-MS et électrospray MS à partir d'une sélénoprotéine dans un gel. La comparaison de la sensibilité des méthodes nanoHPLC-ESI-MS et MALDI-MS est clairement en faveur de la première.

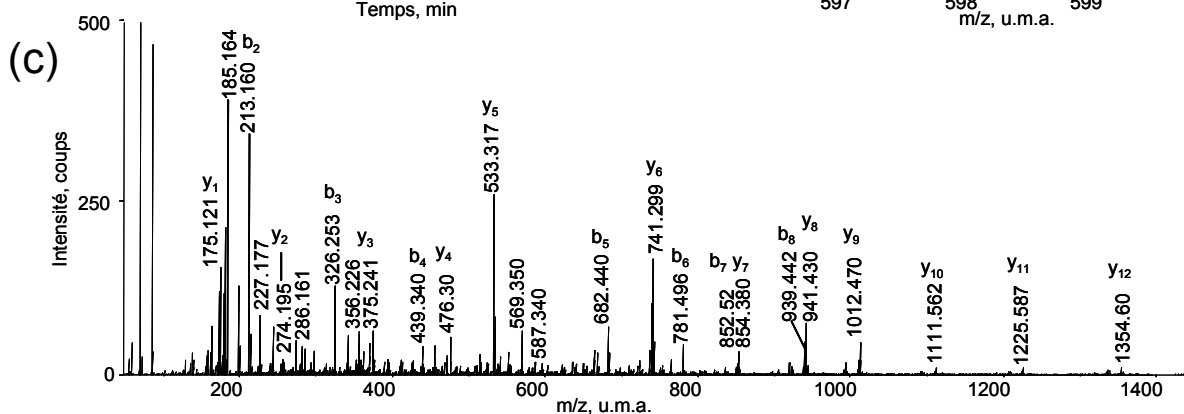
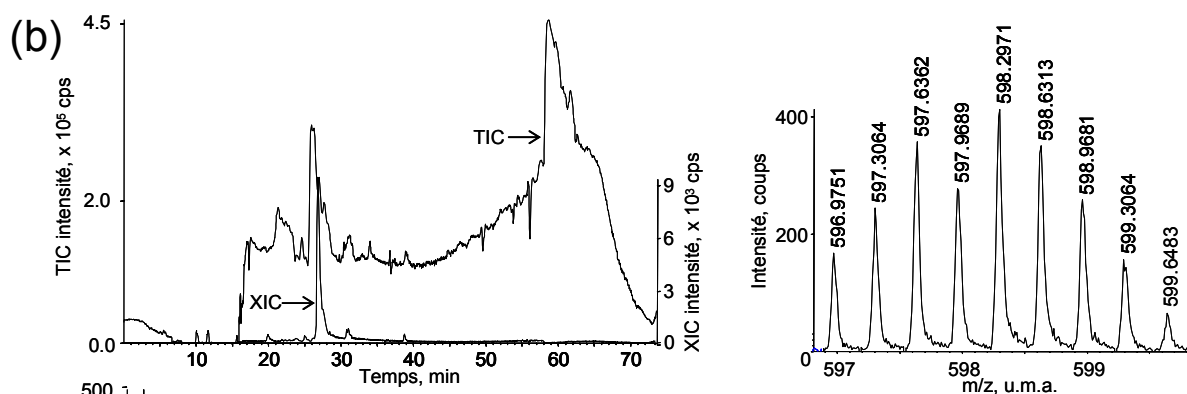
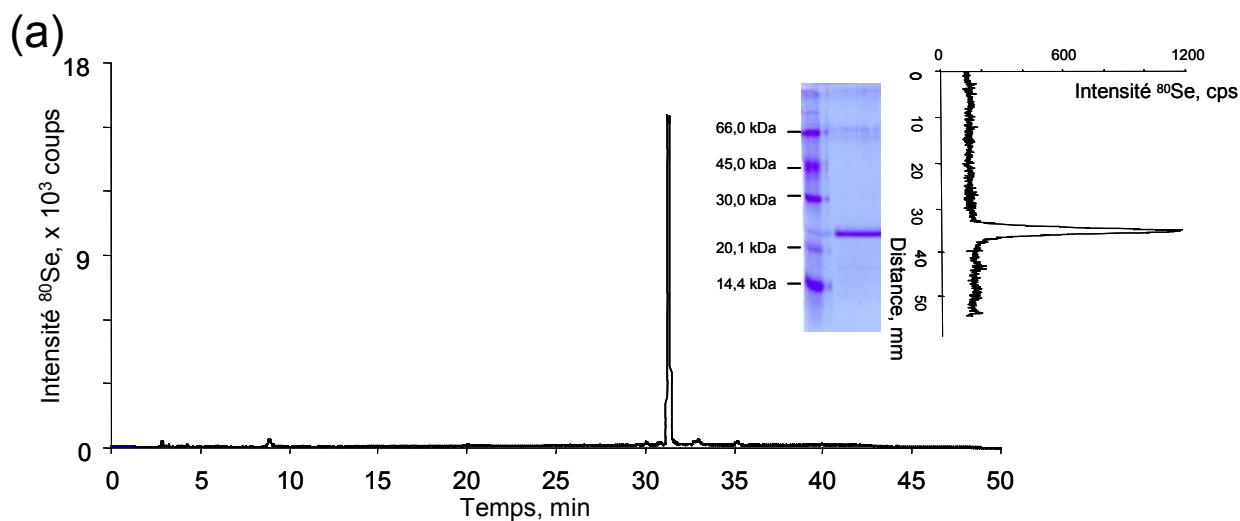
Figure 62 : Identification du sélénopeptide de la GPx après électrophorèse sur gel par nanoHPLC ESI-MS/MS assistée d'une détection du sélénium en ICP-MS.

(a) Chromatogramme sélénié (^{80}Se) du digestat tryptique de la sélénoprotéine par capHPLC-ICP-MS. Encart : Electrophorèse 1D-SDS-PAGE de l'échantillon suivie d'une coloration au bleu de Coomassie. Un balayage monodimensionnel avec un laser nanoseconde couplé à une détection du sélénium (^{80}Se) en ICP-MS a permis de repérer la sélénoprotéine sur le gel. La bande protéique a été découpée, digérée à la trypsine et les peptides extraits séquentiellement.

(b) Chromatogramme du même échantillon avec détection de l'ensemble des ions en ESI-MS (TIC pour Total Ion Current). Le chromatogramme XIC (pour eXtracted Ion Current) de l'ion extrait est montré avec le spectre de masse correspondant.

(c) Spectres de fragmentation de l'ion 598,2971 par nanoHPLC-ESI-MS/MS et séquence du peptide correspondant.

Les ions de la série *b* et *y* présents dans le spectre de fragmentation sont indiqués italiques.



ions série b

100.07 213.16 326.24 439.32 568.37 682.41 781.48 852.52 939.55 1052.63 1260.61 1317.63 1418.67 1519.73 1618.79 1774.89

Val Leu Leu Ile Glu Asn Val Ala Ser Leu **SeC** Gly Thr Thr Val Arg

1792.90 1693.84 1580.75 1467.67 1354.58 1225.54 1111.50 1012.43 941.39 854.36 741.28 533.30 476.28 375.23 274.18 175.12

ions série y

CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. Conclusions

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est une des techniques séparatives les plus résolutive pour les protéines. Cette technique combinée à la spectrométrie de masse moléculaire est actuellement à la base de l'analyse protéomique qui vise à identifier les protéines d'un organisme dans des conditions physiologiques données. L'objectif de cette thèse a été de développer une procédure analytique complémentaire à l'analyse protéomique pour la détection et l'identification spécifique des sélénoprotéines. Cette procédure est basée sur l'utilisation d'un spectromètre de masse à source d'ionisation par plasma induit (ICP-MS) dont les performances permettent d'envisager la détection de quantités de sélénium extrêmement faibles. Les principales conclusions qui résultent de ce travail et qui répondent à cet objectif sont présentées ci-dessous :

Biosynthèse et caractérisation d'un étalon protéique sélénié stable

Le développement d'une méthode et l'évaluation de ses performances analytiques ne peuvent se faire qu'avec un étalon adapté. Etant donné qu'aucun étalon protéique sélénié stable n'était disponible au début de mes travaux de thèse, le premier objectif a été d'en produire un. Cet étalon est la calmoduline séléniée, protéine recombinante produite dans une culture de la bactérie *Escherichia coli* MG1655 pVU1 en présence de fortes concentrations en sélénométhionine. Les conditions de culture ont été optimisées pour permettre l'assimilation de la sélénométhionine dans la calmoduline sans trop affecter la croissance bactérienne. Ce compromis a été trouvé en ajoutant 1 mM de L-sélénométhionine à une culture en phase exponentielle de croissance. La purification de la calmoduline séléniée a ensuite été effectuée en 2 étapes de chromatographies d'interaction hydrophobe et son identité a été confirmée en spectrométrie de masse moléculaire à ionisation par électrospray (ESI-MS). Les électrophérogrammes obtenus après analyses 1D et 2D-SDS-PAGE de l'étalon sélénié avec coloration au bleu de Coomassie montrent qu'il est électrophorétiquement pur ce qui permet d'envisager l'utilisation de la calmoduline séléniée pour le développement de méthodes analytiques.

La stabilité de cet étalon a été évaluée en contrôlant la dégradation protéique et la perte de sélénium dans le temps. Ni perte de sélénium ni dégradation significative n'ont été observées sur une période de 2 ans. Ce résultat contraste avec celui obtenu pour la sélénoprotéine glutathion peroxydase commercialisée qui ne peut être conservée que quelques semaines à -20°C après resolubilisation. En effet, l'analyse 1D-SDS-PAGE de la glutathion peroxydase quelques semaines après sa remise en solution a montré l'apparition de plusieurs bandes, témoignant d'une dégradation protéique. Des pertes significatives de sélénium ont

également été observées. Les analyses ESI-MS des sélénoprotéines thiorédoxine réductase et glutathion peroxydase fournies ont révélé la présence d'impuretés. Ces contrôles mettent clairement en évidence l'avantage de produire un étalon protéique sélénié stable et pur comme la calmoduline séléniée. Cette protéine séléniée a été utilisée pour le développement puis pour l'étalonnage des techniques analytiques adaptées à l'étude des sélénoprotéines.

Développement de l'ICP-MS à ablation laser pour la détection sensible et spécifique des sélénoprotéines dans les gels d'électrophorèse

L'ablation laser a été couplée à l'ICP-MS pour le développement d'une méthode de détection spécifique du sélénium contenu dans des protéines séparées par électrophorèse sur gel. Ce développement a été effectué en utilisant un laser nanoseconde à faible cadence de tirs permettant un balayage monodimensionnel rapide du gel couplé à une détection élémentaire en ICP-MS (1D ns LA-ICP-MS) sur l'étalon calmoduline séléniée. Les performances analytiques du couplage dans les conditions optimales d'analyses ont été évaluées. Les analyses se sont avérées reproductibles (écart type relatif < 5 %) et la limite de détection du système a été estimée à 1,3 ng Se.mL⁻¹ de solution déposée sur le gel, soit 13 pg de Se dans le gel. Ces limites de détection très basses ont permis d'envisager la détection de protéines contenant du sélénium dans des échantillons biologiques. Cette technique a été appliquée à la détection de protéines séléniées séparées par électrophorèse 1D-SDS-PAGE chez la bactérie *Cupriavidus metallidurans* CH34 et par 2D-SDS-PAGE chez la levure séléniée lorsque ces organismes sont exposés à des concentrations en sélénium de l'ordre de quelques mM. Les résultats obtenus ont montré la formation, à priori, non spécifique de nombreuses protéines séléniées lors de l'exposition de ces organismes à de fortes concentrations en sélénium. Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour déterminer si certaines protéines sont préférentiellement séléniées. Ce couplage a également été validé pour la détection de sélénoprotéines purifiées, thiorédoxine réductase et glutathion peroxydase.

L'analyse des échantillons biologiques, où les sélénoprotéines sont en quantité beaucoup plus faible, s'est avérée non concluante. Le manque de sensibilité mis en cause a été compensé par une amélioration de la technique d'introduction de l'échantillon dans l'ICP-MS. Cette amélioration a consisté à transférer à l'ICP-MS une quantité de matière ablatée plus importante dans un temps très court, ce qui a pour conséquence d'augmenter le rapport signal sur bruit. Dans ce but, un nouveau mode de balayage bidimensionnel (2D) ultrarapide du gel avec un laser femtoseconde (fs) à très haute cadence de tirs (laser ALFAMET) a été mis au point. Les performances analytiques de cette nouvelle technique d'ablation laser couplée à une détection ICP-MS (2D fs LA-ICP-MS) ont été évaluées et comparées à la méthode d'ablation laser « conventionnelle » couplée à l'ICP-MS (1D ns LA-ICP-MS). La méthode 2D fs LA-ICP-MS s'est avérée reproductible (écart type relatif < à 5 %) et a permis une détection ICP-MS beaucoup plus

sensible qu'en 1D ns LA-ICP-MS. Le gain en sensibilité, supérieur à un facteur 40, peut être principalement expliqué par une quantité de matière ablatée plus importante (27 fois) mais aussi probablement par une qualité de l'aérosol améliorée. Le transport et l'ionisation de ces particules potentiellement plus fines et homogènes seraient alors favorisés en ICP-MS.

La technique 2D fs LA-ICP-MS a été testée sur les échantillons pour lesquels le balayage monodimensionnel du gel avec le laser nanoseconde a montré ses limites. La technique permet ainsi le repérage spécifique des sélénoprotéines dans un extrait brut avec une sensibilité comparable à l'autoradiographie. Le principal avantage est son applicabilité à l'analyse de tous types d'échantillons d'origine biologique. Grâce à ce développement, quatre sélénoprotéines encore inconnues ont été détectées dans un extrait brut de la bactérie *Desulfococcus multivorans* DSM 2059 cultivée sur benzoate.

Développement d'une procédure spécifique et sensible pour l'identification de sélénoprotéines séparées par électrophorèse sur gel

L'autre partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'identification des sélénoprotéines séparées par électrophorèse sur gel. La stratégie classique d'identification des protéines consiste à digérer les protéines d'intérêt à la trypsine, et à analyser en spectrométrie de masse MALDI ou ESI les peptides générés. Dans ce travail, nous avons focalisé notre attention sur les sélénopeptides pour une identification non équivoque des sélénoprotéines. La spectrométrie de masse MALDI est suffisante pour l'analyse de peptides issus de protéines suffisamment purifiées et concentrées. Toutefois, la recherche des peptides sélénés dans les spectres de masse acquis pour l'analyse de la calmoduline sélénée séparée en 2D-SDS-PAGE s'est avérée laborieuse et infructueuse pour certains peptides sélénés en raison d'interférences isobariques aux masses d'intérêt. L'identification des sélénoprotéines par établissement de cartes peptidiques en MALDI-MS est également à exclure du fait de l'absence de la plupart des sélénoprotéines dans les banques de données. Des analyses en nanochromatographie couplée à la spectrométrie de masse ESI-MS/MS (nanoHPLC-ESI-MS/MS) ont alors été envisagées afin de déterminer les séquences des peptides générés. Grâce à des analyses parallèles en ICP-MS réalisées dans les mêmes conditions chromatographiques (nanoHPLC-ICP-MS), les peptides sélénés sont spécifiquement détectés pour une analyse en nanoHPLC-ESI-MS/MS. Si cette dernière analyse ne permet pas d'identifier ces peptides sélénés, des étapes de préconcentration et de purification de l'échantillon doivent être rajoutées avant l'analyse en spectrométrie de masse moléculaire. Au-delà de la détermination du temps de rétention des sélénopeptides, l'analyse en nanoHPLC-ICP-MS permet de calculer le taux de recouvrement des sélénopeptides extraits du gel. Par ailleurs, elle permet également de quantifier précisément ces sélénopeptides par une méthode de dilution isotopique. Le développement de cette approche a été effectué sur la calmoduline sélénée après une électrophorèse sur gel puis appliqué à l'identification de la thiorédoxine réductase (TrxR) sur gel. Le sélénopeptide de la

TrxR a pu être détecté et identifié grâce à la présence d'un pont interne entre résidus cystéyl et sélénocystéyl stabilisant le sélénium sur le peptide. L'instabilité des résidus sélénocystéyls des autres sélénoprotéines a rendu nécessaire la stabilisation du sélénium avant toute tentative d'identification. Le sélénium de la glutathion peroxydase a été stabilisé par carboxyméthylation ce qui a permis pour la première fois la détection et l'identification par les approches développées de son sélénopeptide extrait du gel. L'identification de sélénoprotéines provenant d'échantillons biologiques est maintenant techniquement réalisable en nanoHPLC-ESI-MS/MS en parallèle à une analyse en nanoHPLC-ICP-MS. Des étapes de pré-fractionnement et de pré-concentration (par exemple en SEC-ICP-MS), des sélénoprotéines par HPLC-ICP-MS sont toutefois à envisager pour la réussite de cette approche. Le préfractionnement, permettrait de se focaliser sur les fractions sélénées et ainsi de simplifier les électrophorogrammes et les analyses subséquentes. Le séquençage des sélénopeptides est également encouragé du fait de l'absence des sélénoprotéines dans les banques de données. En résumé, les méthodes analytiques développées et appliquées à l'analyse d'échantillons biologiques pour l'identification des sélénoprotéines permettent maintenant d'établir la stratégie analytique présentée en Figure 63.

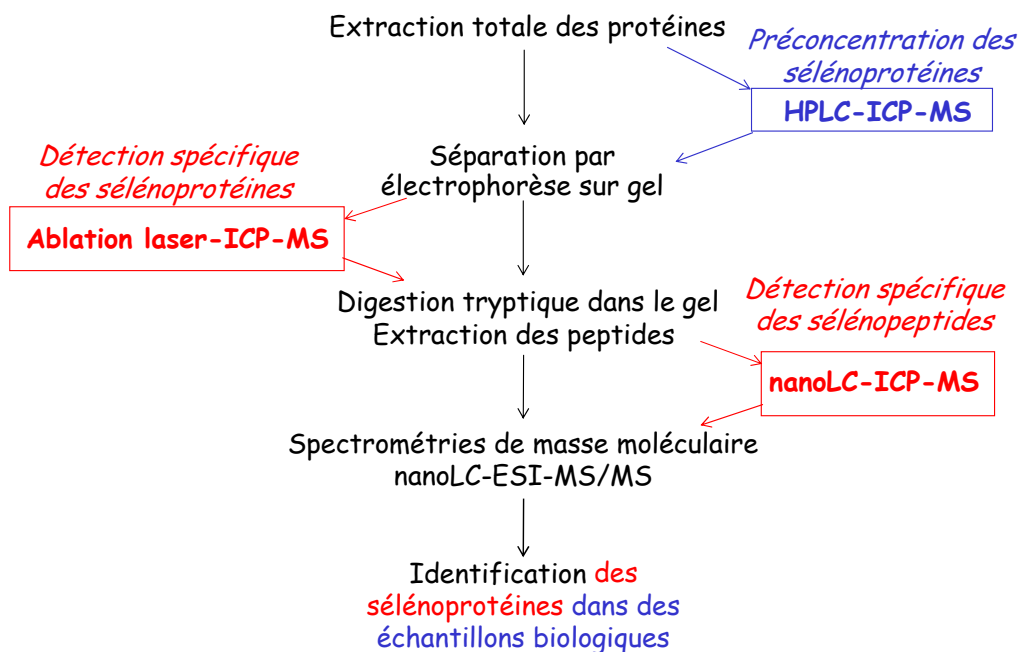


Figure 63 : Stratégie analytique employée pour détecter et identifier des sélénoprotéines.

En rouge, les développements analytiques utilisés lors de ces travaux. En bleu, l'étape à améliorer pour une identification plus aisée des sélénoprotéines à partir d'échantillons biologiques.

2. Perspectives d'études

Les méthodes analytiques développées dans cette thèse ont permis de répondre aux objectifs initialement fixés. Les résultats obtenus ont ouvert les perspectives d'études suivantes.

Etude des aérosols en ablation laser

La durée de l'impulsion et l'irradiance (densité d'énergie par unité de temps) jouent un rôle majeur dans les caractéristiques de l'aérosol formé en ablation laser (stoechiométrie et taille des particules). De ce fait, la qualité de l'aérosol formé avec le laser femtoseconde ALFAMET doit être meilleure que celle obtenue en ablation laser nanoseconde. Une étude comparative des aérosols formés lors de l'ablation de gels de polyacrylamide avec les lasers nanoseconde et femtoseconde est actuellement en cours au laboratoire. Cette étude est effectuée au moyen d'un impacteur en cascade de type ELPI (Electrical Low Pressure Impactor) qui permet d'obtenir en temps réel la concentration et la distribution granulométrique en nombre, en surface et en volume. Les résultats devraient ainsi apporter des informations sur la qualité de ces aérosols et sur le gain en sensibilité obtenu lors du couplage de l'ablation laser femtoseconde à l'ICP-MS.

Améliorations des méthodes développées

Des améliorations des méthodes analytiques développées peuvent encore être envisagées. Ces améliorations concernent essentiellement la détection des sélénoprotéines sur gel.

Il serait tout d'abord important de contrôler le processus d'ablation au cours de l'analyse. Le xénon a été utilisé pour contrôler la stabilité de l'ICP-MS durant plusieurs heures d'analyses mais aucun contrôle du processus d'ablation laser n'a été effectué. Un étalon interne au gel de polyacrylamide pourrait permettre le suivi de la stabilité de l'ablation laser au cours du temps. Une solution envisageable serait d'utiliser des monomères d'acrylamide greffés d'un élément facilement analysable en ICP-MS. Des contrôles concernant la polymérisation de ces gels et leurs comportements lors de l'analyse d'ablation laser ICP-MS devraient toutefois être effectués.

Des analyses quantitatives pourraient ensuite être envisagées par calibration externe avec l'utilisation d'une calmoduline séléniée marquée isotopiquement au ^{76}Se .

L'ablation lors de la première analyse n'affecte pas la totalité de la sélénoprotéine contenue dans la bande. La sélénoprotéine restante dans le gel pourrait être caractérisée pour savoir si elle reste intacte malgré l'ablation effectuée. Dans ce cas, une première analyse en 2D fs LA-ICP-MS serait envisagée suivie d'une identification avec la sélénoprotéine restée dans le même gel. Cette procédure présenterait l'avantage d'effectuer les expériences de détection et d'identification des sélénoprotéines à partir du même gel.

Adaptation de la stratégie d'ablation laser à l'analyse de sélénoprotéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle sur gels de polyacrylamide

De par la complexité et le nombre important de protéines extraites d'un organisme, leur séparation par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide (2D-SDS-PAGE) doit être envisagée. La recherche de sélénoprotéines dans un gel après 2D-SDS-PAGE par ablation laser ICP-MS peut être très laborieuse voire impossible sans une stratégie d'analyse adaptée. La Figure 64 présente une méthode pour simplifier cette recherche. Des électrophorèses IEF, 1D-SDS-PAGE et 2D-SDS-PAGE du même extrait brut de protéines sont réalisées séparément. L'analyse en ablation laser 2D fs ICP-MS des électrophérogrammes IEF et 1D-SDS-PAGE va permettre de déterminer respectivement les zones de pH et de poids moléculaire (PM) du gel 2D-SDS-PAGE dans lesquelles se situent les sélénoprotéines. Ces zones sont ensuite analysées en ablation laser fs ICP-MS par un nouveau mode d'ablation dit en cratère réalisé avec le laser ALFAMET. La trajectoire du faisceau est définie par une succession de cercles concentriques. Chaque cercle est constitué de plusieurs « micro-cratères » de 25 µm de diamètre dont l'espacement est conditionné par la fréquence de tirs et la vitesse de déplacement du faisceau laser. Ce mode d'ablation permet de se focaliser spécifiquement sur un spot pour garder l'excellente résolution du gel 2D.

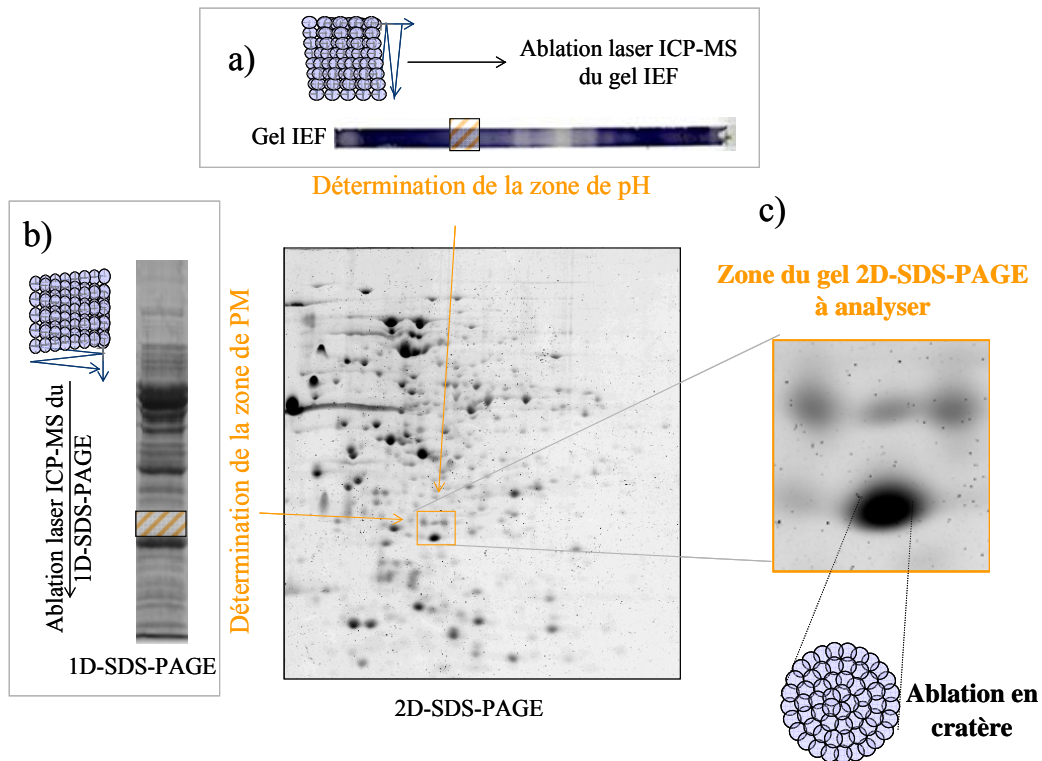


Figure 64 : Stratégie d’ablation laser ICP-MS pour l’analyse de sélénoprotéines séparées en électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide.

(a) : Détermination de la zone de pH des sélénoprotéines dans le gel IEF par 2D fs LA-ICP-MS; (b) : Détermination de la zone de poids moléculaire des sélénoprotéines dans le gel 1D-SDS-PAGE par 2D fs LA-ICP-MS ; (c) : Analyse spot par spot de la zone sélectionnée du gel 2D-SDS-PAGE par fs LA-ICP-MS en mode d’ablation « cratère ».

Applications des méthodes développées à la quantification et à l'identification de nouvelles sélénoprotéines

Alors que les sélénoprotéomes d'organismes modèles sont bien connus, l'analyse d'autres organismes met souvent en évidence de nouvelles familles de sélénoprotéines suggérant que nous ne connaissons à l'heure actuelle qu'une fraction des sélénoprotéines existantes dans la Nature. L'application des techniques développées dans ce travail de thèse à ces organismes devrait donc permettre d'identifier de nouvelles sélénoprotéines.

Dans un premier temps, il serait très important d'identifier les sélénoprotéines exprimées par les bactéries *Desulfococcus multivorans* et *Geobacter metallireducens* lors de la dégradation de composés aromatiques. Actuellement aucune voie métabolique ne rapporte l'implication de sélénoprotéines pour dégrader les composés aromatiques. Si les sélénoprotéines sont réellement impliquées dans ce type de biodégradation, des stratégies de traitement d'environnements pollués par les composés aromatiques pourraient être mises en place à partir, par exemple, de bactéries surexprimant les sélénoprotéines impliquées.

Les recherches en bioinformatique ont permis de définir des sélénoprotéomes procaryotes et eucaryotes ainsi que des organismes capables de synthétiser des sélénoprotéines. Ces informations restent des prédictions qui doivent être vérifiées par approches *in vitro*. Les approches développées dans cette thèse pourraient être appliquées à l'étude de ces organismes, et en particulier aux organismes procaryotes. Le choix des bactéries étudiées serait par exemple limité aux microorganismes cultivables répertoriés dans la banque de souche bactérienne DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Les conditions de culture permettant l'expression des sélénoprotéines pourraient être ainsi déterminées pour une meilleure compréhension des fonctions physiologiques jouées par les sélénoprotéines chez les bactéries.

Enfin, le sélénium possède un rôle bénéfique dans la santé humaine. Il apparaît alors important de déterminer si ce rôle est réellement supporté par des sélénoprotéines ou par d'autres composés séléniés. L'application de nos méthodes permettrait de mieux définir la relation entre les régimes alimentaires séléniés administrés à des sujets malades et sains et l'expression de sélénoprotéines chez ces sujets. Le but ultime serait de définir le(s) sélénoprotéine(s) impliquée(s) dans la prévention d'une maladie donnée (cancer...) et de quantifier le taux d'expression de ces sélénoprotéines. De telles informations contribueraient à mieux définir le rôle joué par les sélénoprotéines dans la santé humaine.

De telles études sur l'identification de nouvelles sélénoprotéines et de leurs fonctions biologiques permettraient d'expliquer les effets biologiques et médicaux du sélénium et d'identifier de nouveaux processus et voies métaboliques dépendants de cet élément.

Applications futures des méthodes développées : l'étude des métalloprotéines

La connaissance au niveau moléculaire de la réponse d'un organisme vivant au stress métallique est d'une importance cruciale. Les cibles protéiques des métaux (ex. protéines réceptrices, chélatantes, transporteurs) doivent être identifiées afin de mieux comprendre l'adaptation des organismes à ce stress. Les techniques développées au cours de ces travaux peuvent être appliquées à ce type d'investigation. Afin de préserver les complexes « métaux-protéines » très labiles, des électrophorèses en conditions non dénaturantes doivent être réalisées. Etant donné l'avancement des techniques de détection et d'identification, les efforts doivent maintenant être portés sur la préparation de l'échantillon pour préconcentrer les échantillons en métalloprotéines et sur l'amélioration des conditions électrophorétiques aboutissant à une séparation efficace des métalloprotéines tout en préservant leur intégrité.

Les résultats de cette thèse ouvrent donc des perspectives importantes pour la détection, l'identification et la quantification des métalloprotéines et des sélénoprotéines chez les êtres vivants ce qui *in fine* pourrait permettre de mieux comprendre le rôle joué par le sélénium et les métaux dans ces organismes.

CHAPITRE 5 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Pinsent, J. (1954) *Biochem J* 57, 10-6.
2. Schwarz, K., and Foltz, C. M. (1957) *Journal of the American Chemical Society* 79, 3292-3293.
3. Birringer, M., Pilawa, S., and Flohe, L. (2002) *Nat Prod Rep* 19, 693-718.
4. Hatfield, D. L., Berry, M. J., and Gladyshev, V. N. (2006) Selenium its molecular biology and role in human health, United States of America.
5. Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigo, R., and Gladyshev, V. N. (2003) *Science* 300, 1439-1443.
6. Kryukov, G. V., and Gladyshev, V. N. (2004) *EMBO Rep* 5, 538-43. Epub 2004 Apr 23.
7. Domon, B., and Aebersold, R. (2006) *Science* 312, 212-7.
8. Tinggi, U. (2003) *Toxicol Lett* 137, 103-10.
9. Weast, R. C. (Ed.) (1969) *Handbook of Chemistry and Physics*, Chemical Rubber Co., Cleveland, OH.
10. Mayland, H. F. (1994) in *Selenium in the Environment* (Frankenberger, J. W. T., and Benson, S., Eds.), pp. 69-118, Marcel Dekker, New York.
11. Simonoff, M., and Simonoff, G. (1991) (Masson, Ed.), pp. 242, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
12. Fishbein, L. (1983) *Fundamental and Applied Toxicology* 3, 411-419.
13. Fan, T. W., Teh, S. J., Hinton, D. E., and Higashi, R. M. (2002) *Aquat Toxicol* 57, 65-84.
14. Martens, D. A., and Suarez, D. L. (1997) *Environmental Science and Technology* 31, 133-139.
15. Frankenberger Jr, W. T., and Karlson, U. (1994) *Geomicrobiology Journal* 12, 265-278.
16. Dumont, E., Vanhaecke, F., and Cornelis, R. (2006) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385, 1304-1323.
17. Diels, L. (2002) *Industrial Bioprocessing* 24, 2-3.
18. Gadd, G. M. (2004) *Geoderma* 122, 109-119.
19. Fleming, R. W., and Alexander, M. (1972) *Appl Microbiol* 24, 424-9.
20. Doran, J. W., and Alexander, M. (1977) *Appl Environ Microbiol* 33, 31-37.
21. Oremland, R. S., Blum, J. S., Culbertson, C. W., Visscher, P. T., Miller, L. G., Dowdle, P., and Strohmaier, F. E. (1994) *Appl Environ Microbiol* 60, 3011-3019.
22. Stolz, J. F., Basu, P., Santini, J. M., and Oremland, R. S. (2006) *Annu Rev Microbiol* 60, 107-30.
23. Haygarth, P. M., Fowler, D., Sturup, S., Davison, B. M., and Jones, K. C. (1994) *Atmospheric Environment* 28, 3655-3663.
24. Moxon, A. L. (1937) *Dak. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.* 311, 1-91.
25. Peterson, P. J., and Butler, G. W. (1971) *Australian journal of biological sciences* 24, 175-177.
26. Fan, T. W. M., Higashi, R. M., and Lane, A. N. (1998) *Environmental Science and Technology* 32, 3185-3193.

27. Clark, R. F., Strukle, E., Williams, S. R., and Manoguerra, A. S. (1996) *Jama* 275, 1087-8.
28. Ohlendorf, H. M., Hothem, R. L., Aldrich, T. W., and Krynitsky, A. J. (1987) *Science of the Total Environment* 66, 169-183.
29. Ohlendorf, H. M., Hoffman, D. J., Saiki, M. K., and Aldrich, T. W. (1986) *Science of the Total Environment* 52, 49-63.
30. Hamilton, S. J. (2004) *Sci Total Environ* 326, 1-31.
31. Lemly, A. D. (2004) *Ecotoxicol Environ Saf* 59, 44-56.
32. Spallholz, J. E. (1997) *Biomed Environ Sci* 10, 260-70.
33. Kramer, G. F., and Ames, B. N. (1988) *Mutat Res* 201, 169-80.
34. Kitahara, J., Seko, Y., and Imura, N. (1993) *Arch Toxicol* 67, 497-501.
35. Shen, H. M., Yang, C. F., and Ong, C. N. (1999) *Int J Cancer* 81, 820-8.
36. Kessi, J., and Hanselmann, K. W. (2004) *J Biol Chem* 279, 50662-9.
37. Ge, K., and Yang, G. (1993) *Am J Clin Nutr* 57, 259S-263S.
38. Ip, C. (1998) *J Nutr* 128, 1845-54.
39. Irons, R., Carlson, B. A., Hatfield, D. L., and Davis, C. D. (2006) *J Nutr* 136, 1311-7.
40. Martin, A., and AFSSA (2001) (CNERNA, and CNRS, Eds.), pp. 605.
41. Yang, G., Zhou, R., Yin, S., Gu, L., Yan, B., Liu, Y., Liu, Y., and Li, X. (1989) *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease* 3, 77-87.
42. Leblanc, J. C., Verger, P., Guérin, T., and L., V. J. (2004), pp. 44-45, INRA
DGAL.
43. Rayman, M. P. (2004) *Br J Nutr* 92, 557-73.
44. Johansson, L., Gafvelin, G., and Arner, E. S. (2005) *Biochim Biophys Acta* 1726, 1-13.
45. Ching, W. M., Wittwer, A. J., Tsai, L., and Stadtman, T. C. (1984) *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 57-60.
46. Ching, W. M., and Stadtman, T. C. (1982) *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 374-7.
47. Tuve, T., and Williams, H. H. (1961) *J Biol Chem* 236, 597-601.
48. Zinoni, F., Birkmann, A., Leinfelder, W., and Bock, A. (1987) *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3156-60.
49. Turner, R. J., Weiner, J. H., and Taylor, D. E. (1998) *BioMetals* 11, 223-227.
50. Cowie, D. B., and Cohen, G. N. (1957) *Biochim Biophys Acta* 26, 252-61.
51. Sekowska, A., Kung, H. F., and Danchin, A. (2000) *J Mol Microbiol Biotechnol* 2, 145-77.
52. Muller, S., Heider, J., and Bock, A. (1997) *Arch Microbiol* 168, 421-7.
53. McConnell, K. P., and Hoffman, J. L. (1972) *Proc Soc Exp Biol Med* 140, 638-41.
54. Schrauzer, G. N. (2000) *J Nutr* 130, 1653-6.
55. Boles, J. O., Cisneros, R. J., Weir, M. S., Odom, J. D., Villafranca, J. E., and Dunlap, R. B. (1991) *Biochemistry* 30, 11073-80.
56. Bernard, A. R., Wells, T. N., Cleasby, A., Borlat, F., Payton, M. A., and Proudfoot, A. E. (1995) *Eur J Biochem* 230, 111-8.
57. Huber, R. E., and Criddle, R. S. (1967) *Biochim Biophys Acta* 141, 587-99.
58. Huber, R. E., and Criddle, R. S. (1967) *Arch Biochem Biophys* 122, 164-73.
59. Gromer, S., Eubel, J. K., Lee, B. L., and Jacob, J. (2005) *Cell Mol Life Sci* 62, 2414-37.
60. Muller, S., Senn, H., Gsell, B., Vetter, W., Baron, C., and Bock, A. (1994) *Biochemistry* 33, 3404-12.

61. Allmang, C., and Krol, A. (2006) *Biochimie* 88, 1561-71.
62. Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W., and Harrison, P. R. (1986) *The EMBO journal* 5, 1221-1227.
63. Zinoni, F., Birkmann, A., Stadtman, T. C., and Bock, A. (1986) *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4650-4.
64. Bock, A., and Stadtman, T. C. (1988) *BioFactors* 1, 245-250.
65. Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B., and Zinoni, F. (1991) *Mol Microbiol* 5, 515-20.
66. Berry, M. J., Tujebajeva, R. M., Copeland, P. R., Xu, X. M., Carlson, B. A., Martin Iii, G. W., Low, S. C., Mansell, J. B., Grundner-Culemann, E., Harney, J. W., Driscoll, D. M., and Hatfield, D. L. (2001) *BioFactors* 14, 17-24.
67. Forchhammer, K., Boesmler, K., and Bock, A. (1991) *Biochimie* 73, 1481-6.
68. Leinfelder, W., Forchhammer, K., Veprek, B., Zehelein, E., and Bock, A. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 543-7.
69. Veres, Z., Kim, I. Y., Scholz, T. D., and Stadtman, T. C. (1994) *J Biol Chem* 269, 10597-603.
70. Lacourciere, G. M. (1999) *Biofactors* 10, 237-44.
71. Low, S. C., Harney, J. W., and Berry, M. J. (1995) *J Biol Chem* 270, 21659-64.
72. Guimaraes, M. J., Peterson, D., Vicari, A., Cocks, B. G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Ferrick, D. A., Kastelein, R. A., Bazan, J. F., and Zlotnik, A. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15086-91.
73. Carlson, B. A., Novoselov, S. V., Kumaraswamy, E., Lee, B. J., Anver, M. R., Gladyshev, V. N., and Hatfield, D. L. (2004) *J Biol Chem* 279, 8011-7.
74. Namy, O., Rousset, J. P., Naphine, S., and Brierley, I. (2004) *Mol Cell* 13, 157-68.
75. Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M. A., and Bock, A. (1988) *Nature* 331, 723-725.
76. Bock, A. (2001) *Science* 292, 453-454.
77. Copeland, P. R. (2003) *Gene* 312, 17-25.
78. Low, S. C., and Berry, M. J. (1996) *Trends Biochem Sci* 21, 203-8.
79. Rother, M., Mathes, I., Lottspeich, F., and Bock, A. (2003) *J Bacteriol* 185, 107-14.
80. Obata, T., and Shiraiwa, Y. (2005) *J Biol Chem* 280, 18462-8.
81. Martin Iii, G. W., Harney, J. W., and Berry, M. J. (1996) *RNA* 2, 171-182.
82. Copeland, P. R., and Driscoll, D. M. (1999) *J Biol Chem* 274, 25447-54.
83. Copeland, P. R., and Driscoll, D. M. (2001) *Biofactors* 14, 11-6.
84. Fagegaltier, D., Hubert, N., Yamada, K., Mizutani, T., Carbon, P., and Krol, A. (2000) *Embo J* 19, 4796-805.
85. Caban, K., and Copeland, P. R. (2006) *Cell Mol Life Sci* 63, 73-81.
86. Small-Howard, A., Morozova, N., Stoytcheva, Z., Forry, E. P., Mansell, J. B., Harney, J. W., Carlson, B. A., Xu, X. M., Hatfield, D. L., and Berry, M. J. (2006) *Mol Cell Biol* 26, 2337-46.
87. Maiorino, M., Wissing, J. B., Brigelius-Flohe, R., Calabrese, F., Roveri, A., Steinert, P., Ursini, F., and Flohe, L. (1998) *Faseb J* 12, 1359-70.
88. Copeland, P. R., Fletcher, J. E., Carlson, B. A., Hatfield, D. L., and Driscoll, D. M. (2000) *Embo J* 19, 306-14.
89. Lescure, A., Fagegaltier, D., Carbon, P., and Krol, A. (2002) *Curr Protein Pept Sci* 3, 143-51.
90. Sawers, R. G. (2005) *Biochem Soc Trans* 33, 42-6.

91. Axley, M. J., Grahame, D. A., and Stadtman, T. C. (1990) *J Biol Chem* 265, 18213-8.
92. Boyington, J. C., Gladyshev, V. N., Khangulov, S. V., Stadtman, T. C., and Sun, P. D. (1997) *Science* 275, 1305-8.
93. Berg, B. L., Baron, C., and Stewart, V. (1991) *J Biol Chem* 266, 22386-91.
94. Berg, B. L., Li, J., Heider, J., and Stewart, V. (1991) *J Biol Chem* 266, 22380-5.
95. Berg, B. L., and Stewart, V. (1990) *Genetics* 125, 691-702.
96. Abaibou, H., Pommier, J., Benoit, S., Giordano, G., and Mandrand-Berthelot, M. A. (1995) *J Bacteriol* 177, 7141-9.
97. Sawers, G., Heider, J., Zehelein, E., and Bock, A. (1991) *J Bacteriol* 173, 4983-93.
98. Yamazaki, S. (1982) *J Biol Chem* 257, 7926-9.
99. Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1999) *Structure* 7, 557-66.
100. Stadtman, T. C. (1996) *Annu Rev Biochem* 65, 83-100.
101. Wagner, M., Sonntag, D., Grimm, R., Pich, A., Eckerskorn, C., Sohling, B., and Andreesen, J. R. (1999) *Eur J Biochem* 260, 38-49.
102. Sliwkowski, M. X., and Stadtman, T. C. (1988) *Biofactors* 1, 293-6.
103. Sliwkowski, M. X., and Stadtman, T. C. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 368-71.
104. Andreesen, J. R., Wagner, M., Sonntag, D., Kohlstock, M., Harms, C., Gursinsky, T., Jager, J., Parther, T., Kabisch, U., Grantzdorffer, A., Pich, A., and Sohling, B. (1999) *Biofactors* 10, 263-70.
105. Turner, D. C., and Stadtman, T. C. (1973) *Arch Biochem Biophys* 154, 366-81.
106. Rother, M., Resch, A., Wilting, R., and Bock, A. (2001) *BioFactors* 14, 75-83.
107. Jones, J. B., Dilworth, G. L., and Stadtman, T. C. (1979) *Arch Biochem Biophys* 195, 255-60.
108. Bock, A., and Rother, M. (2005) *Arch Microbiol* 183, 148-50.
109. Xu, X. M., Carlson, B. A., Irons, R., Mix, H., Zhong, N., Gladyshev, V. N., and Hatfield, D. L. (2007) *Biochem J* 404, 115-20.
110. Flohe, L., Gunzler, W. A., and Schock, H. H. (1973) *FEBS Lett* 32, 132-4.
111. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., and Hoekstra, W. G. (1973) *Science* 179, 588-90.
112. Hall, L., Williams, K., Perry, A. C., Frayne, J., and Jury, J. A. (1998) *Biochem J* 333 (Pt 1), 5-9.
113. Vernet, P., Rigaudiere, N., Ghyselinck, N., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1996) *Biochem Cell Biol* 74, 125-31.
114. Arthur, J. R. (2000) *Cell Mol Life Sci* 57, 1825-35.
115. Fu, Y., Cheng, W. H., Porres, J. M., Ross, D. A., and Lei, X. G. (1999) *Free Radic Biol Med* 27, 605-11.
116. Zimmermann, M. B., and Kohrle, J. (2002) *Thyroid* 12, 867-878.
117. Behne, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H., and Kohrle, J. (1990) *Biochem Biophys Res Commun* 173, 1143-9.
118. Behne, D., and Kyriakopoulos, A. (2001) *Annu Rev Nutr* 21, 453-73.
119. Kohrle, J. (1999) *Mol Cell Endocrinol* 151, 103-19.
120. Kohrle, J. (1999) *Biochimie* 81, 527-33.
121. Kohrle, J. (2000) *Rev Endocr Metab Disord* 1, 49-58.
122. Kohrle, J. (2000) *Cell Mol Life Sci* 57, 1853-63.
123. Schweizer, U., and Schomburg, L. (2005) *IUBMB Life* 57, 737-44.
124. Zhang, Y., Fomenko, D. E., and Gladyshev, V. N. (2005) *Genome biology* 6.

125. Zhong, L., Arner, E. S., and Holmgren, A. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5854-9.
126. Rundlof, A. K., Janard, M., Miranda-Vizuete, A., and Arner, E. S. (2004) *Free Radic Biol Med* 36, 641-56.
127. Rundlof, A. K., and Arner, E. S. (2004) *Antioxid Redox Signal* 6, 41-52.
128. Sun, Q. A., Kirnarsky, L., Sherman, S., and Gladyshev, V. N. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3673-8.
129. Bosl, M. R., Takaku, K., Oshima, M., Nishimura, S., and Taketo, M. M. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5531-4.
130. Motsenbocker, M. A., and Tappel, A. L. (1982) *Biochim Biophys Acta* 719, 147-53.
131. Eberle, B., and Haas, H. J. (1993) *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 7, 217-21.
132. Hill, K. E., Zhou, J., McMahan, W. J., Motley, A. K., Atkins, J. F., Gesteland, R. F., and Burk, R. F. (2003) *J Biol Chem* 278, 13640-6.
133. Mostert, V. (2000) *Arch Biochem Biophys* 376, 433-8.
134. Atkinson, J. B., Hill, K. E., and Burk, R. F. (2001) *Lab Invest* 81, 193-200.
135. Steinbrenner, H., Alili, L., Bilgic, E., Sies, H., and Brenneisen, P. (2006) *Free Radic Biol Med* 40, 1513-23.
136. Arteel, G. E., Mostert, V., Oubrahim, H., Briviba, K., Abel, J., and Sies, H. (1998) *Biol Chem* 379, 1201-5.
137. Fujii, M., Saijoh, K., Kobayashi, T., Fujii, S., Lee, M. J., and Sumino, K. (1997) *Gene* 199, 211-7.
138. Kryukov, G. V., Kryukov, V. M., and Gladyshev, V. N. (1999) *Journal of Biological Chemistry* 274, 33888-33897.
139. Lescure, A., Gautheret, D., Carbon, P., and Krol, A. (1999) *Journal of Biological Chemistry* 274, 38147-38154.
140. Kim, H. Y., and Gladyshev, V. N. (2004) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320, 1277-1283.
141. Kryukov, G. V., Kumar, R. A., Koc, A., Sun, Z., and Gladyshev, V. N. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4245-50.
142. Kim, H. Y., and Gladyshev, V. N. (2004) *Mol Biol Cell* 15, 1055-64.
143. Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M., and Branlant, G. (2005) *Biochim Biophys Acta* 1703, 231-8.
144. Castellano, S., Novoselov, S. V., Kryukov, G. V., Lescure, A., Blanco, E., Krol, A., Gladyshev, V. N., and Guigo, R. (2004) *EMBO Reports* 5, 71-77.
145. Zhang, Y., and Gladyshev, V. N. (2005) *Bioinformatics* 21, 2580-9.
146. Hu?ttenhofer, A., Westhof, E., and Bo?ck, A. (1996) *RNA* 2, 354-366.
147. Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealsen, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y. H., and Smith, H. O. (2004) *Science* 304, 66-74.
148. Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S., and Venter, J. C. (1996) *Science* 273, 1058-73.

149. Wilting, R., Schorling, S., Persson, B. C., and Bock, A. (1997) *Journal of Molecular Biology* 266, 637-641.
150. Halboth, S., and Klein, A. (1992) *Mol Gen Genet* 233, 217-24.
151. Sorgenfrei, O., Duin, E. C., Klein, A., and Albracht, S. P. (1997) *Eur J Biochem* 247, 681-7.
152. Vorholt, J. A., Vaupel, M., and Thauer, R. K. (1997) *Mol Microbiol* 23, 1033-42.
153. Driscoll, D. M., and Chavatte, L. (2004) *EMBO Rep* 5, 140-1.
154. Martin-Romero, F. J., Kryukov, G. V., Lobanov, A. V., Carlson, B. A., Lee, B. J., Gladyshev, V. N., and Hatfield, D. L. (2001) *J Biol Chem* 276, 29798-804.
155. Novoselov, S. V., Rao, M., Onoshko, N. V., Zhi, H., Kryukov, G. V., Xiang, Y., Weeks, D. P., Hatfield, D. L., and Gladyshev, V. N. (2002) *EMBO Journal* 21, 3681-3693.
156. Castellano, S., Lobanov, A. V., Chapple, C., Novoselov, S. V., Albrecht, M., Hua, D., Lescure, A., Lengauer, T., Krol, A., Gladyshev, V. N., and Guigo, R. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16188-93.
157. Lobanov, A. V., Delgado, C., Rahlfs, S., Novoselov, S. V., Kryukov, G. V., Gromer, S., Hatfield, D. L., Becker, K., and Gladyshev, V. N. (2006) *Nucleic Acids Res* 34, 496-505.
158. Lambert, A., Lescure, A., and Gautheret, D. (2002) *Biochimie* 84, 953-9.
159. Wischgoll, S., Heintz, D., Peters, F., Erxleben, A., Sarnighausen, E., Reski, R., Van Dorselaer, A., and Boll, M. (2005) *Mol Microbiol* 58, 1238-52.
160. Peters, F., Rother, M., and Boll, M. (2004) *J Bacteriol* 186, 2156-63.
161. Kenyon, G. L., DeMarini, D. M., Fuchs, E., Galas, D. J., Kirsch, J. F., Leyh, T. S., Moos, W. H., Petsko, G. A., Ringe, D., Rubin, G. M., and Sheahan, L. C. (2002) *Mol Cell Proteomics* 1, 763-80.
162. Tonella, L., Hoogland, C., Binz, P. A., Appel, R. D., Hochstrasser, D. F., and Sanchez, J. C. (2001) *Proteomics* 1, 409-23.
163. Wolters, D. A., Washburn, M. P., and Yates, J. R., 3rd (2001) *Anal Chem* 73, 5683-90.
164. Healthcare, G. (Ed.) (2004) *Handbook 2-D Electrophoresis, principles and methods*, Buckinghamshire, U.K.
165. Cull, M., and McHenry, C. S. (1990) *Methods Enzymol* 182, 147-53.
166. Jazwinski, S. M. (1990) *Methods Enzymol* 182, 154-74.
167. Bollag, D. M., and Edelstein, S. J. (1991) (Wiley-Liss, Ed.), New York.
168. Dignam, J. D. (1990) *Methods Enzymol* 182, 194-203.
169. Ames, G. F., and Nikaido, K. (1976) *Biochemistry* 15, 616-23.
170. Englard, S., and Seifter, S. (1990) *Methods Enzymol* 182, 285-300.
171. Guy, G. R., Philip, R., and Tan, Y. H. (1994) *Electrophoresis* 15, 417-40.
172. Tsugita, A., Kamo, M., Kawakami, T., and Ohki, Y. (1996) *Electrophoresis* 17, 855-65.
173. Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R., and Postel, W. (1982) *J Biochem Biophys Methods* 6, 317-39.
174. Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., and Lunardi, J. (1997) *Electrophoresis* 18, 307-16.
175. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-5.
176. Rabilloud, T., Strub, J. M., Luche, S., van Dorselaer, A., and Lunardi, J. (2001) *Proteomics* 1, 699-704.

177. Righetti, P. G. (2005) *J Chromatogr A* 1079, 24-40.
178. O'Farrell, P. H. (1975) *J Biol Chem* 250, 4007-21.
179. Kenrick, K. G., and Margolis, J. (1970) *Anal Biochem* 33, 204-7.
180. Go?rg, A., Weiss, W., and Dunn, M. J. (2004) *Proteomics* 4, 3665-3685.
181. Rabilloud, T. (2002) *Proteomics* 2, 3-10.
182. Gygi, S. P., and Aebersold, R. (2000) *Current Opinion in Chemical Biology* 4, 489-494.
183. Campostrini, N., Areces, L. B., Rappsilber, J., Pietrogrande, M. C., Dondi, F., Pastorino, F., Ponzoni, M., and Righetti, P. G. (2005) *Proteomics* 5, 2385-95.
184. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) *Anal Chem* 68, 850-8.
185. Gevaert, K., and Vandekerckhove, J. (2000) *Electrophoresis* 21, 1145-54.
186. Richert, S., Luche, S., Chevallet, M., Van Dorselaer, A., Leize-Wagner, E., and Rabilloud, T. (2004) *Proteomics* 4, 909-916.
187. Miller, I., Crawford, J., and Gianazza, E. (2006) *Proteomics* 6, 5385-408.
188. Edman, P., and Begg, G. (1967) *Eur J Biochem* 1, 80-91.
189. Lottspeich, F. (1999) *Angew Chem Int Ed Engl* 38, 2476-2492.
190. Griffiths, W. J., Jonsson, A. P., Liu, S., Rai, D. K., and Wang, Y. (2001) *Biochemical Journal* 355, 545-561.
191. Aebersold, R., and Mann, M. (2003) *Nature* 422, 198-207.
192. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M. (1989) *Science* 246, 64-71.
193. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., and Hillenkamp, F. (1987) *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 78, 53-68.
194. Aebersold, R. H., Leavitt, J., Saavedra, R. A., Hood, L. E., and Kent, S. B. (1987) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 6970-6974.
195. Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., and Yoshida, T. (1988) *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2, 151-153.
196. Glu?ckmann, M., and Karas, M. (1999) *Journal of Mass Spectrometry* 34, 467-477.
197. Niu, S., Zhang, W., and Chait, B. T. (1998) *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 9, 1-7.
198. Knochenmuss, R., and Zenobi, R. (2003) *Chemical Reviews* 103, 441-452.
199. Cotter, R. J. (1989) *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* 18, 513-532.
200. Vestal, M., and Juhasz, P. (1998) *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 9, 892-911.
201. Mamyrin, B. A., Karataev, V. I., Shmikk, D. V., and Zagulin, V. A. (1973) *Zh. Eksp. Theor. Fiz.* 64, 82-89.
202. Spengler, B., Kirsch, D., and Kaufmann, R. (1992) *Journal of Physical Chemistry* 96, 9678-9684.
203. Franzen, J., Frey, R., Holle, A., and Krauter, K.-O. (2001) *International Journal of Mass Spectrometry* 206, 275-286.
204. Horn, D. M., Peters, E. C., Klock, H., Meyers, A., and Brock, A. (2004) *International Journal of Mass Spectrometry* 238, 189-196.
205. Dole, M., Mack, L. L., Himes, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., and Alice, M. B. (1968) *J. Chem. Phys.* 49, 2240-2249.
206. Yamashita, M., and Fenn, J. B. (1984) *Journal of Physical Chemistry* 88, 4451-4459.
207. Yamashita, M., and Fenn, J. B. (1984) *Journal of Physical Chemistry* 88, 4671-4675.

208. Kebarle, P., and Peschke, M. (2000) *Analytica Chimica Acta* 406, 11-35.
209. Kebarle, P. (2000) *Journal of Mass Spectrometry* 35, 804-817.
210. Ho, Y., and Kebarle, P. (1997) *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 165-166, 433-455.
211. Stafford, G. C., Kelley, P. E., Syka, J. E. P., Reynolds, W. E., and Todd, J. F. J. (1984) *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 60, 85-98.
212. Olthoff, J. K., Lys, I. A., and Cotter, R. J. (1988) *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2, 171-175.
213. Henry, K. D., Williams, E. R., Wang, B. H., McLafferty, F. W., Shabanowitz, J., and Hunt, D. F. (1989) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 9075-9078.
214. Roepstorff, P., and Fohlman, J. (1984) *Biomedical Mass Spectrometry* 11, 601.
215. Biemann, K. (1990) *Methods in Enzymology* 193, 886-887.
216. Hunt, D. F., Henderson, R. A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A. L., Appella, E., and Engelhard, V. H. (1992) *Science* 255, 1261-1263.
217. Lane, C. S. (2005) *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 848-869.
218. Giusti, P., Schaumlöf, D., Preud'homme, H., Szpunar, J., and Lobinski, R. (2006) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21, 26-32.
219. Cavanagh, J., Benson, L. M., Thompson, R., and Naylor, S. (2003) *Anal Chem* 75, 3281-6.
220. Emmet, M. R., and Caprioli, R. M. (1994) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5, 605-613.
221. Wilm, M., and Mann, M. (1996) *Analytical Chemistry* 68, 1-8.
222. Fligge, T. A., Kast, J., Bruns, K., and Przybylski, M. (1999) *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 10, 112-118.
223. Dongre, A. R., Jones, J. L., Somogyi, A., and Wysocki, V. H. (1996) *Journal of the American Chemical Society* 118, 8365-8374.
224. Hernandez, P., Muller, M., and Appel, R. D. (2006) *Mass Spectrom Rev* 25, 235-54.
225. Kuster, B., Mortensen, P., Andersen, J. S., and Mann, M. (2001) *Proteomics* 1, 641-50.
226. Choudhary, J. S., Blackstock, W. P., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (2001) *Proteomics* 1, 651-67.
227. Apweiler, R., Bairoch, A., and Wu, C. H. (2004) *Curr Opin Chem Biol* 8, 76-80.
228. Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M. J., Natale, D. A., O'Donovan, C., Redaschi, N., and Yeh, L. S. (2004) *Nucleic Acids Res* 32, D115-9.
229. Bairoch, A., Apweiler, R., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M. J., Natale, D. A., O'Donovan, C., Redaschi, N., and Yeh, L. S. (2005) *Nucleic Acids Res* 33, D154-9.
230. Wu, C. H., Apweiler, R., Bairoch, A., Natale, D. A., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M. J., Mazumder, R., O'Donovan, C., Redaschi, N., and Suzek, B. (2006) *Nucleic Acids Res* 34, D187-91.
231. Schneider, M., Tognolli, M., and Bairoch, A. (2004) *Plant Physiol Biochem* 42, 1013-21.
232. Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R., Blatter, M. C., Estreicher, A., Gasteiger, E., Martin, M. J., Michoud, K., O'Donovan, C., Phan, I., Pilbout, S., and Schneider, M. (2003) *Nucleic Acids Res* 31, 365-70.

233. Henzel, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T., Wong, S. C., Grimley, C., and Watanabe, C. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5011-5.
234. James, P., Quadroni, M., Carafoli, E., and Gonnet, G. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* 195, 58-64.
235. Mann, M., Hojrup, P., and Roepstorff, P. (1993) *Biological Mass Spectrometry* 22, 338-345.
236. Pappin, D. J., Hojrup, P., and Bleasby, A. J. (1993) *Curr Biol* 3, 327-32.
237. Yates, J. R., 3rd, Speicher, S., Griffin, P. R., and Hunkapiller, T. (1993) *Anal Biochem* 214, 397-408.
238. Perkins, D. N., Pappin, D. J. C., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (1999) *Electrophoresis* 20, 3551-3567.
239. Carr, S., Aebersold, R., Baldwin, M., Burlingame, A., Clauser, K., and Nesvizhskii, A. (2004) *Mol Cell Proteomics* 3, 531-3.
240. Bradshaw, R. A. (2005) *Mol Cell Proteomics* 4, 1223-5.
241. Wilkins, M. R., Appel, R. D., Van Eyk, J. E., Chung, M. C., Gorg, A., Hecker, M., Huber, L. A., Langen, H., Link, A. J., Paik, Y. K., Patterson, S. D., Pennington, S. R., Rabilloud, T., Simpson, R. J., Weiss, W., and Dunn, M. J. (2006) *Proteomics* 6, 4-8.
242. Bluggel, M., Chamrad, D., and Meyer, H. E. (2004) *Curr Pharm Biotechnol* 5, 79-88.
243. Clauser, K. R., Baker, P., and Burlingame, A. L. (1999) *Anal Chem* 71, 2871-82.
244. Gattiker, A., Bienvenut, W. V., Bairoch, A., and Gasteiger, E. (2002) *Proteomics* 2, 1435-44.
245. Steen, H., and Mann, M. (2004) *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 699-711.
246. Mann, M., and Wilm, M. (1994) *Anal Chem* 66, 4390-9.
247. Ma, S., Hill, K. E., Burk, R. F., and Caprioli, R. M. (2005) *Journal of Mass Spectrometry* 40, 400-404.
248. Ma, S., Caprioli, R. M., Hill, K. E., and Burk, R. F. (2003) *J Am Soc Mass Spectrom* 14, 593-600.
249. Qiu, Y., Benet, L. Z., and Burlingame, A. L. (1998) *J Biol Chem* 273, 17940-53.
250. Mauri, P., Benazzi, L., Flohe, L., Maiorino, M., Pietta, P. G., Pilawa, S., Roveri, A., and Ursini, F. (2003) *Biol Chem* 384, 575-88.
251. Fan, T. W. M., Pruszkowski, E., and Shuttleworth, S. (2002) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17, 1621-1623.
252. Stone, S. F., Bernasconi, G., Haselberger, N., Makarewicz, M., Ogris, R., Wobrauschek, P., and Zeisler, R. (1994) *Biol Trace Elem Res* 43-45, 299-307.
253. Kyriakopoulos, A., Rothlein, D., Pfeifer, H., Bertelsmann, H., Kappler, S., and Behne, D. (2000) *J Trace Elem Med Biol* 14, 179-83.
254. Kyriakopoulos, A., Bertelsmann, H., Graebert, A., Hoppe, B., Kuhbacher, M., and Behne, D. (2002) *Ann N Y Acad Sci* 973, 289-92.
255. Chery, C. C., Dumont, E., Cornelis, R., and Moens, L. (2001) *Fresenius J Anal Chem* 371, 775-81.
256. Chen, C., Zhang, P., Hou, X., and Chai, Z. (1999) *Biochim Biophys Acta* 1427, 205-15.
257. Chery, C. C., Guenther, D., Cornelis, R., Vanhaecke, F., and Moens, L. (2003) *Electrophoresis* 24, 3305-3313.
258. Bukalis, K., Wolf, C., Behne, D., and Kyriakopoulos, A. (2007) *J Chromatogr A* 1155, 180-6.

259. Qu, X. H., Huang, K. X., Wu, Z. X., Zhong, S., Deng, L. Q., and Xu, H. B. (2000) *Biol Trace Elem Res* 77, 287-300.
260. Chai, Z. F., Zhang, Z. Y., Feng, W. Y., Chen, C. Y., Xu, D. D., and Hou, X. L. (2004) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19, 26-33.
261. Peng, A., Xu, Y., and Wang, Z. J. (1999) *Biological Trace Element Research* 70, 117-125.
262. Jayawickreme, C. K., and Chatt, A. (1988) *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Articles* 124, 257-279.
263. Zeisler, R., Greenberg, R. R., and Stone, S. F. (1988) *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 124, 47-63.
264. Hammel, C., Kyriakopoulos, A., Behne, D., Gawlik, D., and Bratter, P. (1996) *J Trace Elem Med Biol* 10, 96-102.
265. Ma, R., McLeod, C. W., Tomlinson, K., and Poole, R. K. (2004) *Electrophoresis* 25, 2469-77.
266. Chen, C., Zhao, J., Zhang, P., and Chai, Z. (2002) *Anal Bioanal Chem* 372, 426-30.
267. Sidenius, U., and Gammelgaard, B. (2000) *Fresenius J Anal Chem* 367, 96-8.
268. Che?ry, C. C., Chassaigne, H., Verbeeck, L., Cornelis, R., Vanhaecke, F., and Moens, L. (2002) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17, 576-580.
269. Vanhaecke, F., Resano, M., and Moens, L. (2002) *Anal Bioanal Chem* 374, 188-95.
270. Chassaigne, H., Che?ry, C. C., Bordin, G., and Rodriguez, A. R. (2002) *Journal of Chromatography A* 976, 409-422.
271. Chai, Z., Mao, X., Hu, Z., Zhang, Z., Chen, C., Feng, W., Hu, S., and Ouyang, H. (2002) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 372, 407-411.
272. Behne, D., Alber, D., and Kyriakopoulos, A. (2004) *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 259, 435-439.
273. Avoscan, L. (2007) in *Biologie structurale et nanobiologie*, pp. 244, Université Joseph Fourier Grenoble.
274. Weseloh, G., Ku?hbacher, M., Bertelsmann, H., O?zaslan, M., Kyriakopoulos, A., Kno?chel, A., and Behne, D. (2004) *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 259, 473-477.
275. Pickering, I. J., George, G. N., Van Fleet-Stalder, V., Chasteen, T. G., and Prince, R. C. (1999) *J Biol Inorg Chem* 4, 791-4.
276. Pickering, I. J., Wright, C., Bubner, B., Ellis, D., Persans, M. W., Yu, E. Y., George, G. N., Prince, R. C., and Salt, D. E. (2003) *Plant Physiol* 131, 1460-7.
277. Houk, R. S. (1980) *Analytical Chemistry* 52, 2283-2289.
278. Ammann, A. A. (2007) *Journal of Mass Spectrometry* 42, 419-427.
279. Gu?nther, D., and Hattendorf, B. (2005) *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 24, 255-265.
280. Durrant, S. F. (1999) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14, 1385-1403.
281. Sylvester, P. J. (2005) *Geostandards and Geoanalytical Research* 29, 41-51.
282. Hergenro?der, R. (2006) *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 61, 284-300.
283. Garcia, J. S., De Magalha?es, C. S., and Arruda, M. A. Z. (2006) *Talanta* 69, 1-15.
284. Geertsen, C., Briand, A., Chartier, F., Lacour, J.-L., Mauchien, P., Sjostrom, S., and Mermet, J.-M. (1994) *Journal of analytical atomic spectrometry* 9, 17-22.
285. Poitrasson, F., Mao, X., Mao, S. S., Freydier, R., and Russo, R. E. (2003) *Anal Chem* 75, 6184-90.

-
286. Shuttleworth, S. (1996) *Applied Surface Science* 96-98, 513-517.
287. Hemmerlin, M., and Mermet, J. M. (1996) *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 51, 579-589.
288. Figg, D., and Kahr, M. S. (1997) *Applied Spectroscopy* 51, 1185-1192.
289. Alexander, M. L., Smith, M. R., Hartman, J. S., Mendoza, A., and Koppelaar, D. W. (1998) *Applied Surface Science* 127-129, 255-261.
290. Motelica-Heino, M., and Donard, O. F. X. (2001) *Geostandards Newsletter* 25, 345-359.
291. Russo, R. E., Mao, X. L., Borisov, O. V., and Haichen, L. (2000) *Journal of analytical atomic spectrometry* 15, 1115-1120.
292. Guillong, M., Horn, I., and Gu?nther, D. (2003) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18, 1224-1230.
293. Horn, I., Gu?nther, D., and Guillong, M. (2003) *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 58, 1837-1846.
294. Hein, S. J., and Piepmeier, E. H. (1988) *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 7, 137-142.
295. Russo, R. E., Mao, X. L., Liu, C., and Gonzalez, J. (2004) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19, 1084-1089.
296. Koch, J., Von Bohlen, A., Hergenro?der, R., and Niemax, K. (2004) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19, 267-272.
297. Gonza?lez, J., Liu, C., Mao, X., and Russo, R. E. (2004) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19, 1165-1168.
298. Liu, C., Mao, X. L., Mao, S. S., Zeng, X., Greif, R., and Russo, R. E. (2004) *Analytical Chemistry* 76, 379-383.
299. Poitrasson, F., Mao, X., Mao, S. S., Freydier, R., and Russo, R. E. (2003) *Analytical Chemistry* 75, 6184-6190.
300. Russo, R. E., Mao, X., Gonzalez, J. J., and Mao, S. S. (2002) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17, 1072-1075.
301. Borisov, O. V., Mao, X. L., Fernandez, A., Caetano, M., and Russo, R. E. (1999) *Spectrochimica acta, Part B: Atomic spectroscopy* 54, 1351-1365.
302. Pe?cheyran, C., Cany, S., Chabassier, P., Mottay, E., and Donard, O. F. X. (2007) *Journal of Physics: Conference Series* 59, 112-117.
303. Kuhn, H. R., and Gunther, D. (2003) *Anal Chem* 75, 747-53.
304. Date, A. R., and Gray, A. L. (1981) *Analyst* 106, 1255-1267.
305. Mahoney, P. P., Ray, S. J., and Hieftje, G. M. (1997) *Applied Spectroscopy* 51.
306. Mahoney, P. P., Li, G., and Hieftje, G. M. (1996) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 11, 401-405.
307. Sturgeon, R. E., Lam, J. W. H., and Saint, A. (2000) *Journal of analytical atomic spectrometry* 15, 607-616.
308. Jakubowski, N., Moens, L., and Vanhaecke, F. (1998) *Spectrochimica acta, Part B: Atomic spectroscopy* 53, 1739-1763.
309. Koppelaar, D. W., Barinaga, C. J., and Smith, M. R. (1994) *Journal of analytical atomic spectrometry* 9, 1053-1058.
310. Milgram, K. E., White, F. M., Goodner, K. L., Watson, C. H., Koppelaar, D. W., Barinaga, C. J., Smith, B. H., Winefordner, J. D., Marshall, A. G., Houk, R. S., and Eyles, J. R. (1997) *Analytical Chemistry* 69, 3714-3721.

311. Neilsen, J. L., Abildtrup, A., Christensen, J., Watson, P., Cox, A., and McLeod, C. W. (1998) *Spectrochimica acta, Part B: Atomic spectroscopy* 53, 339-345.
312. Chassaigne, H., Che?ry, C. C., Bordin, G., Vanhaecke, F., and Rodriguez, A. R. (2004) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19, 85-95.
313. Dernovics, M., Giusti, P., and Lobinski, R. (2007) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 22, 41-50.
314. Schaumlo?ffel, D., Encinar, J. R., and obin?ski, R. (2003) *Analytical Chemistry* 75, 6837-6842.
315. Giusti, P., Lobinski, R., Szpunar, J., and Schaumlo?ffel, D. (2006) *Analytical Chemistry* 78, 965-971.
316. Tastet, L., Schaumloffel, D., Bouyssiere, B., and Lobinski, R. (2006) *Anal Bioanal Chem* 385, 948-53.
317. Eichler, B., and Pfennig, N. (1986) *Archives of Microbiology* 146, 295-300.
318. Ma, S., Hill, K. E., Burk, R. F., and Caprioli, R. M. (2003) *Biochemistry* 42, 9703-9711.
319. Encinar, J. R., Ouerdane, L., Buchmann, W., Tortajada, J., Lobinski, R., and Szpunar, J. (2003) *Analytical Chemistry* 75, 3765-3774.
320. Chen, G. T., Axley, M. J., Hacia, J., and Inouye, M. (1992) *Mol Microbiol* 6, 781-5.
321. Vogel, H. J. (1994) *Biochem Cell Biol* 72, 357-76.
322. Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2172-5.
323. Zhang, M., and Vogel, H. J. (1994) *J Mol Biol* 239, 545-54.
324. Arner, E. S., Sarioglu, H., Lottspeich, F., Holmgren, A., and Bock, A. (1999) *J Mol Biol* 292, 1003-16.
325. Johansson, L., Chen, C., Thorell, J. O., Fredriksson, A., Stone-Elander, S., Gafvelin, G., and Arner, E. S. (2004) *Nat Methods* 1, 61-6.
326. Gettins, P., Dyal, D., and Crews, B. (1992) *Arch Biochem Biophys* 294, 511-8.
327. Patterson, S. D., and Aebersold, R. (1995) *Electrophoresis* 16, 1791-814.
328. Avoscan, L., Collins, R., Carriere, M., Gouget, B., and Coves, J. (2006) *Appl Environ Microbiol* 72, 6414-6.
329. Russo, R. E., Mao, X. L., Gonzalez, J. J., and Mao, S. S. (2002) *J. Anal. Atom. Spectrom.* 17, 1072-1075.
330. Woodhead, J., Hergt, J., Shelley, M., Eggins, S., and Kemp, R. (2004) *Chemical Geology* 209, 121-135.
331. Hergenröder, R., Samek, O., and Hommes, V. (2006) *Mass Spectrom. Rev.* 25, 551-572.
332. Giusti, P., Schaumlo?ffel, D., Encinar, J. R., and Szpunar, J. (2005) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 20, 1101-1107.

Biosynthesis, purification and analysis of selenomethionyl calmodulin by gel electrophoresis-laser ablation-ICP-MS and capillary HPLC-ICP-MS peptide mapping following in-gel tryptic digestion

Guillaume Ballihaut,^{ab} Laure Tastet,^b Christophe Pécheyran,^b Brice Bouyssiére,^b Olivier Donard,^b Régis Grimaud^a and Ryszard Lobinski^{a,b,c}

^a Laboratoire d'Ecologie Moléculaire (Microbiologie), Avenue de l'Université, B.P. 1155, 64013 Pau, France

^b Laboratoire de Chimie Bio-inorganique Analytique et Environnement, CNRS UMR 5034, Hélio parc, 2 av. Pr. Angot, F-64053 Pau, France

^c Department of Analytical Chemistry, Warsaw University of Technology, ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, Poland

Received 17th January 2005, Accepted 23rd March 2005
First published as an Advance Article on the web 21st April 2005

A biosynthesis method was developed to produce a standard of a selenium-containing protein. It consisted of the expression of calmodulin in *Escherichia coli* culture in the presence of selenomethionine, which allowed the replacement of all methionine residues by selenomethionine. The resulting 17 kDa protein containing 8 selenomethionine residues was purified by two-step hydrophobic interaction chromatography. The selenomethionyl calmodulin was subsequently used to develop a method for the characterization of selenium-containing proteins (detected in the polyacrylamide gel by laser ablation-ICP-MS) by means of peptide mapping using capillary HPLC-ICP-MS. The monitoring of the ⁸⁰Se isotope using an ICP mass spectrometer equipped with a collision cell allowed as little as 0.3 pg as Se (1.3 ng ml⁻¹ in the analysed solution) to be detected in the gel. The band containing the protein of interest was excised, the protein was digested with trypsin and the Se-containing peptides were analyzed by capillary HPLC-ICP-MS. The sensitivity of the method was at least a factor of 5 higher than that of capillary LC-electrospray MS/MS in similar conditions. Some of the selenopeptides detected by capillary LC-ICP MS could nevertheless be identified by retention time matching using a set of peptides generated by trypsin digestion from the concentrated selenomethionyl calmodulin standard.

Introduction

The speciation of elements incorporated in proteins is becoming an emerging area of analysis. In its first manifestation it was usually achieved by the coupling of liquid chromatography with ICP-MS, a method extensively reviewed by Szpunar^{1,2} and Sanz-Medel.³ Size-exclusion and/or anion-exchange chromatography were commonly used as the separation techniques, but the metal-containing fractions detected also contained a significant number of other compounds and the identification of protein species was virtually never accomplished.

A breakthrough in protein-bound element speciation analysis (referring, according to the IUPAC definition,⁴ to individual species in contrast to vaguely defined fractions) became possible only after the wider application of separation techniques used in classical proteomics, such as gel electrophoresis and capillary HPLC, reviewed recently by Ma *et al.*⁵ and Wind and Lehmann,⁶ respectively. These separation techniques were followed by the parallel detection of the metal and the entire molecule by ICP-MS and electrospray MS/MS, respectively. A similar approach using capillary electrophoresis as the separation technique was also proposed for metallothioneins.⁷

The speciation of protein-bound selenium has excited particular interest because of its recognized essentiality in human nutrition and its putative cancer-prevention properties.^{8,9} The incorporation of selenium into proteins may lead to selenoproteins, which contain genetically encoded aminoacid selenocysteine, and to other Se-containing proteins in which selenomethionine replaces methionine non-specifically. To

date, most of the information on the presence and distribution of the Se-containing proteins was obtained by *in vivo* labeling with ⁷⁵Se-selenite, followed by separation of the proteins by gel electrophoresis and autoradiography of the labeled compounds.^{10,11} Although very sensitive, this method has the limitation of the need for radioactive tracers which precludes human studies and the characterization of the proteins detected. Hence, there is interest in alternative methods of the Se detection in gels which would not require labeling with radioactive elements.

Laser ablation ICP-MS was first applied to the scanning of the electrophoretic gels for selenium-containing proteins by Fan *et al.*¹² A number of Se-containing proteins in a waterfowl embryo and fish-ovary collected from Se-contaminated sites were revealed.¹² The method was later applied to the detection of glutathione peroxidase isolated from red blood cells,¹³ and extended to 2-D gels of selenized-yeast proteins.¹³ A recent comprehensive study by Chassaigne *et al.* gives a nice example of 2-D GE-LA-ICP-MS mapping of Se-containing proteins in a selenized yeast extract.¹⁴

Whereas laser ablation ICP-MS is a convenient method for the localization of a heteroatom-containing protein in a gel, the characterization and identification of the proteins detected remains a problem. Hammel *et al.* developed a method for the identification of selenomethionine and selenocysteine in protein bands, allowing one to distinguish between Se-containing and true selenoproteins.¹⁵ Chassaigne *et al.* published electrospray mass spectra of intact proteins collected from the spots in which selenium had been detected but the resolu-

tion of the ES-TOF-MS spectra was insufficient to prove whether the spectra did belong to proteins containing selenium.¹⁴ An alternative was the use of MALDI^{16,17} or ES-TOF-MS^{18,19} for the mapping of selenopeptides in the enzymatic digests of selenoproteins excised from the gel; the bands, however, had not been targeted for their selenium content.

A significant drawback in the area of speciation of Se-containing proteins is the non-availability of standards. This work therefore shows the development of a biosynthesis procedure of a selenomethionyl protein. The latter served for the development of a procedure allowing capillary HPLC-ICP-MS mapping of Se-containing peptides produced by in the gel digestion of a Se-containing protein detected by laser ablation ICP-MS.

Experimental

Chemicals, bacterial strain and growth media

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France) unless stated otherwise. Water from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA), resistivity > 18 M Ω cm was used throughout. Trypsin, dimethylated porcine, Proteomics Grade, was purchased from Sigma-Aldrich.

The bacterial *E. coli* MG1655 transformed with pVU1CaM plasmid was used to produce calmodulin.^{20,21}

Instrumentation

Cells were broken using a FRENCH pressure cell (Thermo Spectronic, New York, USA). A DNA Speed Vac (Model DNA120, Thermo Quest, NY, USA) was used for solvent evaporation.

Gel electrophoresis. 1-D SDS-PAGE was carried out with a Mini Protean 3 Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with 4% stacking gels and 12.5% resolving gels (8 × 7 × 0.75 cm).

Chromatography. All preparative chromatography steps were performed using an AKTA purifier 10 system (Amersham Biosciences AB, Sweden). Hydrophobic interaction chromatography was carried out using a Phenyl-Sepharose CL 4-B medium (20 ml) packed in a HR column (16 mm × 10 cm) and RESOURCE PHE column (6.4 mm id × 3 cm) purchased from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). Capillary HPLC separations were performed using a capillary HPLC system (Ultimate, Dionex, Sunnyvale, USA) providing a stable flow rate of less than 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. A 300- μm id reversed-phase capillary HPLC column (C₁₈ PepMap, 300 μm id × 15 cm, 3 μm , LC Packings, Sunnyvale, USA) with a flow rate of 4 $\mu\text{L min}^{-1}$ was used. Injections were made using an automated injection unit (Famos, Dionex), allowing reproducible sample injections either of 500 nL for cHPLC-ICP-MS or 1 μL for cHPLC-ESI-MS. All connections from the pump to the injection unit and from the injection unit to the column were made of fused silica capillaries (id 50 μm). The connection from the column to the nebulizer was made of a fused silica capillary (75 μm id, 280 μm od, LC Packings, Sunnyvale, USA) to keep the dispersion from the sample low.

ICP mass spectrometry. LA-ICP-MS analyses were carried out using an X7 Series CCT ICP MS system equipped with a collision cell and fitted with the Dual Mode Sample Introduction Kit for laser ablation (Thermo Electron, Winsford, UK). Laser ablation was performed using an LSX 100 system operating at 266 nm (CETAC, Omaha, NE). The ablated aerosol was introduced *via* a 70 cm tubing into the ICP-MS. The interface consisted of a two-inlet torch mixing the laser produced aerosol together with a liquid aerosol (nebulized by

means of a pneumatic concentric nebulizer) prior to introduction into the plasma. This dual flow introduction system allowed a complete and easy optimization of the LA ICP-MS coupling, and greatly improved the tuning procedure of the collision cell. Signal acquisition and processing were performed in transient signal mode using the TRA Profile session of PlasmaLab software (Thermo Electron).

Capillary HPLC-ICP-MS measurements were carried out using an Agilent Model 7500c (quadrupole instrument fitted with a collision cell) (Yokogawa Analytical Systems, Tokyo, Japan). The cHPLC-ICP-MS interface was described in detail elsewhere.²² Briefly, the column eluate was introduced into the ICP *via* a microflow total consumption nebulizer fitted with a low-dead-volume (8 cm³) spray chamber (DS-5 nebulizer, CETAC, Omaha, NE). The small dimensions of the nebulizer capillary (50 μm id, 180 μm od × 41 mm) resulted in a high-flow resistance, which allowed a stable flow in the microliter range (0.5–11 $\mu\text{L min}^{-1}$).

Electrospray ionisation MS and MS/MS. The calmodulin and SeMet-CaM mass spectra were obtained using an API 300 electrospray triple quadrupole mass spectrometer, Perkin-Elmer SCIEX (Thornhill, ON, Canada). The samples were introduced into the ionization source by means of a Harvard Apparatus Model 22 syringe pump. The cHPLC-ES-MS/MS experiments were carried out using a QSTAR XL quadrupole time-of-flight hybrid tandem mass spectrometer (AB/MDS-SCIEX) equipped with a micro-ionspray source. It uses a linearly accelerating high-pressure collision cell (LINAC) which can store and pulse a package of ions from the collision cell into the TOF in order to maximize the sensitivity for the Q-TOF system (pulsar mode). This allows a higher sensitivity and resolution to be obtained and improves mass accuracy. Analyst QS software was used to process data.

Procedures

Expression of selenomethionyl calmodulin. MG1655 pVU1-CaM was grown overnight at 37 °C in 100 ml of an *E. coli* growth medium known as LB or L-Broth, containing 1 g of tryptone, 0.5 g of yeast extract and 10 mg of ampicillin. Cells were centrifuged at 15000 rpm for 20 min. The pellet was washed with M9 medium and resuspended in one volume of the same medium. This cell suspension was used to inoculate 2 L of M9 medium supplemented with glucose (0.2% w/v) and ampicillin (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Cells were grown at 37 °C with shaking at 100 rpm. When the culture reached an optical density at 600 nm of 0.5, the expression of selenomethionyl calmodulin was induced by 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of isopropyl- β -thiogalactopyranosid (IPTG) and the simultaneous addition of L-SeMet at 1 mM. The expression of calmodulin was allowed for 3 h at 37 °C. Bacteria were harvested by centrifugation at 15000 rpm for 20 min. Cell pellets were stored at –80 °C.

Protein purification. Cell suspension and protein extracts were kept at 4 °C during the entire procedure. A quantity of 5.5 g of frozen cells (stored –80 °C) was thawed in 16.5 ml of extraction buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DNase). Cells were broken by one passage through a FRENCH press at 40000 psi. Insoluble material was removed by centrifugation at 15000 rpm for 30 min at 4 °C. The supernatant, hereafter referred to as crude extract, was supplemented with 5 mM CaCl₂ and incubated for 10 min on ice. Crude extract (15 ml) was applied at 1 ml min⁻¹ onto a Phenyl-Sepharose CL 4-B column equilibrated with buffer A (25 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM CaCl₂, 1 mM DTT). The column was washed with 40 ml of buffer A and 40 ml of buffer B (buffer A + 0.2 M KCl) to remove not covalently bound proteins.

SeMet-CaM was eluted with 100 ml of buffer C (25 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Thereafter, the column was washed with 40 ml of buffer A.

SeMet-CaM-containing fractions were supplemented with 5 mM CaCl₂ and loaded onto a RESOURCE PHE column previously equilibrated with buffer A. The column was run at 0.5 ml min⁻¹, washed with 4 ml of buffer A, and then with 4 ml of buffer B. SeMet-CaM was eluted with 5 ml of buffer C. The SeMet-CaM-containing fractions were stored at -80 °C. Proteins were detected at 280 nm. The presence and the purity of the SeMet-CaM were verified by SDS-PAGE as described below.

Gel electrophoresis. Gel electrophoresis was performed according to Laemmli.²³ Proteins were dissolved in 100 mM Tris buffer (pH 7.5) containing 2 mM EDTA, 4% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 0.02% (w/v) Bromophenol Blue and 5% (v/v) β-mercaptoethanol, heated for 5 min at 95 °C and loaded onto the gel. Electrophoresis was performed in 25 mM Tris containing 3.5 mM SDS and 192 mM L-glycine at 180 V for 45 min. After electrophoresis, the gel was rinsed with water, stained with 0.25 g l⁻¹ Coomassie Blue G-R250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) in 10% (v/v) acetic acid dissolved in 25% (v/v) methanol, de-stained in 10% (v/v) acetic acid and 25% (v/v) methanol and vacuum dried for 2 h on a filter paper. Saran wrap was laid on the top of the gel to protect it from contamination until analysis. After drying, the lane width was 6 mm.

Laser ablation-ICP-MS. With the dual sample introduction system used a key issue is the partition of the total carrier Ar gas flow (1 ml min⁻¹) between the ablation cell flow, ensuring a high transport efficiency, and the nebulizer carrier flow, sufficient to ensure the stable aerosol formation for the ICP-MS tuning. This was obtained for a nebulizer flow of 0.6 L min⁻¹ and an ablation cell flow of 0.4 L min⁻¹. The nebulization of the 1 ppb multielement tuning solution was then used to optimize the torch position, lens voltages, rf power, cooling, auxiliary flows and also to optimize mass calibration. The next step of optimization concerned the hexapole collision cell (CCT). Helium and hydrogen were introduced as the collision gases. The optimal He/H₂ ratio was optimized to obtain the lowest ⁴⁰Ar⁴⁰Ar⁺ background signal while maintaining the highest ¹¹⁵In signal. The quadrupole and hexapole bias were adjusted to provide the proper kinetic barrier to reduce ⁴⁰Ar⁴⁰Ar⁺ interference. A background signal of 200 s⁻¹ at *m/z* = 80 and a signal depletion of less than 20% at *m/z* = 115 were considered acceptable. The optimal CCT conditions are listed in Table 1.

The size of the ablation cell being limited to 5.3 cm internal diameter, 3.75 × 3.75 cm dry gel sections corresponding to the protein migration zone were cut for LA-ICP-MS analyses. Five 1-D SDS-PAGE lanes could be introduced simultaneously into the ablation cell. The paper side of the gel sections was fixed on a glass plate fitting into the ablation cell by means of a two-sided adhesive tape. This operation was required to prevent the gel from shrivelling up and to maintain a perfectly horizontal surface during laser ablation.

Each 1-D SDS-PAGE lane was completely and continuously scanned by the laser beam. The laser parameters (energy, repetition rate, scan speed, defocus) as well as the ICP-MS dwell time were optimized in order to obtain the best signal to noise ratio on the transient signal recorded on the selenium isotopes (⁷⁸Se, ⁸⁰Se and ⁸²Se) while ablating the protein of interest. During laser ablation of the gel, the plasma was kept in wet conditions by nebulizing a blank solution (1% HNO₃). The ablation line width was about 130 μm in the optimum conditions (Table 1). The intensity of the selenium signal was systematically normalized against the carbon concentration in

Table 1 LA-ICP-MS operating conditions

Laser parameters	
Laser	CETAC LSX 100
Wavelength	266 nm
Pulse energy	1 mJ
Pulse width	8 ns
Repetition rate	20 Hz
Defocus	100 μm
Ablation cell	
Ar gas flow	0.4 l min ⁻¹
Size, volume	5.3 cm internal diameter, 38 cm ³
Gel ablation zone	
Laser line width	130 μm
Laser line length	3.7 cm
Scan speed	60 μm s ⁻¹
ICP-MS parameters	
ICP-MS	X7 Serie CCT (Thermo Electron)
Dual sample introduction system	
Torch	2 inlets—internal injector diameter 1.5 mm
Nebulizer	Pneumatic concentric nebulizer 1 ml min ⁻¹
Spray chamber	Cooled impact bead (2 °C)
Nebulizer gas flow	0.6 L min ⁻¹
Rf power	1400 W
Auxiliary	0.8 l min ⁻¹
Cooling	15 l min ⁻¹
Cones	Nickel
[Isotopes] (Dwell time)	[77, 78, 80, 82] (110 ms) [52, 81] (10 ms)
Settle time	10 ms
CCT parameters	
H ₂	0.36 ml min ⁻¹
He	4 ml min ⁻¹
Pole bias	-0.5 V
Hexapole bias	8 V
Signal acquisition and processing	TRA profile mode (PlasmaLab)

order to correct for the laser drift (energy and focalization). An *m/z* of 52 (corresponding to ¹²C⁴⁰Ar) was used in order to preserve the ICP-MS detector from overloading, which would likely be caused by ¹²C or even ¹³C ion counts.

SeMet-CaM in-gel tryptic digestion. The procedure was based on the method by Aebersold *et al.*²⁴ The selenocalmodulin band was excised from the gel using a clean razor blade. The gel slice was washed twice by shaking with 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in 50% acetonitrile for 45 min each time to remove the Coomassie Blue stain. The gel slice was dehydrated for 10 min in 150 μl of acetonitrile and dried using a Speed Vac for 20 min at 30 °C. 10 μl of a trypsin solution at 1 mg ml⁻¹ in 50 mM acetic acid were prepared. This trypsin solution was diluted with 40 mM NH₄HCO₃ in 10% (v/v) acetonitrile containing 5 mM CaCl₂ to reach the final concentration of trypsin of 12.5 μg ml⁻¹. The gel slice was incubated in a minimal volume (20 μl) of the trypsin solution at 4 °C during 45 min. Digestion buffer (trypsin-free) was added to cover the gel slice completely for a further overnight incubation at 37 °C. The gel slice digest was then extracted three times by vortex mixing: once with 150 μl of water for 10 min and twice with 5% (v/v) TFA in 50% (v/v) acetonitrile, for 60 min each time. The

three extracts were pooled and Speed Vac dried for 4 h. The peptides were stored at -20°C .

Electrospray MS analysis of SeMet-CaM. Prior to electrospray MS analysis, SeMet-CaM solution was de-salted onto Zip Tip C4 pipette tips (Millipore, Billerica, MA) according to the producer guidelines and dried using a DNA Speed Vac (Model DNA120, Thermo Quest, NY, USA) for 4 h. The dry residue containing SeMet-CaM was dissolved in $100\ \mu\text{l}$ of 50% methanol. ES MS spectra were acquired (10 scans) in the range 800–2300 u using a 10 ms dwell time and a 0.1 u step size. The orifice potential was 40 V and the electrospray voltage was 5000 V.

Capillary LC-ICP-MS of SeMet-CaM after in-gel tryptic digestion. The mobile phases A and B were 0.1% TFA solutions in water and acetonitrile, respectively. Selenium-containing peptides were eluted using a gradient: 0–3 min 5% B isocratic, 3–10 min 5–20% B linear, 10–40 min 20–60% B linear, 40–41 min 60–90% B, 41–43 min 90% B isocratic. The ^{80}Se isotope was measured on-line by ICP-MS in order to detect selenium-containing peptides. ICP-MS measurement conditions (nebulizer gas flow, rf power and lens voltage) were optimized daily by using a multi-element solution (Li, Y and Tl) to find the best ICP-MS parameters with respect to torch position, lens voltages, rf power, mass calibration, cooling and auxiliary flows. For this purpose 0.5 ppb of the multi-element solution was added to the mobile phases A and B. In order to remove the $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^{+}$ interference, the H_2 flow rate in the collision cell was set to $3.5\ \text{ml}\ \text{min}^{-1}$, the value for the octopole bias was set to $-18\ \text{V}$, and the quadrupole bias to $-15\ \text{V}$. The sensitivity was optimized by adjusting the position of the nebulizer capillary tip in the nebulizer orifice while monitoring the intensity of the ^{89}Y signal.

Capillary LC-electrospray-Q-TOFMS of SeMet-CaM after in-gel tryptic digestion. For analysis with pneumatically assisted ESI, an electrospray voltage of 1100 V and a nitrogen sheath gas flow (1 psi) were employed. The MS spectra of the peptides were acquired in the range 160–2100 Da using 60 cycles of 1 s. Mass calibration and tuning were performed according to the manufacturer's recommendations. Fine tuning for ESI-MS of peptides and proteins was accomplished by infusion of a rennin substrate standard (ABS, CA).

Results and discussion

Choice and synthesis of a Se-containing protein standard

Selenium-containing proteins are not commercially available with the exception of selenoproteins, glutathione peroxidase and thioredoxine reductase which contain a single selenocysteine residue only. This leaves three ways to access selenium-containing protein standards: purification from a real-world sample; heterologous expression using a selenocysteine-coding UGA codon containing plasmid; or recombinant synthesis favoring the replacement of methionine by selenomethionine. Selenoproteins (selenocysteine-containing) were purified for ES/MALDI-MS analysis from serum (e.g., selenoprotein P)¹⁶ whereas the selenomethionine-containing SIP18 and HSP12 were purified from selenized yeast.²⁵ The purification procedures are tedious and pure protein is difficult to obtain in sufficient quantity. Regarding the true selenoprotein, encoding plasmids are difficult to access. This oriented our research towards methionine-rich proteins in which methionine could be replaced biosynthetically by selenomethionine.

The criteria taken into account during the search for a suitable protein included a large contribution of methionine,

its relatively uniform distribution throughout the protein sequence and the availability of a plasmid containing a gene coding for the protein, allowing its expression in an *E. coli* culture. These criteria are met by calmodulin (CaM), a 148-residue ubiquitous regulatory Ca-binding protein that activates a wide range of target proteins and enzymes.²⁶ CaM contains eight methionine residues which results in an extraordinarily high content of Met (6.1%) compared with the average abundance of methionine in proteins (1.5%). The methionine residues are fairly uniformly distributed as well. There are four of them in each lobe and one (M76) in the central linker region.²⁷ A pVU1 plasmid encoding a modified form of CaM and its controlling sequence is available.²⁰

The biosynthesis experiments aimed at the optimization of the growth of bacterial culture in a way such that selenium toxicity could be avoided and selenomethionine incorporation in the place of methionine maximized. The best results were obtained using selenomethionine and not selenite, and adding it at a point when the culture reached an absorbance of 0.5 at 600 nm.

Purification of the selenomethionyl calmodulin

The literature methods of the purification of calmodulin are based on hydrophobic interaction chromatography. In the presence of calcium a dumbbell-shaped structure with two lobes connected by a central linker region is modified by binding of four Ca^{2+} ions, leading to the exposure of a hydrophobic patch on each lobe, which contains a high percentage of methionine residues. Since wild-type CaM and SeMet-CaM were found to have very similar if not identical structures,²⁸ it was assumed that the property of calmodulin of binding to phenyl-Sepharose in a calcium dependent manner would also allow the purification of the SeMet-CaM from the bacterial culture. Phenyl-Sepharose CL-4B is based on cross-linked 4% agarose matrices with approximately 40 μmol phenyl groups per ml of gel. Prepacked RESOURCE PHE column contains phenyl hydrophobic ligands coupled to the monodispersed rigid polystyrene/divinylbenzene matrix.

The purification was carried out in two steps. In the first step, the crude supernatant was fractionated using hydrophobic interaction chromatography using a Phenyl-Sepharose medium. The protein fraction containing SeMet-CaM was further purified (from the concomitant proteins) using the high affinity in the presence of Ca^{2+} with the Phenyl-resource column while most of other proteins are eluted close to the column void using a 0.2 M KCl mobile phase. The enzyme adhered to phenyl resource under conditions of 5 mM CaCl_2 , while more than 95% of the soluble cellular proteins did not, as judged by absorbance measurements at 280 nm. The chromatogram shown in Fig. 1 demonstrates clearly that this affinity is broken by the addition of 1 mM EDTA, which results in the destruction of the CaM-Ca complex. SeMet-CaM elutes as a

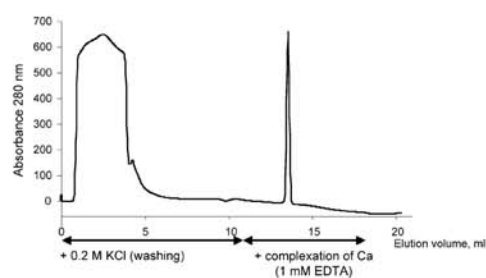


Fig. 1 Purification of selenomethionyl calmodulin by hydrophobic interaction chromatography.

single, sharp and symmetrical peak. The peak was collected and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ to serve as what is further referred to as the SeMet-CaM standard.

Verification of the purity and confirmation of the SeMet-CaM identity by electrospray MS

The identity of the proteins present in the SeMet-CaM peak in Fig. 2 was probed by use of electrospray MS. A corresponding mass spectrum (Fig. 2(a)) shows an envelope of multicharged peaks (+10 to +17). After deconvolution (Fig. 2(b)) two clusters of protein-related peaks can be seen, from 16627 to 16755 Da and from 17002 to 17130 Da, respectively.

Taking into account the molecular mass of calmodulin, 16627 Da (calculated *in silico*), the first cluster (16627–16755 Da) corresponds to the non-oxidized calmodulin (16627 Da) followed by 8 peaks each corresponding to the oxidized states of the methionine residues one to eight. The mass difference corresponds to CaM with methionine sulfoxide substituted for methionine residue. The second cluster (17002–17130 Da) corresponds to the selenized calmodulin. It includes the non-oxidized form (17002 Da), followed by the partly oxidized forms until the fully oxidized SeMet-CaM (17130 Da) is reached. These results show that only two proteins co-eluted (selenized and not selenized). No other proteins and no proteins in which only part of methionine residues could be substituted by selenomethionine could be detected. The presence of non-selenized calmodulin might be explained by its expression in the first part of the cell culture (absence of SeMet in the culture medium up to $A_{600} = 0.5$).

The hypothesis of the co-existence of two proteins only, non-selenized and fully selenized, is corroborated by the purity verification experiments using SDS-PAGE and Coomassie Blue staining. The electropherogram (Fig. 3) shows clearly two bands of different intensity (the lane corresponding to the separation of molecular weight markers was shown as well). Insufficient quantity of protein to produce a mass spectrum could be recovered from the gel. It should be noted that another possible origin of a second band is the reconstruction of the CaM-Ca²⁺ complex in the gel. Indeed, a calcium-dependent band shift was observed elsewhere for CaM during SDS-gel electrophoresis.²⁸ On the other hand, no proof that the selenized and non-selenized CaM could be separated by 1-D SDS PAGE was available elsewhere. Therefore, it is likely that both migrate together in the major band.

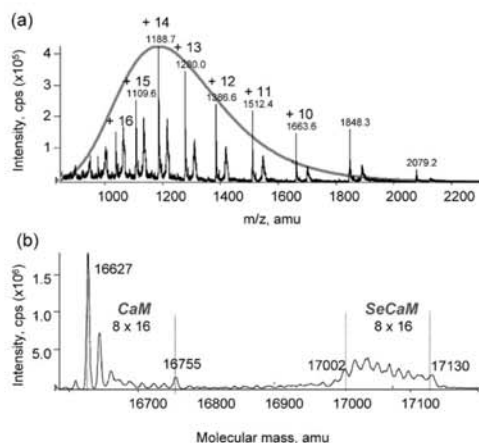


Fig. 2 Electrospray MS spectra of the collected fraction: (a) raw spectrum and (b) deconvoluted spectrum.

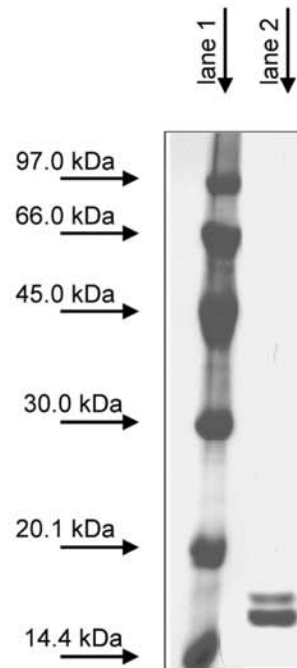


Fig. 3 Verification of the purity of the SeMet-CaM fraction purified by hydrophobic interaction chromatography (*cf.* Fig. 2). Left lane: molecular weight. Right lane: peak 1 from the chromatogram in Fig. 2. Gel load: 780 ng of SeMet-CaM.

Detection of SeMet-CaM in the gel by laser ablation-ICP-MS

The 1-D SDS-PAGE lanes were scanned with a laser followed by ICP-MS detection of selenium. Different plasma conditions (dry and wet) and different detection modes (⁷⁷Se, ⁷⁸Se, ⁸⁰Se, ⁸²Se detection with activated collision cell and ⁷⁷Se and ⁸²Se detection without collision cell) were used. The most sensitive detection was achieved when the ⁸⁰Se isotope was measured with the activated collision cell in wet plasma conditions.

A typical electropherogram (Coomassie Blue stained) with the corresponding laser ablation ICP-MS scan is shown in Fig. 4. It shows that only one band contains selenium, which eliminates the hypothesis that the second band could be due to a calcium-dependent band shift.

In order to establish a calibration curve a series of SeMet-CaM solutions was analyzed by 1-D SDS-PAGE with Coomassie Blue staining and LA-ICP-MS. The concentrations

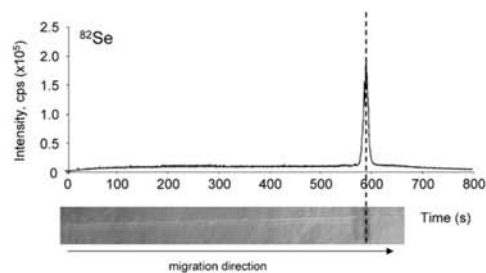


Fig. 4 A 1-D SDS-PAGE-laser ablation-ICP-MS electropherogram of the purified SeMet-CaM fraction gel load: 612 ng of SeMet-CaM.

investigated covered the range between 2.6 ng ml^{-1} (Se in the solution applied onto the gel) and 640 ng mL^{-1} in a way that the two consecutive points of the calibration curve differed in terms of concentration by a factor of 2. In terms of the absolute quantity of selenium and protein applied onto the gel, these concentrations covered the range between *ca.* 27 pg of Se and 6.7 ng of Se, and 1.8 ng of protein and 436 ng of protein, respectively. The LA-ICP-MS calibration curve in this range was linear ($r^2 = 0.9995$). The minimum concentration injected, 2.6 ng ml^{-1} of selenium, gave a signal *ca.* 6 times higher than the triple standard deviation of the blank (measured in a place in the gel where no selenium was detected). This corresponds to a detection limit of 1.3 ng ml^{-1} , 13 pg in the gel or 300 fg in terms of the absolute quantity of selenium detected. The least concentrated band detected in the gel by the Coomassie Blue staining procedure corresponded to the selenium concentration of 20 ng ml^{-1} , which was 10 times higher than that detectable with laser ablation-ICP-MS. The values obtained are also a few times lower than those reported elsewhere by use of similar techniques. Indeed, Chery *et al.* reported a detection limit of $0.07 \mu\text{g g}^{-1}$ gel with single hole drilling and $0.15 \mu\text{g Se g}^{-1}$ for ablation and translation using ICP-DRC-MS.¹³ Chassaingne *et al.* reported a limit of detection of 40 pg Se per band for 1-D PAGE (by ETV-ICP-MS²⁹ and 0.5 pg of Se per crater or 70 ng Se g^{-1} gel for 2-D PAGE-LA-ICP-MS.¹⁴

Selenium peptide mapping by capillary LC-ICP-MS

In all but one of the previous works selenium-containing proteins detected by laser ablation ICP-MS were not further investigated. Only Chassaingne *et al.* attempted the recovery of the intact proteins from 2-D gels of selenized yeast extracts for their further characterization by ES-MS.¹⁴ The MS spectra reported contained no evidence that the peaks belong to selenium proteins except that they were obtained for the spots in which selenium was detected.¹⁴ Our attempts to recover and detect the intact SeMet-CaM were unsuccessful. Therefore, we tried to extract the gel with a tryptic solution for peptide mapping by cHPLC-ES-MS/MS. The latter, however, turned out to be unsuccessful, probably because of insufficient peptide concentration or insufficient quantity injected onto the column.

In order to verify whether the protein could be digested and the selenopeptides recovered, the tryptic digest was analyzed by capillary HPLC-ICP-MS using the setup developed and described elsewhere.²² The chromatograms obtained for the two

bands excised from the gel and extracted with trypsin solution are shown in Fig. 5. A good quality Se-specific chromatogram could be obtained from the more intense protein band whereas no selenium peak was detected in a less intense band (note that the difference in the intensity of the Coomassie Blue stains of these bands does not explain such a behavior). This further corroborates the hypothesis that the less concentrated band was not due to any form of selenized calmodulin.

Identification of peaks in capillary LC-ICP-MS chromatograms

As mentioned above, the sensitivity of cHPLC-MS/MS was insufficient to identify the selenopeptides obtained in the tryptic digest of the SeMet-CaM band. Therefore, identification *via* retention time matching using a cHPLC-ICP-MS and cLC-ES-MS/MS chromatogram of a concentrated digest obtained for the pure (without gel electrophoresis) protein was attempted. An *in silico* digestion of SeMet-CaM produces 6 peptides containing selenium, two of which contain two selenomethionine residues (Table 1). All but two of these peptides can be identified by standard capillary LC-ES-MS/MS chromatography of a concentrated SeMet-CaM solution (chromatogram not shown).

The chromatograms obtained for the tryptic digest of the extract from the gel and of the concentrated SeMet-CaM solution are identical in the 0–20 min range. At longer retention times, no peak can be observed in the chromatogram of a gel extract whereas a number of peaks are still present in the cHPLC-ICP-MS chromatogram of a concentrated SeMet-CaM solution. They correspond to the intact protein, fragments of *ca.* 1.5–3 kDa corresponding to incompletely digested intermediate peptides and especially to the longest tryptic peptide (38–74, T5), which elutes at 23 min. It is clear that there is a molecular weight cut off value beyond which peptides cannot be recovered from the gel.

The correlation of data and retention time matching allow the unambiguous identification of the two most intense peaks in the chromatogram (peaks 2 and 3), corresponding to the peptides T14 and T13, respectively (*cf.* Table 2). Peak 1 corresponds either to T4 or to T12, which elute around this retention time. The assignment of peaks 4 and 5 is less evident. No SeMet-CaM related peak could be detected by electrospray MS in this area (the non-related peptides escaped the ES-MS/MS data acquisition program). The changing ratio of these peaks (contrary to the ratio of peaks 2 and 3, which was always

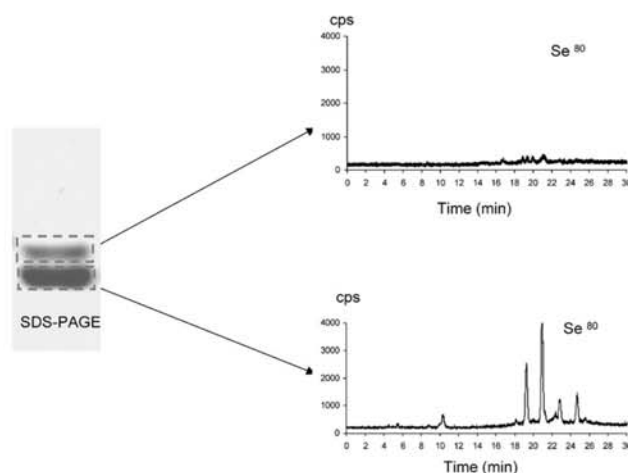


Fig. 5 Capillary HPLC-ICP-MS chromatogram of the bands excised from the gel and digested with trypsin. Peak identification: 1, ELGTVSeMR or HVSeMTNLGKE; 2, EADVDDGGQVNYEEFVQVSeMSMAK; 3, LTDEEVDSeMIR; 4, 5 miscleaved.

Table 2 Peptides produced by the *in silico* digestion of selenomethionyl calmodulin

Fragment number	Residues from-to	Average mass/Da	Sequence
1	1-13	1507.6044	ADQLTDEQIAEFK
2	14-21	956.0539	EAFSLFDK
3	22-30	906.9383	DGDGTTITK
4	31-37	851.8531	ELGTVSeMIR
5	38-74	4160.2023	SLGQNPTEAELQDSeMINEVDADGNGTIDFPEFLNLSemAR
6	75-75	146.1884	K
7	76-77	324.2794	SeMK
8	78-86	1065.0476	DTDSEELK
9	87-90	521.5691	EAFR
10	91-94	507.5823	VFDK
11	95-106	1249.3356	DGNGFISAAELR
12	107-115	1075.0826	HVSeMTNLGEK
13	116-126	1396.3644	LTDEEVDSeMIR
14	127-148	2568.4743	EADVVDGQVNYEEFVQVSeMSeMAK

the same (2 : 1) regardless of the experiment, suggests that peaks 4 and 5 are artifacts due to miscleavage.

Conclusions

A combined procedure based on 1-D GE-LA-ICP-MS and capillary LC-ICP-MS of the tryptic digest of the protein band from the gel was shown capable of detecting and fingerprinting selenium containing proteins at concentrations for which the classical procedure based on Coomassie Blue staining failed. The procedure developed compares favorably in terms of detection limits with capillary LC-electrospray-MS/MS. The calibration curve was still linear about one order of magnitude below the lowest detectable concentration by the classical methods. The analytical tools developed can be useful for the protein purity verification in microsamples, evaluation of the recovery from the gel and quantification of selenoproteins, although it is clear that for the latter a considerable effort in optimization of the preconcentration procedures prior to HPLC is still required. The availability of a Se-containing protein standard, of which the preparation was described in this work, is likely to facilitate further methodological developments.

Acknowledgements

The authors thank Suzanne Cany for her help with LA-ICP-MS measurements, Drs. Laurent Ouerdane and Hugues Preud'homme for their help with ES-MS/MS measurements and Pierre Giusti and Dr. Dirk Schaumlöffel for their help with capillary LC-ICP-MS. The financial support of the Aquitaine Region (CPER 20.6) is acknowledged.

References

- J. Szpunar, *Analyst*, 2000, **125**, 963.
- J. Szpunar, *Analyst*, 2005, **130**, 442.
- A. Sanz Medel, M. Montes Bayon and M. L. Fernandez Sanchez, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **377**, 236.
- D. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L. G. Danielsson, H. Muntau, H. P. van Leeuwen and R. Lobinski, *Pure Appl. Chem.*, 2000, **72**, 1453.
- R. L. Ma, C. W. McLeod, K. Tomlinson and R. K. Poole, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 2469.
- M. Wind and W. D. Lehmann, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 20.
- S. Mounicou, K. Polec, H. Chassaingne, M. Potin-Gautier and R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 635.
- A. J. Duffield-Lillico, M. E. Reid, B. W. Turnbull, G. F. Combs Jr., E. H. Slate, L. A. Fischbach, J. R. Marshall and L. C. Clark, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2002, **11**, 630.
- M. P. Rayman, *Lancet*, 2000, **356**, 233.
- D. Behne and A. Kyriakopoulos, *Annu. Rev. Nutr.*, 2001, **21**, 453.
- C. C. Chery, E. Dumont, R. Cornelis and L. Moens, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2001, **371**, 775.
- T. W. M. Fan, E. Pruszkowski and S. Shuttleworth, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, **17**, 1621.
- C. C. Chery, D. Günther, R. Cornelis, F. Vanhaecke and L. Moens, *Electrophoresis*, 2003, **24**, 3305.
- H. Chassaingne, C. C. Chery, G. Bordin and A. R. Rodriguez, *J. Chromatogr. A*, 2002, **976**, 409.
- C. Hammel, A. Kyriakopoulos, U. Rosick and D. Behne, *Analyst*, 1997, **122**, 1359.
- S. Ma, K. E. Hill, R. F. Burk and R. M. Caprioli, *Biochemistry*, 2003, **42**, 9703.
- S. Ma, R. M. Caprioli, K. E. Hill and R. F. Burk, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, **14**, 593.
- L. H. Fu, X. F. Wang, Y. Eyal, Y. M. She, L. J. Donald, K. G. Standing and G. Ben-Hayyim, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 25983.
- A. T. Bauman, D. A. Malencik, D. F. Barofsky, E. Barofsky, S. R. Anderson and P. D. Whanger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, **313**, 308.
- T. A. Craig, D. M. Watterson, F. G. Prendergast, J. Haiech and D. M. Roberts, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 3278.
- C. T. Chung, S. L. Niemela and R. H. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86**, 2172.
- D. Schaumlöffel, J. Ruiz Encinar and R. Lobinski, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 6837.
- U. K. Laemmli, *Nature*, 1970, **227**, 680.
- R. H. Aebersold, J. Leavitt, R. A. Saavedra, L. E. Hood and S. B. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84**, 6970.
- J. R. Encinar, L. Ouerdane, W. Buchmann, J. Tortajada, R. Lobinski and J. Szpunar, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 3765.
- H. J. Vogel, *Biochem. Cell Biol.*, 1994, **72**, 357.
- Y. S. Babu, C. E. Bugg and W. J. Cook, *J. Mol. Biol.*, 1988, **204**, 191.
- M. Zhang and H. J. Vogel, *J. Mol. Biol.*, 1994, **239**, 545.
- C. C. Chery, H. Chassaingne, L. Verbeeck, R. Cornelis, F. Vanhaecke and L. Moens, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **2002**, 576.

Multitechnique mass-spectrometric approach for the detection of bovine glutathione peroxidase selenoprotein: focus on the selenopeptide

Guillaume Ballihaut · Sandra Mounicou · Ryszard Lobinski

Received: 29 December 2006 / Revised: 2 March 2007 / Accepted: 9 March 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Glutathione peroxidase (isolated from bovine erythrocytes) and its behaviour during alkylation and enzymatic digestion were studied by various hyphenated techniques: gel electrophoresis–laser ablation (LA) inductively coupled plasma (ICP) mass spectrometry (MS), size-exclusion liquid chromatography–ICP MS, capillary high-performance liquid chromatography (capHPLC)–ICP MS, matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) MS, electrospray MS, and nanoHPLC–electrospray ionization (ESI) MS/MS. ESI TOF MS and MALDI TOF MS allowed the determination of the molecular mass but could not confirm the presence of selenium in the protein. The purity of the protein with respect to selenium species could be evaluated by LA ICP MS and size-exclusion chromatography (SEC)–ICP MS under denaturing and nondenaturing conditions, respec-

tively. SEC–ICP MS and capHPLC–ICP MS turned out to be valuable techniques to study the enzymolysis efficiency, miscleavage and artefact formation during derivatization and tryptic digestion. For the first time the parallel ICP MS and ESI MS/MS data are reported for the selenocysteine-containing peptide extracted from the gel; capHPLC–ICP MS allowed the sensitive detection of the selenopeptide regardless of the matrix and nanoHPLC–electrospray made possible its identification.

Keywords Glutathione peroxidase · Selenoprotein · Speciation · Capillary high-performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry · Electrospray mass spectrometry

Introduction

Selenium is known to develop its biological activity via a selenocysteine residue in the catalytically active centre of selenoproteins. The cellular cytosolic glutathione peroxidase (GPx) was the first enzyme recognized as a selenoprotein [1, 2]. The selenium-dependent GPx family has four members (GPx-1–GPx-4) which protect the cell against the deleterious effects of peroxides and hydroperoxides [3]. GPx-1 is an antioxidant in the cell cytosol and is likely to be one of the major antioxidant proteins in mammals. It is a tetrameric glycoprotein with four identical subunits, each of which contains one selenocysteine amino acid residue with a total molecular mass of 22–23 kDa [4]. GPx-2 and GPx-3 are antioxidants found in the gastrointestinal tract and blood plasma, respectively [5–7]. In contrast to the tetrameric structure of the other GPxs, GPx-4 is a monomer (20–22 kDa) referred to as a phospholipid hydroperoxide GPx (PHGPx) [8, 9].

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-007-1257-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

G. Ballihaut · S. Mounicou · R. Lobinski (✉)
Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement (UMR 5034),
Hélioparc, 2, av. Pr. Angot,
64053 Pau, France
e-mail: ryszard.lobinski@univ-pau.fr

G. Ballihaut
Laboratoire d'Ecologie Moléculaire (Microbiologie),
Université de Pau et des Pays de l'Adour,
av. de l'Université, B.P. 1155, 64013 Pau, France

R. Lobinski
Department of Chemistry,
Warsaw University of Technology,
00-664 Warszawa, Poland

The analytical methods for GPx determination are based on its enzymatic activity and only a few studies have indicated the correlation with the selenium status. Gladyshev et al. [10] reported the depletion of the GPx activity in HIV-infected persons and the appearance of low molecular weight seleno compounds. A recent study indicated a correlation of the plasma GPx activity with selenium level; however ELISA methods appeared to overestimate significantly the true plasma GPx concentration [11]. As the selenium atom is prone to oxidation, the stability of the most common selenoproteins GPx and SelP, is under investigation. The conversion of selenocysteine to dehydroalanine was demonstrated as a consequence of the oxidation to selenoxide and then elimination of seleninic acid [12]. In addition, the methods based on the enzymatic activity may be interfered with other GPx forms, such as, an epididymis-specific GPx (GPx-5) and an odorant metabolizing protein (GPx-6). They show a considerable structural similarity with GPx-1 but are not selenoenzymes because their active sites contain cysteine instead of selenocysteine [13, 14].

The above reasons spur interest in the protein-specific detection methods based on the selenium concentration. They are usually based on the combination of liquid chromatography (LC) or gel electrophoresis with inductively coupled plasma (ICP) mass spectrometry (MS) [15]. The size-exclusion LC-ICP MS data are sometimes difficult to interpret because of the insufficient efficiency of separation of GPx from other selenium-containing proteins [16–19]:

Gel electrophoresis protocols, commonly used in proteomics owing to the high-resolution power, are increasingly used to investigate selenoproteins. Whereas laser ablation ICP MS is rapidly developing for detection of selenoproteins in gels [20–24], further characterization of the spots or bands is difficult. The advances in capillary high-performance liquid chromatography (HPLC)ICP MS coupling allowed specific peptide mapping in the tryptic digests of proteins extracted from gel bands [22] or spots [21] but electrospray ionization (ESI) MS identification attempts were unsuccessful. The electrospray mass spectra of intact proteins collected from the spots in which selenium had been detected were reported but the identification of the proteins failed [24]. Molecular-mass spectrometric data from matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) [25] and ESI MS [26] relevant to GPx and the related selenopeptide are relatively scarce, and the behaviour of GPx during chromatography and enzymatic digestion has been poorly investigated. GPx isolated from bovine erythrocytes was detected by laser ablation ICP MS but was not further characterized [23].

The goal of this study was the investigation of the potential of chromatography and gel electrophoresis with the parallel ICP MS and ESI MS/MS detection to study

bovine GPx. This dual-type MS approach, which was recently reported to be successful for the characterization of selenomethionine-rich proteins in yeast [27] and Brazil nuts [28], was adopted.

Experimental

Instrumentation, sample and reagents

The instrumentation used was described elsewhere [22, 27–29]. The GPx (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) preparation (4.2 mg solid) with an activity of 123 units/mg solid and 673 units/mg protein was dissolved in 1 mL of 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride containing 1 mM DTT (pH 7.5). The selenium concentrations, determined in an aliquot of these solutions by ICP MS and according to the standard addition method, were 1.7 ± 0.1 $\mu\text{g/mL}$. All reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich unless specified otherwise. Water (18 M Ω cm) was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Procedures

Alkylation of GPx

A 0.5-mL aliquot of the GPx solution containing DTT (about 0.61 mg protein) was incubated in 1 mL of 5.4 M urea containing 3 μL of 0.125 M DTT for 2 h. Then, a 12- μL aliquot of 0.125 M iodoacetamide solution was added and the solution was left to stand for 1.5 h to let the alkylation reaction (carboxymethylation) proceed. The unreacted iodoacetamide was destroyed by addition of 12 μL DTT and incubation for 40 min. The selenium concentration, determined in an aliquot of this solution by ICP MS using the method of standard additions was 0.96 ± 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

NanoESI-time-of-flight MS and MALDI-time-of-flight MS of intact GPx

A 2- μL aliquot of GPx solution was mixed with 38 μL of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA; Fluka, Buchs, Switzerland) in 30% (v/v) acetonitrile (Riedel-de Haën) for nonalkylated and alkylated protein. A spray capillary was loaded with 6 μL of this solution and N₂ gas was used to supply pressure to the spray capillary. The nanospray voltage was 1,200 V. The MS spectra were acquired in the range 800–1,800 Da. The time-of-flight (TOF) mass analyser was calibrated using a renin substrate standard ($M_r=1,757.9$). For MALDI, 1 μL of protein solution was mixed with 9 μL of 10 mg sinapinic acid (LaserBio Labs, Sophia Antipolis, France) in 30% acetonitrile (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier,

France), 0.3% TFA. A 1- μ L aliquot of the mixture was placed onto the target plate, as described elsewhere [25].

Size-exclusion chromatography–ICP MS of alkylated GPx

A 100- μ L aliquot of sample was injected and seleno compounds were eluted using a mobile phase of 200 mM ammonium acetate at pH 7.8 at a flow rate of 0.7 mL/min. Superdex 200 HR 10/30 (10 mm \times 300 mm \times 13 μ m) and Superdex peptide 10/300 GL (10 mm \times 300 mm \times 13 μ m) columns (Pharmacia, Uppsala, Sweden) were used for the separation of the protein and its tryptic digest, respectively. The Superdex 200 column was calibrated using thyroglobulin (M_r =670,000), selenocalmodulin (M_r =17,000) and selenocysteine (M_r =334).

Tryptic digestion of alkylated GPx

A 500- μ L aliquot of alkylated GPx was diluted ten times with water in order to reduce the urea concentration to 0.6 M. A 3- μ L aliquot of 1 mg/mL trypsin solution was added to obtain a trypsin-to-protein ratio of 1:40 (w/w). The digestion was carried out overnight at 37 °C. The reaction was stopped by adding 5 μ L acetic acid. The sample volume was reduced to 100 μ L using a “speed vac system”. A 30- μ L aliquot of the sample was injected into the peptide size-exclusion column coupled to the ICP MS system in order to check the selenium profile of the tryptic digest. A 70- μ L aliquot of the sample was injected and the selenium fraction corresponding to the digested protein was collected, dried with a speed vac system and resolubilized in 10 μ L water. Respectively 2- and 3- μ L aliquots were analysed by reversed-phase HPLC with parallel ICP MS and ESI MS/MS detection.

Gel electrophoresis

The 1D sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis–laser ablation ICP MS conditions were described in detail elsewhere [22]. The in-gel digestion procedure was similar to that described by Tastet et al. [21]. The tryptic digest was then analysed by capillary HPLC–ICP MS [21] and nanoHPLC–ESI MS/MS [27, 28].

Results and discussion

Characterization of the GPx preparation (entire protein) by ESI TOF MS and MALDI TOF MS

The electrospray mass spectrum (not shown) shows a dominant protein with a molecular mass of 21,512 kDa. The molecular mass was confirmed by MALDI–TOF MS (21,513 kDa). The mass corresponds to the monomer; small

peaks of the oligomers up to the tetramer were present in the MALDI spectrum.

The amino acid sequence of the bovine GPx-1 GPx1_BOVIN (UniProtKB/Swiss-Prot P00435) MCAAQRSAAAL A A A A P R T V Y A F S A R P L A G G E P F N L SSLRGKVLLIENVASLZGTTVRDYTQMNDLQRRLLGPRGLVVLGFPCNQFGHQENAKNEEILNCLKYVRP G G G F E P N F M L F E K C E V N G E K A H P L F A F L REVLPSPDDATALMTDPKFITWSPVCRNDVSWN FEKFLVGPDPVPRRYSRRFLTID IEPDIETLLSQ GASA (where Z denotes selenocysteine) gives an average molecular mass of GPx protein of 22,658.67 Da, which is 1,145.6 Da higher than the measured value. This value corresponds to the loss of 12 N-terminal residues MCAAQRSAAALA (theoretical 1,146.371 Da) that was reported (without MS data support) to occur during proteolysis [30].

The alkylation with iodoacetamide of the truncated selenoprotein gives a theoretical molecular mass of 21,798 Da, which is identical to the mass of the alkylated protein measured by ESI MS (Fig. 1a, inset). The MALDI MS measurement gives a close experimental value of 21,803.4 Da. The detection of three oligomers (42,974, 64,777, and 85,000 Da) in the nonalkylated GPx solution suggests that they are formed in the MALDI source, whereas the only oligomer (43,467 Da) observed in the alkylated GPx solution is rather due to an incomplete denaturation of the selenoprotein.

Neither the ESI MS nor the MALDI measurements allow the confirmation of the presence of selenium. No other protein can be detected either.

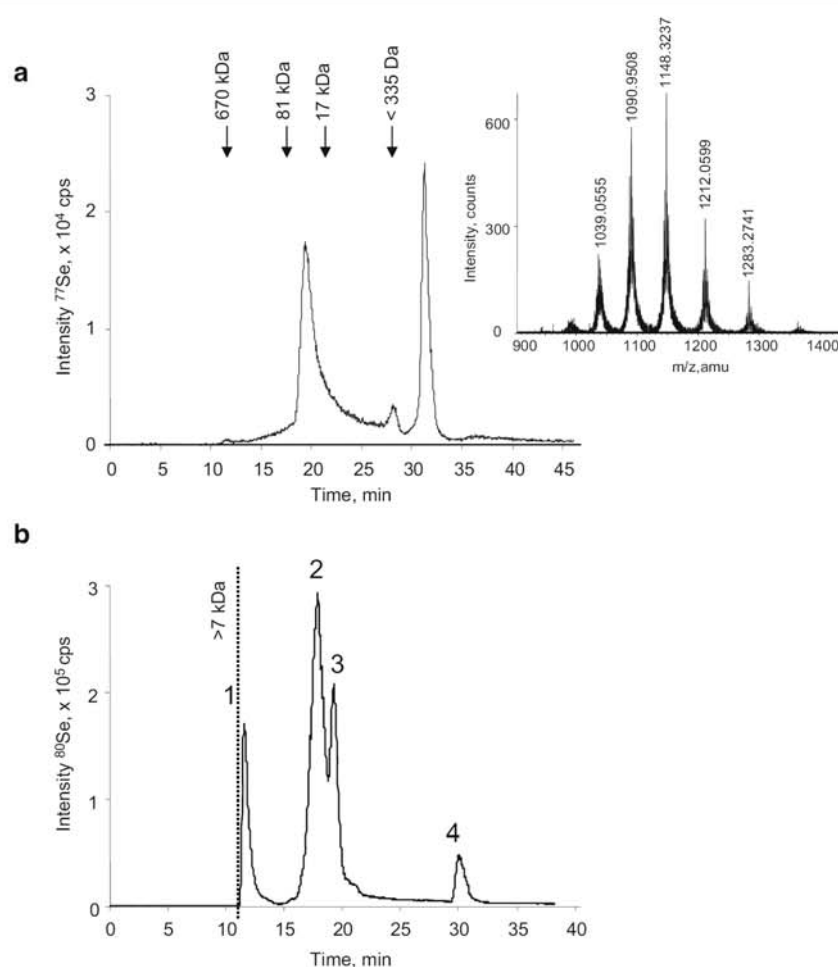
The purity of the GPx preparation was investigated by size-exclusion chromatography (SEC)–ICP MS after derivatization by carboxymethylation. The SEC–ICP MS analysis of alkylated GPx (Fig. 1a) shows two major and one minor selenium-containing compound. The major peaks correspond to the carboxymethylated protein and the selenite lost. Taking into account the quantitative (98%) column recovery and the peak area percentage, the chromatogram allows the estimation of the efficiency of the carboxymethylation to be less than 50%.

The carboxylated GPx was further investigated by tryptic digestion and chromatography.

Speciation of selenium in the tryptic digest of carboxymethylated GPx

The size-exclusion LC–ICP MS chromatogram (Fig. 1b) shows four peaks and suggests an incomplete derivatization reaction (theoretically only one peak corresponding to the VLLIENVASLZGTTVR carboxymethylated peptide should be obtained). The first peak corresponds to the undigested GPx and the last one to Se(IV) (by elution-volume matching). Taking into account the two peaks in the middle

Fig. 1 Verification of **a** the efficiency of the glutathione peroxidase (GPx) derivatization by size-exclusion chromatography (SEC)–inductively coupled plasma (ICP) mass spectrometry (MS) (^{77}Se) and **b** the efficiency of the tryptic digestion of the carboxymethylated protein by SEC–ICP MS (^{80}Se). Data obtained for about 1 nmol protein. The electrospray ionization mass spectrum of alkylated GPx is given in the *inset*. The molecular mass of alkylated GPx was estimated to be $21,798.93 \pm 0.07$ Da (three most intense multicharged peaks)



of the chromatogram, we assessed the digestion efficiency to be 78%. The estimation is based on the peak area taking into account the quantitative (more than 98% measured) recovery of selenium from the column. The identity of these two peaks was investigated by reversed-phase HPLC coupled in parallel to ICP MS and ESI MS/MS.

Capillary reversed-phase HPLC–ICP MS shows that peak 3 (Fig. 2a) can be considered as chromatographically pure as the peak area accounts for 90% of the selenium injected. The nanoHPLC–ESI MS/MS data show the presence of the VLLIENVASLZGTTVR peptide which should theoretically result from the GPx. Peak 2 contains a mixture of compounds as demonstrated by capillary HPLC–ICP MS (Fig. 2b). The analysis of nanoHPLC–ESI MS/MS data for this sample indicates the presence of two selenium isotopic envelopes, one corresponding to the VLLIENVASLZGTTVR peptide and one corresponding

to a product of enzymatic miscleavage containing two amino acid residues (Gly-Lys) more. The sequences of the peptides and the b and y ions on the bases for which they were determined are shown in the Fig. S1. No other compounds observed by ICP MS detection could be detected in electrospray MS/MS spectra.

The above data demonstrate the possibility of correlation of ICP MS and electrospray MS/MS data obtained by capillary HPLC in different conditions and the complementarity of these techniques. Owing to the high sensitivity and matrix independence, ICP MS detection allows the determination of the number of selenopeptides that should be found in nanoHPLC–electrospray MS data but, as shown in Fig. 2, some of the species can be missed by electrospray detection. Note also that under the theoretically identical instrumental conditions the same selenopeptide can appear as a doubly charged or as a triply charged ion in different chromatograms.

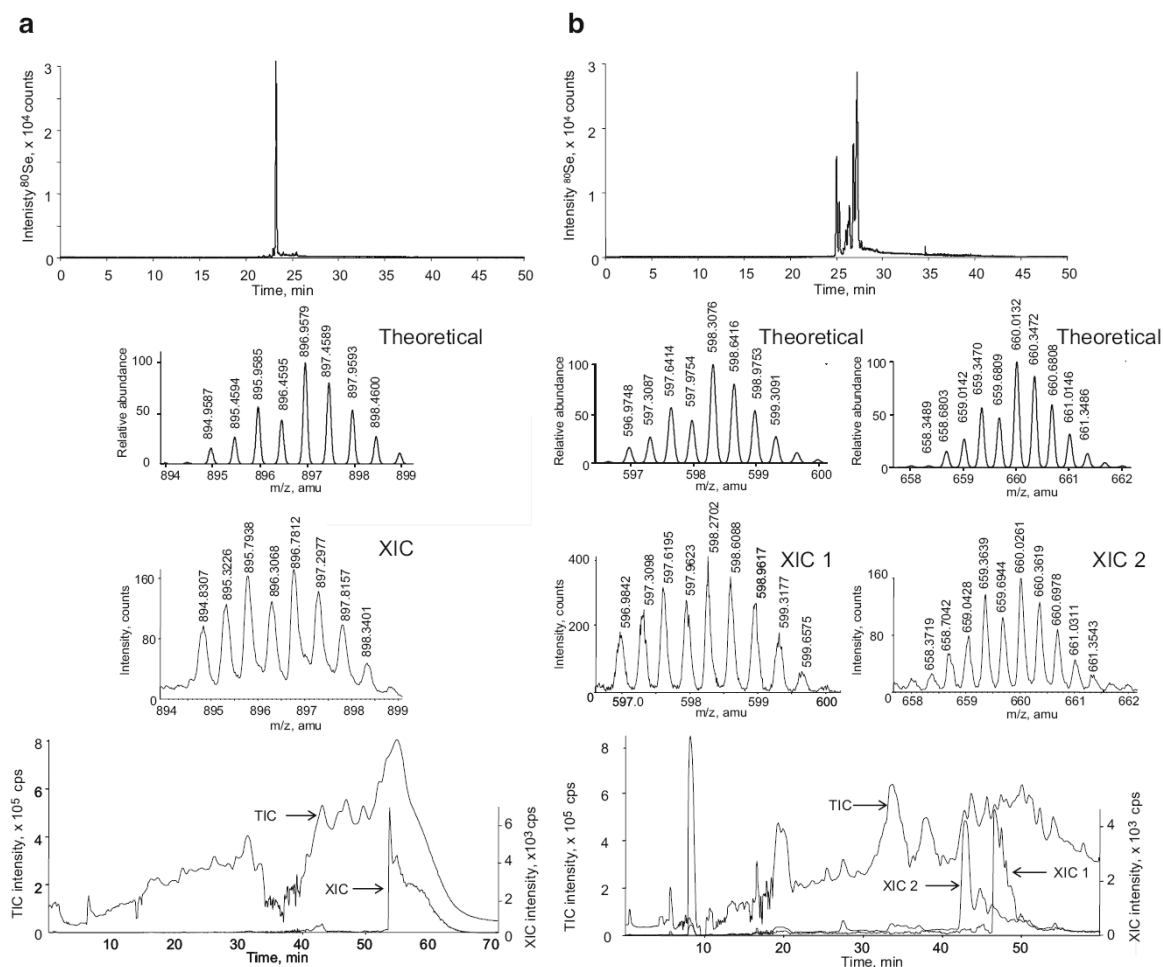


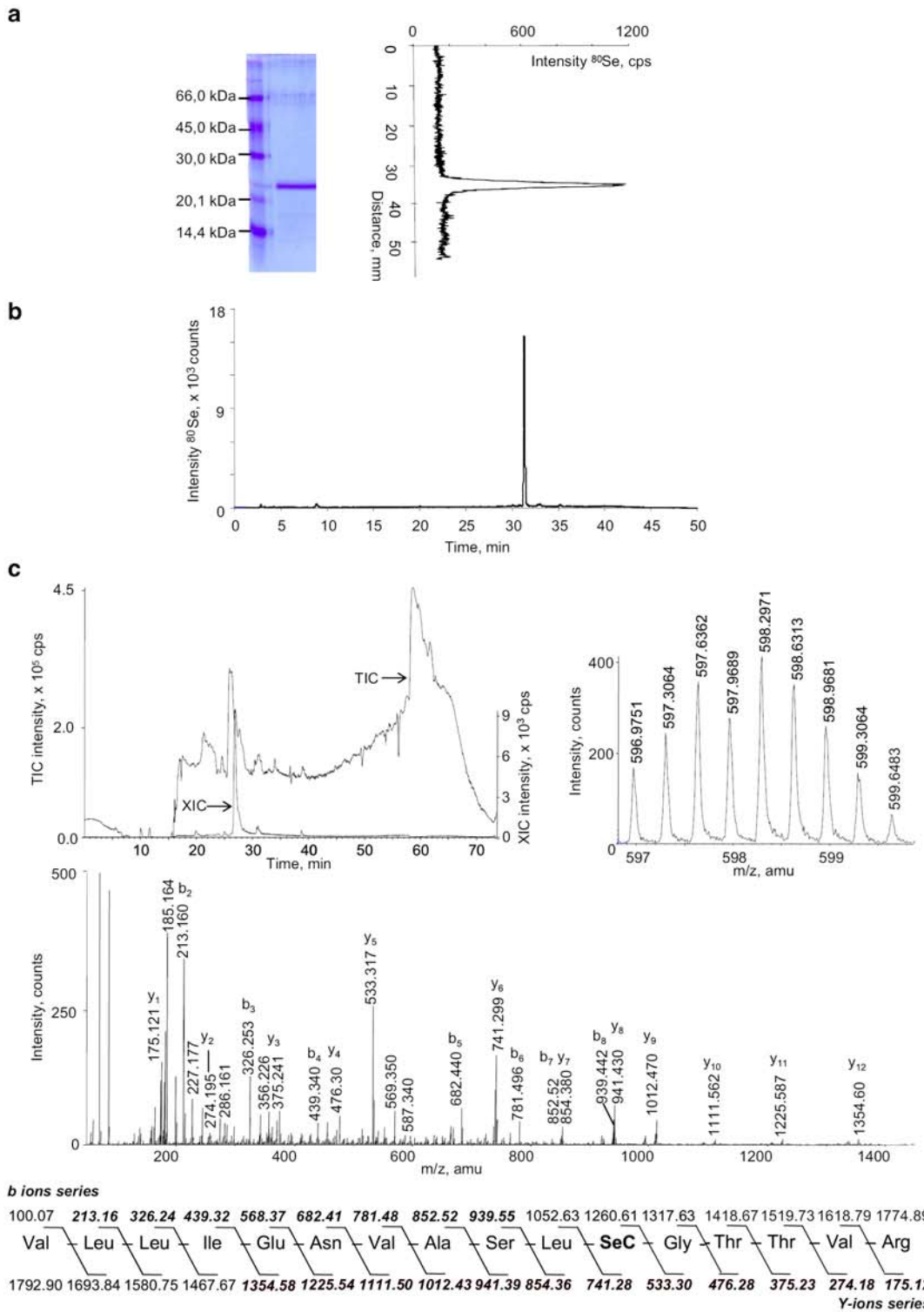
Fig. 2 SEC peak identification. **a** Peak 3 in Fig. 1b. *Top*: Capillary high-performance liquid chromatography (HPLC)–ICP MS chromatogram of the fraction collected. *Bottom*: Total ion current (TIC) and extracted ion current (XIC) chromatograms. The selenium isotopic pattern corresponding to the doubly charged VLLIENVASLZGTTVR is shown in the *middle* (monoisotopic theoretical mass 896.9572 Da). **b** Peak 2 in Fig. 1b. *Top*: capillary HPLC–ICP MS chromatogram of

the fraction collected. *Bottom*: TIC and XIC chromatograms. The selenium isotopic pattern corresponding to the triply charged VLLIENVASLZGTTVR and GKVLLIENVASLZGTTVR peptides are shown in the *middle* (monoisotopic theoretical masses are 598.3072 and 660.0127 Da, respectively). The sequences determined by electrospray ionization (ESI) MS/MS are given in the [supplementary material](#)

Selenopeptide detection and identification after in gel digestion

The aforementioned analytical protocol was investigated for the detection of GPx separated by 1D gel electrophoresis. The 1D SDS electropherogram (Fig. 3a) shows clearly one protein band at about 22 kDa, allowing us to account for the carboxymethylated GPx but it does not allow the detection of inorganic selenium. No other proteins are seen, which corroborates the hypothesis of a simple loss of selenium by elimination from the active centre. Note that a similar electropherogram was reported by Chery et al. [23]

but no attempts to recover the protein from the gel were made. The protein detected in the gel by laser ablation ICP MS (Fig. 3a) was extracted here with trypsin solution. A first experiment made use of MALDI TOF MS to determine the identity of the peptide extracted. Indeed, a peak at 1,793.44 (theoretical 1,792.9070) could be observed, but the selenium isotopic pattern could not be recognized (data not shown). The capillary HPLC–ICP MS chromatogram of the extract (Fig. 3b) shows a single peak but the low recovery (about 110 pg Se in the peak) suggests that nondigested protein could not be recovered from the gel. The estimated detection limit is of the order of 1 pg, which



◀ **Fig. 3** Analysis of the GPx extracted from the gel. **a** Purity of the GPx preparation by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis–laser ablation ICP MS (^{80}Se). **b** Capillary HPLC–ICP MS chromatogram. **c** Top: NanoHPLC–ESI MS chromatogram. Top left: Mass spectrum at the HPLC peak apex (theoretical mass for the triply charged VLLIENVASLZGTTVR peptide is 598.3072 Da). Top right: Collision-induced dissociation mass spectrum. The peptide sequence is shown at the bottom

should allow the detection of GPx in biological samples. The identity of the peptide was confirmed to correspond to the theoretically expected VLLIEN VASLZGTTVR peptide as demonstrated by nanoLC–ESI MS/MS data (Fig. 3c).

This is to our knowledge the first time that a selenocysteine-containing peptide was detected and identified in a protein extracted from the gel by ICP MS and electrospray MS. The comparison of the sensitivity of nanoHPLC–ESI MS and MALDI TOF MS in these conditions is clearly in favour of the former.

Conclusions

Capillary HPLC/nanoHPLC with parallel ICP MS and ESI MS detection allows the sensitive element- and molecule-specific detection of selenopeptide obtained by extraction of GPx from a gel. Because of the instability of the selenocysteine residue and the need for a carboxymethylation step, more careful attention is needed than in the case of selenomethionine-containing proteins. This is the first successful demonstration of a generic approach including gel electrophoresis with laser ablation ICP MS detection, in gel digestion, and capillary HPLC/nanoHPLC with parallel ICP MS and ESI MS detection for the analysis of a true (selenocysteine-containing) protein.

References

1. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973) *Science* 179:588–590
2. Flohe L, Günzler WA, Schock HH (1973) *FEBS Letts* 32:132–134
3. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehntab O, Guigó R, Gladyshev VN (2003) *Science* 300:1439–1443
4. Epp O, Ladenstein R, Wendel A (1983) *Eur J Biochem* 133:51–69
5. Chu FF, Doroshow JH, Esworhty RS (1993) *J Biol Chem* 268:2571–2576
6. Esworhty RS, Swiderek KM, Ho YS, Chu FF (1998) *Biochim Biophys Acta* 1381:213–226
7. Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T (1991) *J Biochem* 109:918–923
8. Schuckelt R, Brigeliusflohe R, Maiorino M, Roveri A, Reumkens J, Strassburger W, Ursini F, Wolf B, Flohe L (1991) *Free Radic Res Commun* 14:343–361
9. Ursini F, Maiorino M, Gregolin C (1985) *Biochim Biophys Acta* 839:62–70
10. Gladyshev VN, Stadtman TC, Hatfield DL, Jeang K (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:835–839
11. Jacobson GA, Narkowicz C, Tong YC, Peterson GM (2006) *Clin Chim Acta* 369:100–103
12. Ma S, Caprioli RM, Hill KE, Burk RF (2003) *J Am Soc Mass Spectrom* 14:593–600
13. Ghyselincq NB, Dufaure I, Lareyre JJ, Rigaudiere N, Mattei MG, Dufaure JP (1993) *Mol Endocrinol* 7:258–272
14. Arthur JR (2000) *Cel Mol Life Sci* 57:1825–1835
15. Lobinski R, Edmonds JS, Suzuki KT, Uden PC (2000) *Pure Appl Chem* 72:447–461
16. Koyama H, Kasanuma Y, Kim CY, Ejima A, Watanabe C, Satoh H (1996) *Tohoku J Exp Med* 178:17–25
17. Koyama H, Omura K, Ejima A, Kasanuma Y, Watanabe C, Satoh H (1999) *Anal Biochem* 267:84–91
18. Hinojosa-Reyes L, Marchante-Gayon JM, Alonso JIG, Sanz-Medel A (2003) *J Anal At Spectrom* 18:1210–1216
19. Palacios O, Ruiz-Encinar J, Schaumlöffel D, Lobinski R (2006) *Anal Bioanal Chem* 384:1276–1283
20. Fan TWM, Pruszkowski E, Shuttleworth S (2002) *J Anal At Spectrom* 17:1621–1623
21. Tastet L, Schaumlöffel D, Bouyssiere B, Lobinski R (2006) *Anal Bioanal Chem* 385:948–953
22. Ballihaut G, Tastet L, Pêchevran C, Bouyssiere B, Donard O, Grimaud R, Lobinski R (2005) *J Anal At Spectrom* 20:493–499
23. Chery CC, Gunther D, Cornelis R, Vanhaecke F, Moens L (2003) *Electrophoresis* 24:3305–3313
24. Chassaing H, Chery CC, Bordin G, Rodriguez AR (2002) *J Chromatogr A* 976:409–422
25. Qiu Y, Benet LZ, Burlingame AL (1998) *J Biol Chem* 273:17940–17953
26. Mauri P, Benazzi L, Flohé L, Maiorino M, Pietta PG, Pilawa S, Roveri A, Ursini F (2003) *Biol Chem* 384:575–588
27. Giusti P, Schaumlöffel D, Preud'homme H, Szpunar J, Lobinski R (2006) *J Anal At Spectrom* 21:26–32
28. Dernovics M, Giusti P, Lobinski R (2007) *J Anal At Spectrom* 22:41–50
29. Schaumlöffel D, Ruiz-Encinar J, Lobinski R (2003) *Anal Chem* 75:6837–6842
30. Gettins P, Dyal D, Crews B (1992) *Arch Biochem Biophys* 294:511–518

Analytical & Bioanalytical Chemistry

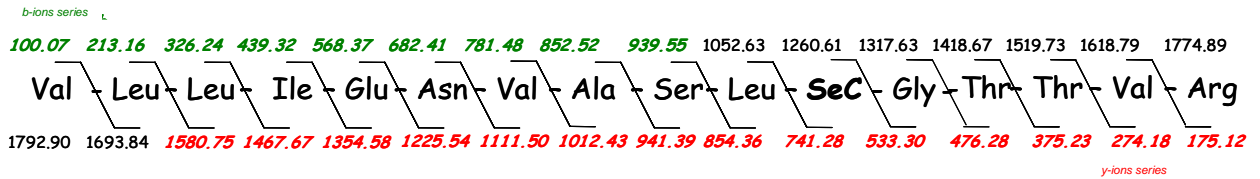
Electronic Supplementary Material

Multitechnique mass spectrometric approach for the detection of bovine glutathione peroxidase selenoprotein: focus on the selenopeptide

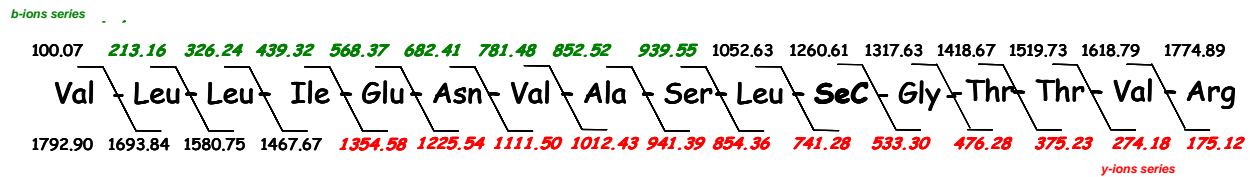
Guillaume Ballihaut, Sandra Mounicou, Ryszard Lobinski

Fig. S1 Sequences determined by nanoHPLC – electrospray MS/MS. The ions present in the collision induced dissociation mass spectra are shown either in green or in red.

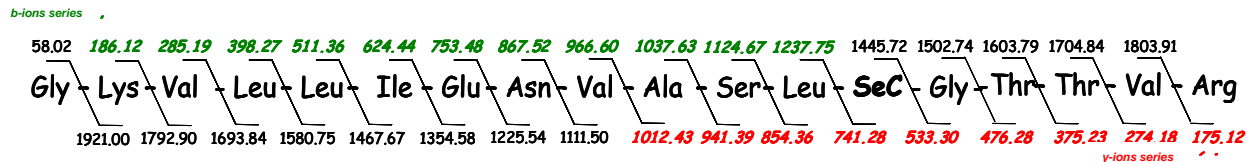
Peptide in Fig. 2a :



Peptide (XIC 1) in Fig. 2b



Peptide (XIC 2) in Fig. 2b



Sensitive Detection of Selenoproteins in Gel Electrophoresis by High Repetition Rate Femtosecond Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

Guillaume Ballihaut,^{†,‡} Fanny Clavierie,^{†,§} Christophe Pécheyran,^{*,†} Sandra Mounicou,[†] Régis Grimaud,[‡] and Ryszard Lobinski[†]

Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement, UMR 5254, Hélioparc, 2, avenue Pr. Angot, F-64053 Pau, France, Laboratoire d'Ecologie Moléculaire (Microbiologie), UMR 5254, avenue de l'Université, B.P. 1155, F-64013 Pau, France, and Novalase SA, ZI de la Briqueterie, 6 impasse du bois de la Grange, F-33610 Canejan, France

A laser ablation-ICPMS method using an infrared (1030 nm), low-energy (39 $\mu\text{J}/\text{pulse}$), high repetition rate (10 kHz), femtosecond laser was developed to improve the sensitivity of detection of heteroatom-containing proteins in 1D polyacrylamide gels. A 2-mm-wide lane was ablated by ultrafast (10 cm s^{-1}) back-and-forth movement of a 20- μm laser beam parallel to the protein bands while the gel advanced perpendicularly. This procedure resulted in a considerable increase in detection sensitivity (>40-fold) compared to the nanosecond 266-nm laser ablation-ICPMS, mainly because of the much larger amount of ablated material introduced into the plasma on the time scale of the dwell time of the mass spectrometer. The method was applied to the specific detection in the gel of formate dehydrogenase expressed in *Escherichia coli* and of selenoproteins in *Desulfococcus multivorans* with detection limits at the low-femtomolar levels.

Metal-protein binding studies and the detection and quantification of proteins on the basis of incorporated heteroatoms are of increasing importance in biochemical, toxicological, and pharmacological sciences.¹ Analytical advances in the emerging areas of metallomics, metalloproteomics, and heteroatom-tagged proteomics were recently reviewed.^{2–4}

Until very recently, autoradiography was the only technique allowing sensitive detection of heteroatoms (³²P, ³⁵S, ⁷⁵Se) in proteins separated by gel electrophoresis.^{5–7} Obvious limitations include the need for radioactive isotopes and related facilities and

the nonapplicability to human studies. Hence, there is a growing interest in the inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) detection because of its high (and matrix-independent) sensitivity and isotopic specificity allowing accurate quantification.⁸

Scanning of electrophoretic gels by laser ablation (LA)-ICPMS was first proposed by the McLeod group for rapid detection of cobalt-containing proteins.⁹ The technique was then extrapolated to the detection of other metals (Pb, Pt, Zn, Cd), metalloids (Se), and nonmetals (phosphorus) in 1D gels as recently reviewed.⁶ Heteroelements were also detected in 2D gel spots containing selenoproteins,^{10,11} phosphorylated proteins,¹² or metalloproteins.^{13,14} Whereas the first work⁹ was carried out using an IR laser, all the subsequent studies used a UV laser, usually a Nd:YAG (213 or 266 nm).

To date, all methods have used a 100–150- μm laser beam diameter (nanosecond pulsed), which results in a relatively small amount of protein (~1% of the protein contained in a typical 10–15-mm large band) effectively used for analysis. In LA-ICPMS (contrary to recording optical emission spectra from the laser plume at the ablation spot), sampling can be optimized separately, and the generated signal depends on the ablated mass. Consequently, the more material can be brought to the plasma at the time scale of mass detection, the higher is the sensitivity.

The objective of this work was to improve the sensitivity of detection of heteroelement-containing proteins in gel electrophoresis by increasing the amount of ablated protein per unit of time. This was achieved by an ultrafast (up to 280 mm s^{-1})

* Corresponding author: (e-mail) christophe.pecheyran@univ-pau.fr.

[†] Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement.

[‡] Laboratoire d'Ecologie Moléculaire (Microbiologie).

[§] Novalase SA.

- (1) Jakubowski, N.; Lobinski, R.; Moens, L. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 1–4.
- (2) Sanz-Medel, A.; Montes-Bayon, M.; Luisa Fernandez Sanchez, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 236–247.
- (3) Wind, M.; Lehmann, W. D. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 20–25.
- (4) Szpunar, J. *Analyst* **2005**, *130*, 442–465.
- (5) Szpunar, J. *Analyst* **2000**, *125*, 963–988.
- (6) Ma, R. L.; McLeod, C. W.; Tomlinson, K.; Poole, R. K. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2469–2477.
- (7) Westermeier, R.; Marouga, R. *Biosci. Rep.* **2005**, *25*, 19–32.

- (8) Lobinski, R.; Schaumlöffel, D.; Szpunar, J. *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 255–289.

- (9) Neilsen, J. L.; Abildtrup, A.; Christensen, J.; Watson, P.; Cox, A.; McLeod, C. W. *Spectrochim. Acta, Part B: At. Spectrosc.* **1998**, *53*, 339–345.

- (10) Chassaing, H.; Chéry, C. C.; Bordin, G.; Vanhaecke, F.; Rodriguez, A. R. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 85–95.

- (11) Chery, C. C.; Gunther, D.; Cornelis, R.; Vanhaecke, F.; Moens, L. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3305–3313.

- (12) Becker, J. S.; Boulyga, S.; Becker, J. S.; Pickhardt, C.; Damoc, E.; Przybylski, M. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *228*, 985–997.

- (13) Becker, J. S.; Zoriy, M.; Becker, J. S.; Pickhardt, C.; Przybylski, M. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 149–152.

- (14) Becker, J. S.; Zoriy, M.; Krause-Buchholz, U.; Becker, J. S.; Pickhardt, C.; Przybylski, M.; Pompe, W.; Rödel, G. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 1236–1243.

scanning with a femtosecond pulsed laser beam at a high repetition rate (10 kHz) parallel to the protein band when the gel advanced slowly in the orthogonal direction. Although the use of femtosecond lasers is becoming increasingly popular for LA-ICPMS,^{15–17} it is still hampered by the high cost of sufficiently high powered lasers. In our case, a relatively inexpensive low-energy (<100 μJ) laser developed as a dedicated sample introduction system for ICPMS and described elsewhere^{18,19} was used.

EXPERIMENTAL SECTION

Apparatus. Gel electrophoresis (1D SDS-PAGE) was carried out with a Mini Protean 3 electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) with 4% stacking gels and 12.5% resolving gels ($8 \times 7 \times 0.75$ cm).

A femtosecond laser ablation device (Alfamet, Novalase, France) fitted with a diode-pumped KGW-Yb laser, described in detail elsewhere,¹⁹ was used. It delivers 360-fs pulses at 1030 nm in the 0.1–100 μJ range (at the sample surface) with a repetition rate variable between 1 and 10 000 Hz. The pulse-to-pulse stability is below 0.5%. The laser source is integrated in compact and mobile structure allowing its easy coupling to an ICPMS. The ablation cell (4.5 cm in diameter, 10 cm^3 in volume) is mounted on a motorized XY stage used for sample positioning (± 1 μm) or for slow sample displacement when the laser is firing. The laser beam can be rapidly moved (up to 280 mm s^{-1}) with high repositioning precision (1 μm) owing to a galvanometric scanning module, fitted to the optical line. The software allows the moving of the beam by the scanner and the moving of the sample in the combined manner.

A UV 266-nm nanosecond (8 ns) laser ablation system model LSX-100 (Cetac, Omaha, NE) operated at 20 Hz and 1.6 mJ was used as a reference system. A 5 cm in diameter (30 cm^3 in volume) ablation cell was used. The lane width obtained was 120 μm .

Two types of ICPMS systems fitted with a collision cell were used. A ThermoElectron model X7 fitted with the interface consisted of a two-inlet torch mixing the laser produced aerosol together with a dry aerosol (2% HNO_3 nebulized by means of ultrasonic nebulizer) prior to introduction into the plasma as described elsewhere.²⁰ An Agilent model 7500 cs was fitted with an interface allowing the mixing of the aerosol from the ablation chamber with Xe gas serving as an internal standard. Oxygen (5% v/v) was added to the spray chamber. Platinum sampler and skimmer and 1-mm-i.d torch were used. Helium was used as a carrier gas in the ablation cell. For laser ablation of dry polyacrylamide gels, the instruments were tuned in quasi dry plasma conditions with a multielemental solution (Li, Co, Y, Ce) nebulized with an ultrasonic nebulizer (U5000AT+, Cetac). After the optimization step, and during gel ablation, the ultrasonic nebulization was turned off. It was necessary because the gel particles were readily humidified due to remaining moisture, which led to

the obstruction of the torch injector after several ablations of 2-mm-wide lanes. Except for the results presented in Figures 5 and 6, obtained with the ThermoElectron model X7 ICPMS, all data were obtained with the Agilent model 7500 cs ICPMS.

Reagents, Standards, and Solutions. All reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) unless specified otherwise. The glutathione peroxidase (GSHPx) preparation (4.2 mg of solid) with a specific activity of 673 units/mg of protein was dissolved in 1 mL of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 1 mM dithiothreitol (DTT). The Se concentration, determined by ICPMS using the method of standard additions, was 1.7 ± 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Water (18.2 M Ω cm) was obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA).

Procedures. (1) Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Electrophoresis was performed in 25 mM Tris buffer containing 3.5 mM SDS and 192 mM L-glycine at 180 V for 45 min. After electrophoresis, the gel was rinsed with water, stained with 0.25 g L^{-1} Coomassie Blue G-R250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) in 10% (v/v) acetic acid dissolved in 25% (v/v) methanol, destained in 10% (v/v) acetic acid, 25% (v/v) methanol, and vacuum-dried for 2 h on a Whatman 3MM filter paper. Saran wrap was laid on the top of the gel to protect it from contamination until analysis.

(2) Laser Ablation-ICPMS. The gel was, usually, cut in two pieces of a size to fit in the ablation chamber. The gel pieces were glued to the support using double-sided Scotch tape. The nsLA-ICPMS measurements were carried out in the scan mode at $v(\text{scan})$, 60 $\mu\text{m s}^{-1}$; pulse energy, 1.6 mJ; defocusing, 1000 μm below the surface; repetition rate, 20 Hz; and fluence, 14 J cm^{-2} . The femtosecond laser was operated at a power of 390 mW at a frequency of 10 kHz (39 $\mu\text{J/pulses}$) with a defocus of 50 μm below the surface of the gel. This corresponds to a fluence of 13 J cm^{-2} . The scanning speed was 100 mm s^{-1} and 50 $\mu\text{m s}^{-1}$ parallel and perpendicular to the protein band, respectively. The lane width was 2 mm. The isotopes monitored included the following: ^{52}Cr , ^{53}Cr , ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se , ^{82}Se , ^{124}Xe , and ^{126}Xe . Helium was chosen as the carrier gas as the amount of mass collected in the larger particle fraction was reported to decrease when helium was used instead of argon (15).

(3) Ablation Topography and Roughness Measurements. Laser ablation experiments were carried out as described above. Roughness measurements were performed by an optical surface profilometer Micromesure CHR150, developed by the STIL society (Aix en Provence, France). The Micromesure station was equipped with a high-resolution optical sensor with a field depth of 1000 μm and a (Y) lateral axis resolution of 0.313 μm . Data were acquired by the SurfaceMap software and treated with the MountainMap Universal software.

(4) Expression of Formate Dehydrogenase in *Escherichia coli* and Preparation of Cell Extracts. *E. coli* strain MC4100 and plasmid pFM20 were gifts from Prof. A. Böck (University of Munich, Germany). pFM20 is a multicopy plasmid containing the entire *fdhF* gene coding for the formate dehydrogenase FDH-H and its controlling sequences. LB medium (10 g L^{-1} tryptone, 5 g L^{-1} yeast extract, 10 g L^{-1} NaCl) was supplemented with 0.8% (w/v) glucose, 5 μM sodium selenite, 2 μM sodium molybdate, and 30 mg L^{-1} chloramphenicol and was deaerated with 90% N_2 /10% CO_2 . Cells were grown at 37 $^\circ\text{C}$ without

- (15) Hergenröder, R.; Samek, O.; Hommes, V. *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 551–572.
 (16) Günther, D.; Hattendorf, B. *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 255–265.
 (17) Russo, R. E.; Mao, X. L.; Gonzalez, J. J.; Mao, S. S. *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, *17*, 1072–1075.
 (18) Pecheyran, C.; Cany, S.; Donard, O. F. X. *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.* **2005**, *50*, 228–239.
 (19) Pecheyran, C.; Cany, S.; Chabassier, P.; Mottay, E.; O. F. X., D. J. *Phys. Conf. Ser.* **2005**, *59*, 112–117.
 (20) Ballihaut, G.; Tastet, L.; Pecheyran, C.; Bouyssiere, B.; Donard, O.; Grimaud, R.; Lobinski, R. *J. Anal. At. Spectrom.* **2005**, *20*, 493–499.

B Analytical Chemistry

shaking. When the culture reached an optical density of 0.12 at 600 nm, expression of FDH was induced by addition of 30 mM sodium formate. The culture was further incubated for 3 h. Cells were harvested by centrifugation at 15 000 rpm for 20 min at 4 °C and resuspended in 2 mL of extraction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM DTT, 200 μ L of protease inhibitor cocktail). Cells were broken by one passage through a French press at 4000 psi. Insoluble material was removed by centrifugation at 15 000 rpm for 30 min at 4 °C. The 30 μ L of DNase I at 1 mg mL⁻¹ and 30 μ L of RNase A at 250 μ g mL⁻¹ in 50 mM MgCl₂ were added to the supernatant and incubated 10 min on ice. Protein concentration in the supernatant was estimated to 14.6 mg mL⁻¹ by the Bradford method using the Bio-Rad Protein AssayJ.

(5) Size Exclusion Chromatography-ICPMS of a Crude *E. coli* Extract. The 100 μ L of protein extract was loaded on a Superdex 200 HR 10/30 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The column was calibrated with thyroglobulin ($M = 670$ kDa), ferritin ($M = 474$ kDa), transferrin ($M = 90$ kDa), ovalbumin ($M = 43$ kDa), and selenocystine ($M = 334$ Da). Proteins were eluted with 10 mM ammonium acetate, pH 7.5, at a flow rate of 0.7 mL min⁻¹. Elution of ⁵⁴Fe, ⁷⁸Se, ⁸⁰Se, ⁹²Mo, and ⁹⁵Mo was monitored by ICPMS. Se-containing fractions were lyophilized and solubilized in 200 μ L of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5. A 12.5- μ L sample of each fraction was mixed with 12.5 μ L of 2 mM EDTA, 4% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 0.02% (w/v) Bromophenol Blue, and 5% (v/v) β -mercaptoethanol, heated for 5 min at 95 °C, and loaded onto the 12.5% SDS-polyacrylamide gel.

(6) Preparation of Protein Extracts from *Desulfococcus multivorans*. *D. multivorans* strain DSM 2059 was kindly provided by Prof. M. Boll (University of Leipzig, Germany). DSM 2059 was cultured anaerobically in a bicarbonate-buffered mineral salt medium at pH 7.3 in gastight stoppered glass bottles at 30 °C. Composition of the mineral salt medium was in g L⁻¹: NaCl (10), NH₄Cl (0.5), CaCl₂·2H₂O (0.05), MgSO₄·7H₂O (0.6), MgCl₂·6H₂O (1.5), NaHCO₃ (7.5), Na₂MoO₄·2H₂O (150 nM), Na₂SeO₃ (20 nM), benzoate (10 mM), sodium sulfide (10 mM) sodium sulfide (800 μ M), and 1 mL of oligoelements solution SL12B²¹ and vitamins V7 solution.²² Accumulated H₂S was removed by degassing with N₂-CO₂ (90:10 v/v) every day. Growth was monitored by optical density measurement at 600 nm. Extracts were performed from 15 mL of culture at OD₆₀₀ of 0.25. Proteins were precipitated with 10% (v/v) trichloroacetic acid (TCA). The protein pellet was washed twice with 10% TCA, twice with cold acetone, and then air-dried. Proteins were solubilized in 200 μ L of 50 mM Tris buffer (pH 7.5) containing 1 mM EDTA, 2% (w/v) SDS, 15% (v/v) glycerol, 0.01% (w/v) Bromophenol Blue, and 5% (v/v) β -mercaptoethanol, heated for 5 min at 95 °C, and loaded onto the gel.

RESULTS AND DISCUSSION

Two-Dimensional Scan Ablation and Signal Acquisition.

The amount of ablated material, and hence sensitivity, is directly dependent on the laser spot size and fluence (laser energy per spot area). In our case, ablation occurred when a 20- μ m laser beam diameter was used at 39 μ J/pulse (at the sample surface), which

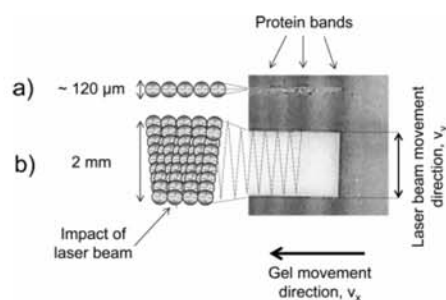


Figure 1. Principle of the signal acquisition by 1D and 2D scanning. (a) Typical nsLA-ICPMS: a 120- μ m laser beam at 20 Hz is fixed in position whereas the gel is moved in the perpendicular direction to the protein bands. (b) This work: the laser beam is moved back and forth within a delimited lane (2 mm) with the speed v_y . In the same time, the gel is moved perpendicularly with the speed v_x ($v_y \gg v_x$). The high repetition rate results in a number of largely overlapping craters.

corresponded to a fluence of 13 J cm⁻². The principal problem related to the use of a low-energy laser is the necessity of using a narrow beam in order to ensure the fluence above the ablation threshold. The use of a narrow beam results then in a small ablated surface.

In order to increase the amount of ablated material, the laser beam was moved rapidly (10 cm s⁻¹) with a positioning precision of 1 μ m along the axis (denoted as y) parallel to the protein band while the gel advanced in the perpendicular direction (denoted as x) at a speed \sim 2000 times lower. It resulted in a Z-shaped scanning which was delimited by the width of the lane in the y -direction and the length of the gel in x -direction, as shown schematically in Figure 1. Craters of 20 μ m overlapped partly (40% in the y -axis and $>$ 87% in the x -axis), which resulted in ablation of the entirety of the scanned surface. The combination of the beam movement ($v_y = 10$ cm s⁻¹), the gel movement ($v_x = 50$ μ m s⁻¹), and the frequency of passage (lane width and laser repetition rate) allowed the ablation of an entire zone at the desired depth.

For an ablation lane width of, for example, 2 mm, movement of the laser from one side of the lane to the other takes \sim 20 ms (200 shots). Hence, at the time scale of a typical dwell time of mass spectrometer (100 ms), the laser will fire 1000 shots while traveling 5 times back and forth. During this time, the gel advances 5 μ m, which results in an ablated area of 0.01 mm². This is \sim 100 times more than in the case of classical laser ablation gel scanning using the same beam diameter of 20 μ m. The ablation of material from the 0.01-mm² area corresponds to a single mass measurement event perceived by the mass spectrometer. In other words, the high repetition rate of the laser combined with a fast 2D scan can be seen as an efficient way to ablate quasi simultaneously (at the mass spectrometer detection time scale) a much bigger sample area than a conventional 1D scan.

Note that, because of the Gaussian intensity distribution, the ablation intensity in the middle of the crater is different from that at the border during in depth ablation. The laser shots are placed in spatial proximity, and because of their partial overlap, this lack of flat-top profile is compensated for and homogeneous ablation of the surface is obtained.

The effect of the 2D scanning mode on the detection sensitivity was then studied in detail.

(21) Eichler, B.; Pfennig, N. *Arch. Microbiol.* **1986**, *146*, 295–300.

(22) Pfennig, N.; H. G., T. in *The Prokaryotes*; Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H., Eds.; Springer: New York, 1992; pp 3200–3221.

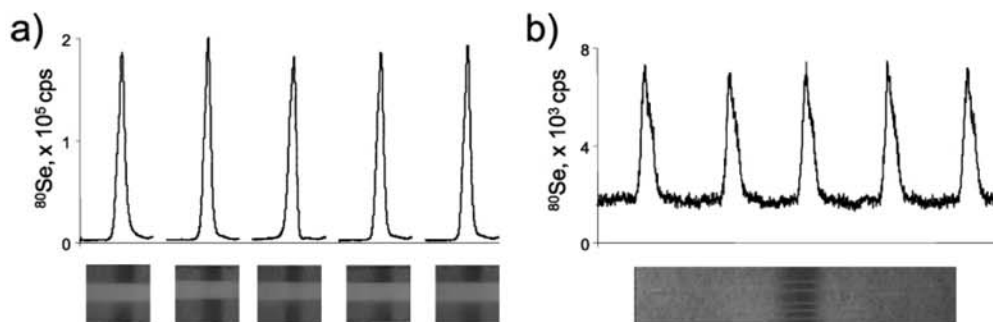


Figure 2. Reproducibility of laser ablation-ICPMS detection in the glutathione peroxidase band. (a) Femtosecond laser: the 8-cm-wide band was cut in 5 pieces. The peaks correspond to individual analyses of each of them. (b) Nanosecond laser. The same band was scanned 5 times. See Procedures for the experimental conditions.

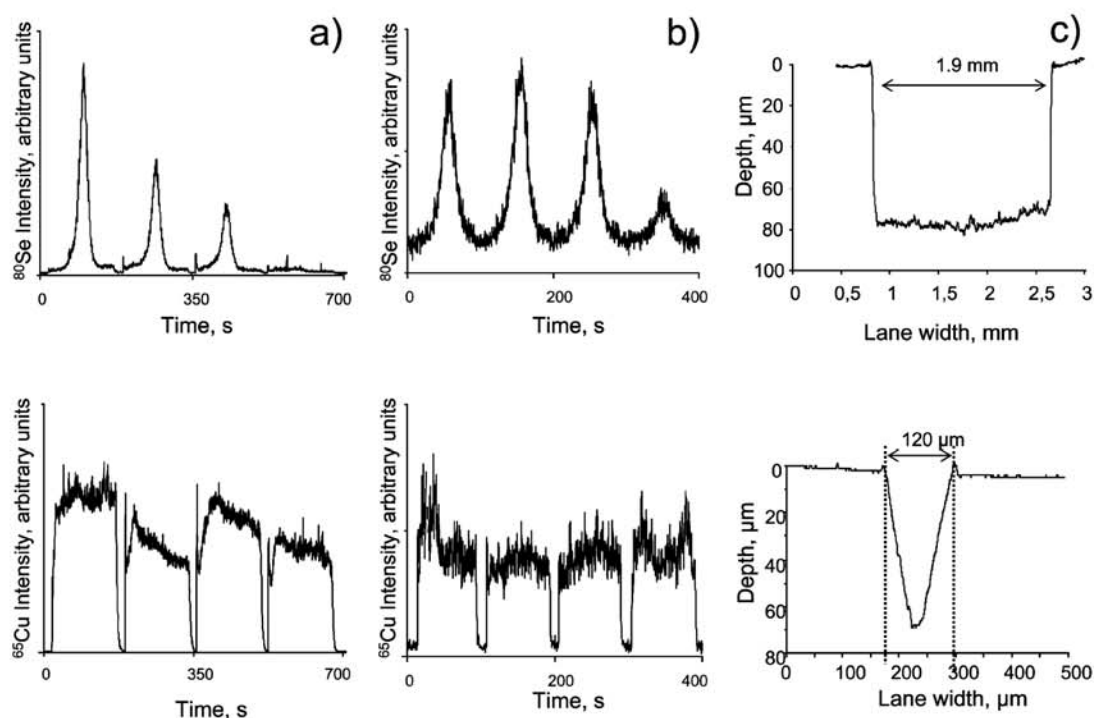


Figure 3. In-depth gel analysis. The laser was passed over the same lane 4 times. (a) Femtosecond laser; (b) nanosecond laser. Top panels, ^{80}Se . Bottom panels, ^{65}Cu . (c) Ablation topography: top panel, femtosecond laser 2D scan; bottom panel, nanosecond laser 1D scan.

Figures of Merit. Reproducibility. Figure 2a shows an example of the successive electropherograms obtained by fsLA-ICPMS for a GSHPx band. For the purpose of this experiment, a ~ 8 -cm-wide band was obtained and then cut into five 16-mm-wide pieces, which were introduced in the ablation chamber and analyzed one by one. The relative standard deviation was 4.0 and 4.1% in the peak area and in the peak height mode, respectively. These values are similar to those obtained by nsLA-ICPMS (Figure 2b, 1.9% in the peak area and 3.8% in the peak height mode). It should be noted, however, that, owing to the narrower ablation lane, all the five measurements by nsLA-ICPMS could be carried out using the same piece of the gel so the effect of the possible changing ablation conditions was less pronounced.

In-Depth Penetration. Parts a and b in Figure 3 show the effect of repetitive ablations within the lane of 2 mm (fs laser) and 120

μm (ns laser), respectively. In both cases, three successive ablations were required to remove the entire protein (within the lane from the depth of the band). The rather constant signal of copper (assumed to be homogeneously distributed in the gel) indicates that the protein was concentrated at the surface because the bottom of the gel was not attained with the fourth run.

Figure 3c shows that in-depth penetration efficiency of a nanosecond UV laser is fairly similar to that of a femtosecond IR laser for the analysis of polyacrylamide gels. Note that the ablation cross section in the case of the femtosecond scan is rectangular, contrary to the triangular cross section in the case of the nanosecond ablation, which results in a bigger volume of ablated matter for an equivalent surface. The ablated surface in the fsLA-ICPMS mode is 16-fold larger than in the case of the nsLA-ICPMS mode. The detailed calculations give the volume ablated per time

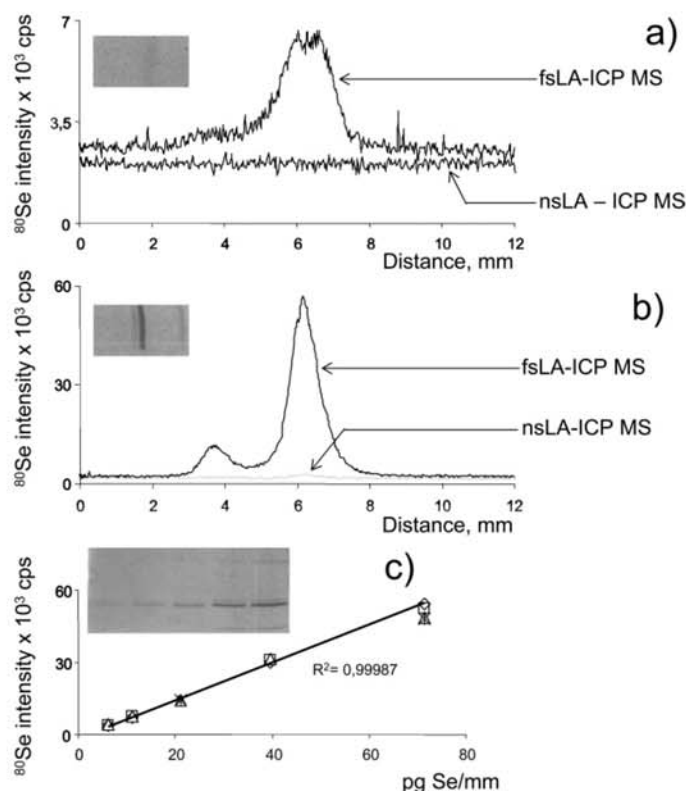


Figure 4. Sensitivity and linearity of fsLA-ICPMS determination of GSHPx. (a) Comparison of fsLA-ICPMS (1) and nsLA-ICPMS (2) detection for the least intense band (6 pg of Se mm⁻¹). (b) Comparison of fsLA-ICPMS (1) and nsLA-ICPMS (2) detection for the most intense band (71 pg of Se mm⁻¹). (c) Calibration curve (5 replicates). The photographs of the gels analyzed are shown in the insets.

unit of $2.64 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ for the nanosecond UV laser and $71.5 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ for the femtosecond IR laser. This accounts for a 27-fold gain in ablated volume per time unit. It is worth noticing that this enhancement factor is mostly due to the sample strategy. Ultrafast nanosecond lasers operated in similar 2D scan conditions should produce a similar effect. In addition, recent ablation approaches using nanosecond 193-nm lasers fitted with slits up to 1 mm long²³ should also help in sampling more material.

Note that in our fsLA-ICPMS system the penetration depth can be increased by delimiting a smaller lane width and hence by increasing the frequency of the passage of the laser beam (at all the other parameters identical). When a 1-mm lane was ablated, two successive passages of the laser were sufficient to remove all the protein from the band in the gel.

Linearity Range and Sensitivity. In order to establish a calibration curve, different volumes of a GSHPx solution were deposited on the gel. The deposited amounts covered the range of 5–80 pg (as Se, normalized to the bandwidth, assuming that all the selenium in the analyzed solution was present in the GSHPx and was found in the protein band after the gel electrophoresis). The electropherograms acquired by nsLA-ICPMS and fsLA-ICPMS for the least and most concentrated bands of GSHPx are shown

in Figure 4a and b, respectively. The lowest protein amount was nondetectable by the Coomassie Blue staining (inset to Figure 4c); only the two highest protein concentrations produced a detectable signal by nsLA-ICPMS. The calibration curve was linear (Figure 4c) and passed through the origin.

The data in Figure 4 show an over 40-fold gain in sensitivity obtained by the developed fsLA ICPMS procedure in comparison with the nsLA ICPMS detection in conditions similar to those described elsewhere in the literature. It allows the specific detection of selenium in protein bands undetected by the Coomassie Blue staining.

Such a large gain in sensitivity cannot be explained solely by the larger amount of ablated protein discussed above. An additional reason is likely to be due to the reduced fraction of large particles in the aerosol. A nanosecond laser ablation was reported to produce more undesired larger particles than the shorter pulsed femtosecond laser during the analysis of polymers.¹⁵ The large particles are more easily lost during the aerosol transport, and if they reach the ICP, they are incompletely evaporated. The small particles are more efficiently digested in the plasma, which results in sensitivity improvement. A detailed study of the aerosol ejected from the gel is required in order to understand the effect of the particle size distribution on the observed signal enhancement.

(23) Woodhead, J.; Hergt, J.; Shelley, M.; Eggins, S.; Kemp, R. *Chem. Geol.* **2004**, *209*, 121–135.

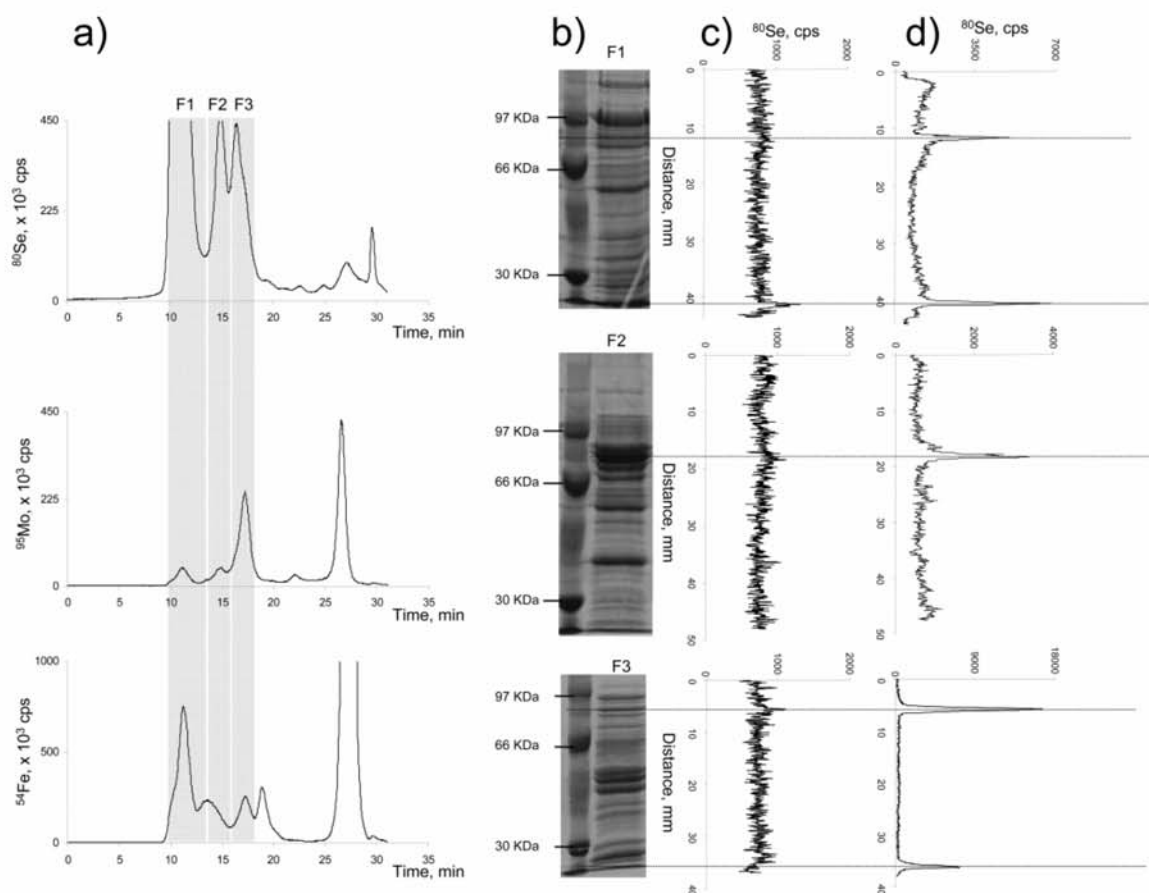


Figure 5. Detection of formate dehydrogenase selenoprotein expressed in *E. coli*. (a) Size exclusion-ICPMS chromatograms: top panel, ^{80}Se ; medium panel, ^{95}Mo ; bottom panel, ^{54}Fe . The collected fractions are shaded. (b) Photographs of the gels: top panel, fraction 1; medium panel, fraction 2; bottom panel, fraction 3. (c) nsLA-ICPMS scans of the corresponding gels. (d) fsLA-ICPMS scans of the corresponding gels.

Note that the noise recorded during the fs IR 2D scan and the ns UV 1D scan are (Figures 4a, 5c,d, and 6b,c) similar. A straight comparison of the signal stability obtained with UV nanosecond pulses versus IR femtosecond pulses is not possible since the amount of material introduced into the plasma by the latter is at least 27 times larger. The plasma conditions are then likely modified from one configuration to the other. However, it should be noted that the huge amount of particles produced by the fs IR 2D scan does not induce higher signal instability than the amount of particles produced by the ns UV 1D scan. Furthermore, the background recorded in both configurations is quite similar, though slightly higher with the fs 2D scans; this indicates that the gels analyzed are globally selenium-free, except in the bands of selenium-containing proteins.

Detection of Selenoproteins in Bacterial Cultures. The fsLA-ICPMS developed was applied to the detection of selenoproteins in cases where nsLA-ICPMS had failed. The examples shown below include monitoring of the FDH expression in *E. coli* and detection of selenoproteins in *D. multivorans*.

Monitoring the Expression of Formate Dehydrogenase in E. coli. The protein extract from MC4100 pFM20 culture was fractionated by size exclusion chromatography. In addition to selenium, iron

and molybdenum were monitored as FDH is known to bind strongly these trace elements.

The SEC-ICPMS chromatogram (Figure 5a top panel) obtained under non-denaturing conditions shows a number of selenium compounds. The three most intense fractions (F1, F2, F3) were lyophilized and analyzed by SDS-PAGE. Coomassie Blue-stained gel images are shown in Figure 5b.

Attempts to detect selenium in the 1D SDS-PAGE gels by nsLA-ICPMS failed (Figure 5c). In contrast, fsLA-ICPMS analysis of any fraction allowed the detection of a Se peak at ~ 80 kDa (Figure 5d). The Se-containing fraction F3 also contained Mo and Fe, supporting the evidence for the presence of FDH in this fraction.

The considerable amount of selenium excluded from the size exclusion column is not detected by SDS-PAGE. This indicates that most of the selenium in F1 was not covalently bound to proteins but rather present nonspecifically complexed to high molecular weight compounds.

Note that no metals are detected in SDS PAGE because of the denaturing conditions. This analytical approach can be interesting to study covalent and noncovalent Se binding in biological samples.

F Analytical Chemistry

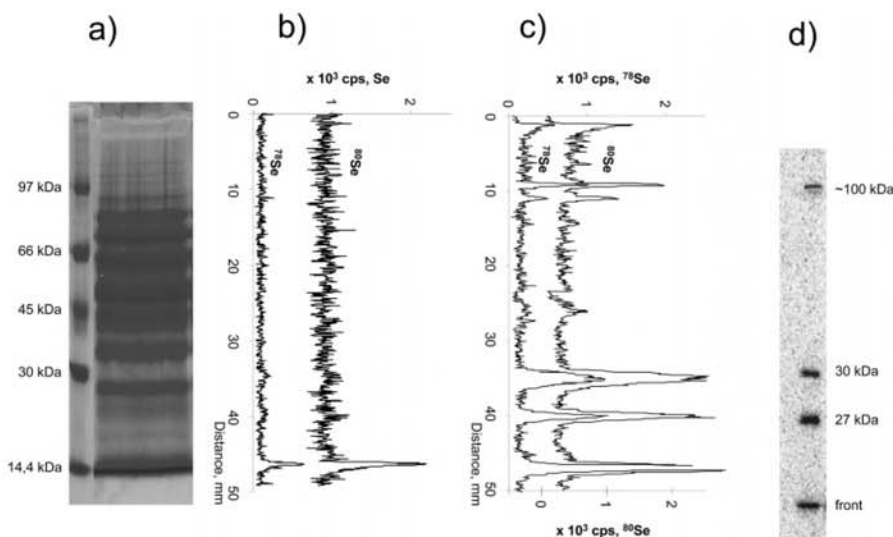


Figure 6. Detection of selenoproteins in *D. multivorans* growing on benzoate. (a) Photograph of the gel; (b) nsLA-ICPMS scans for ^{78}Se and ^{80}Se ; (c) fsLA-ICPMS scans for ^{78}Se and ^{80}Se ; (d) autoradiogram obtained elsewhere²¹ for a similarly prepared sample.

Detection of Selenoproteins in *D. multivorans*. The sulfate-reducing bacterium *D. multivorans* uses various aromatic compounds, such as, for example, benzoate, as a source of carbon and energy. Selenium is essential for growth on benzoate. Three radioactively labeled proteins with molecular masses of approximately 100, 30, and 27 kDa could be detected by SDS-PAGE in extracts of cells grown on benzoate in the presence of ^{75}Se -selenite.²⁴ This experiment was repeated in this work by using fsLA-ICPMS detection.

Figure 6 shows a 1D SDS-PAGE electropherogram obtained for an extract of *D. multivorans* grown on benzoate. No selenium could be detected by nsLA-ICPMS except in the migration front. In contrast to that, the fsLA-ICPMS electropherogram shows, in addition to this migration front peak, four other peaks. Two of them in the 30-kDa region correspond most likely to the bands at 27 and 30 kDa observed in the autoradiogram. The pair of peaks present in the 100-kDa region can correspond to the 100-kDa band in the autoradiogram (Figure 6d). The resolution of the electropherogram with fsLA-ICPMS detection is apparently higher, allowing the differentiation of two selenoproteins with close molecular weights, which are undistinguishable by autoradiography.

CONCLUSIONS

Femtosecond infrared laser ablation associated with the rapid scanning and the high repetition rate of the beam allows the sensitive detection of heteroelements in proteins separated by gel electrophoresis. The gain in sensitivity results mostly from the ablation strategy possible owing to the high repetition rate of the laser and the rapid beam scanning. In comparison with the

conventional 266-nm nanosecond laser ablation providing a lane width of 120 nm, the 2D scan laser ablation strategy used here allows a 27-fold larger mass uptake and hence a larger amount of sample introduced into the ICPMS on the time scale of the mass detector. The gain in sensitivity was however found to exceed a factor of 40, which cannot be explained exclusively by the larger mass uptake. Though not investigated in this study, the nature of the aerosol produced by femtosecond pulses, in terms of particle size and morphology, is supposed to play a role, favoring particle transport and atomization in the plasma of the ICPMS. This can be clarified by a dedicated future study of the characteristics of femtosecond and nanosecond laser-induced particles. The proof of principle demonstrated for selenoproteins can be readily extended to metalloproteins provided a nondenaturing gel electrophoresis protocol is used.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge the funding of the National Research Agency (ANR) and of the Nuclear Toxicology Programme (Tox-Nuc-e). The authors thank Prof. August Böck (University of Munich, Germany) for the gifts of *E. coli* strain MC4100 and plasmid pFM20, Prof. Matthias Boll (University of Leipzig, Germany) for the gift of *D. multivorans* strain DSM 2059, Dr. Hélène Garay and Dr. Olivier Etteradossi (Ecole des Mines d'Alès, Pau, France) for advice and the loan of the Micromesure device, and Dr. Jérôme Frayret for advice on roughness measurements. G.B. acknowledges a Ph.D. fellowship from the French Ministry of Research and Education.

Received for review May 4, 2007. Accepted June 15, 2007.
AC0709145

(24) Peters, F.; Rother, M.; Boll, M. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 2156–2163.

Multimode detection (LA-ICP-MS, MALDI-MS and nanoHPLC-ESI-MS²) in 1D and 2D gel electrophoresis for selenium-containing proteins

Guillaume Ballihaut, Christophe Pécheyran, Sandra Mounicou, Hugues Preud'homme, Régis Grimaud, Ryszard Lobinski

Speciation of heteroelement-containing proteins essential for human health is one of the most rapidly developing areas in bio-inorganic analytical chemistry (metallomics). We discuss recent advances in mass spectrometry (MS) techniques for detection and identification of selenium (Se)-containing proteins separated by gel electrophoresis (GE). These advances include location of Se-containing bands in 1D GE or spots in 2D GE by laser-ablation inductively coupled plasma MS (LA-ICP-MS) followed by protein identification by matrix-assisted laser-desorption/ionization MS (MALDI-MS) and nano-high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem MS (nanoHPLC-ESI-MS²). We highlight the differences with the classical proteomics approach resulting from the presence of the Se atom.
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Gel electrophoresis; Inductively-coupled plasma; Laser ablation; Mass spectrometry; Multimode detection; Nano high-performance liquid chromatography; Protein; Selenium; Tandem mass spectrometry

Guillaume Ballihaut*, Christophe Pécheyran, Sandra Mounicou, Hugues Preud'homme, Ryszard Lobinski*
Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement (UMR 5034)
Hélioparc, 2, av. Pr. Angot, F-64053 France

Guillaume Ballihaut, Régis Grimaud
Laboratoire d'Ecologie Moléculaire (Microbiologie),
av. de l'Université,
B.P. 1155, 64013 Pau, France

Ryszard Lobinski
Department of Analytical Chemistry,
Warsaw University of Technology,
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, Poland

*Corresponding authors. Tel.: +33 5 59 80 68 84; Fax: +33 5 59 40 77 81;
E-mail: guillaumeballihaut@yahoo.fr (G. Ballihaut), Ryszard.Lobinski@univ-pau.fr (R. Lobinski).

1. Introduction

Speciation of protein-bound elements is one of the most rapidly developing areas in bio-inorganic analytical chemistry (metallo-mics) [1–3]. Slab-gel electrophoresis (GE) based on isoelectric focusing or simple migration in the gel (Native and SDS PAGE), in one or two dimensional format, has been the principal separation technique for high-resolution protein separation [4,5]. Heteroelements have been specifically detected in the gels by autoradiography of radioactive (e.g., ⁷⁵Se-labelled) species [6,7] but atomic spectrometric techniques, especially laser-ablation inductively coupled plasma MS (LA-ICP-MS) detection, have become established options [8].

The presence of selenium (Se) in proteins may lead to selenoproteins, which contain the genetically encoded amino-acid selenocysteine (ex. glutathione peroxidase, thioredoxine reductase, selenoproteins P and W) and to other Se-containing proteins, in which selenomethionine and selenocysteine non-specifically replace methionine and cysteine, respectively. Selenoproteins usually contain a single SeCys residue (Selenoprotein P is a notable exception here). In the case of non-specific incorporation, an Se-containing protein is usually accompanied by a considerable excess of its methionine or cysteine analogue.

Selenoproteins exist naturally in all kingdoms of life and are of particular

interest because of the recognized essentiality of Se in human nutrition and the putative cancer-prevention properties [9–11]. Understanding the reactions and the functions of selenoproteins is considered a possible key to the mechanisms of essentiality and toxicity of Se.

The spectacular progress in DNA sequencing has resulted in the availability of whole-genome sequences of an increasing number of organisms. Bioinformatic analysis of these sequences has allowed the prediction of many new selenoproteins [12,13]. The development of methods allowing their detection and quantification *in vivo* is becoming of paramount importance.

Below is an overview of current trends in analytical methodology concerning the detection and identification

of Se-containing proteins in gel electrophoresis based on recent data from our laboratory.

2. State-of the-art of gel-electrophoresis-based analytical techniques for selenoproteomics

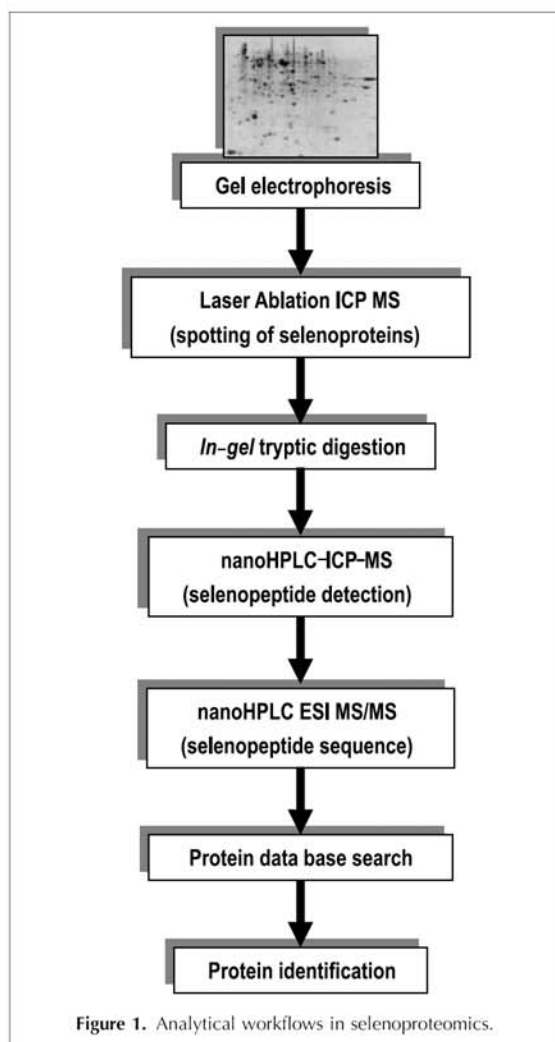
The principle of the approach (Fig. 1) is based on a classical workflow in proteomics in which the proteins separated by 1D or 2D gel electrophoresis are subject to in-gel digestion with trypsin followed by matrix-assisted laser-desorption/ionization (MALDI) (if the sequenced genome of the organism is known) and/or nano-high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem MS (nanoHPLC-ESI-MS²) analysis (also for *de novo* sequencing). As Se is covalently bound, the limitations of the technique are the same as classical proteomics. Additional problems are due to selenomethionine and selenocysteine being more prone to oxidation than their sulphur analogues, and the selenol residues undergo elimination more easily than the thiol residues [14].

Applying a classical proteomics approach to selenoproteomics usually fails as very few of the 1000 proteins contained within the gel actually contain Se, and it is these few that are of interest. In addition, the concentration of selenoproteins in the cell or in the extract is not usually higher than the upper picomolar range, so they are often accompanied in the gel by the non-selenized, more abundant proteins that are responsible for the appearance of the band or spot. Consequently, unless the protein is suitably enriched and purified, the ionization of Se peptides produced by its tryptic digestion is likely to be suppressed by the peptides from concomitant proteins present in excess in the band or even in the spot.

As has been shown in Fig. 1, the stated problems can be addressed at two levels:

- (i) the specific detection of Se-proteins in the gel by LA-ICP-MS in order to pick up targets for further characterization; and,
- (ii) the specific detection of Se-containing peptides in tryptic digests of the proteins from the gel to focus the sequence analysis on Se-containing peptides.

LA-ICP-MS was first applied in the context of selenoproteome research to reveal a number of Se-containing proteins in a waterfowl embryo and fish ovary collected from contaminated sites [15]. The method was later applied to the detection of glutathione peroxidase isolated from red blood cells [16], and extended to 2D gels of selenized-yeast proteins [16]. A comprehensive study by Chassaing et al. showed 2D-GE-LA-ICP-MS mapping of Se-containing proteins in a selenized yeast extract [17]. The advances in capillary HPLC [18,19] allowed specific peptide mapping by capillary HPLC-ICP-MS from the tryptic digests of proteins extracted from gel bands [18] or spots [19]. The peptides were identified by matching



the retention time of peaks in the HPLC-ICP-MS chromatogram of the in-gel digest with those present in the reference chromatogram of the purified and characterized protein [19]. The principal problems concern:

- (i) quantification because well-characterized standards of Se-proteins are unavailable; and,
- (ii) often insufficient sensitivity (most of developments were shown for the selenized yeast in which the concentration of protein-bound Se exceeded 1000 $\mu\text{g/g}$).

An even bigger challenge, that has so far been addressed with only limited success, is identification of the proteins extracted from the gel. Studies making it possible to distinguish between selenomethionine and selenocysteine in protein bands are scarce [20]. ESI mass spectra of intact proteins have been collected from the spots in which Se had been detected [17]. However, it is ambiguous as to whether they correspond to Se-containing proteins or to other proteins present in the spot in which Se was detected.

Spectra of peptides from purified proteins have been obtained from MALDI-MS [14,21,22] and ESI-TOF-MS [22,23]. However, a number of problems seem to prevent successful application of these techniques on proteins extracted from gels. They include an insufficient amount of extracted protein and suppression of ionization. Hence, there is interest in parallel ICP-MS detection that provides information on whether Se-containing peptides are present, how many and how much, and gives the retention time for the peptides to be identified by TOF-MS.

3. Protein detection and identification

3.1. LA-ICP-MS

All the applications to date used UV lasers (193 nm ArF, 266 nm Nd:YAG) at a pulse width in the low-ns range and repetition rate of 5–20 Hz. In our experiments, scans at a speed of 50–100 $\mu\text{m/s}$ resulted in an ablation zone (crater diameter) of ca. 100–150 μm and the depth of ca. 500 μm .

Fig. 2 demonstrates that ablation at these conditions is a linear function of concentration. Quantification can be carried out using external calibration without the need for more sophisticated techniques. The use of an ICP mass spectrometer equipped with a collision cell is essential to allow interference-free detection of the most-abundant ^{80}Se isotope, which, in turn, is the prerequisite of attaining the sub-pg (as Se) detection limits. The high sensitivity of LA-ICP-MS detection allows detection of proteins that cannot be detected by Coomassie Blue staining.

The sensitivity of Se detection can be increased by increasing the amount of protein that is ablated and transported into the ICP. It can be achieved (e.g., by

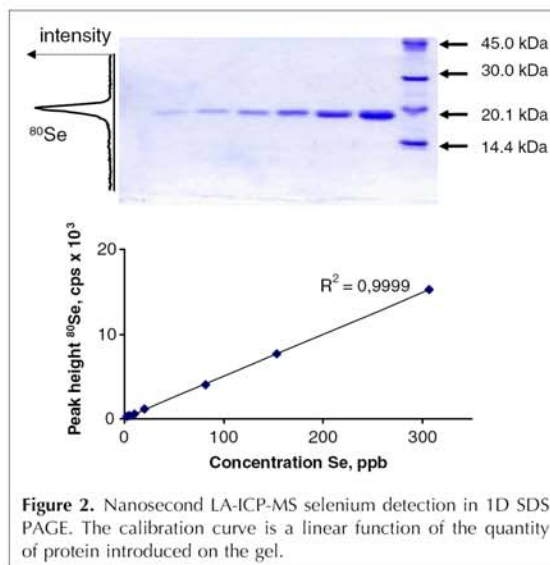
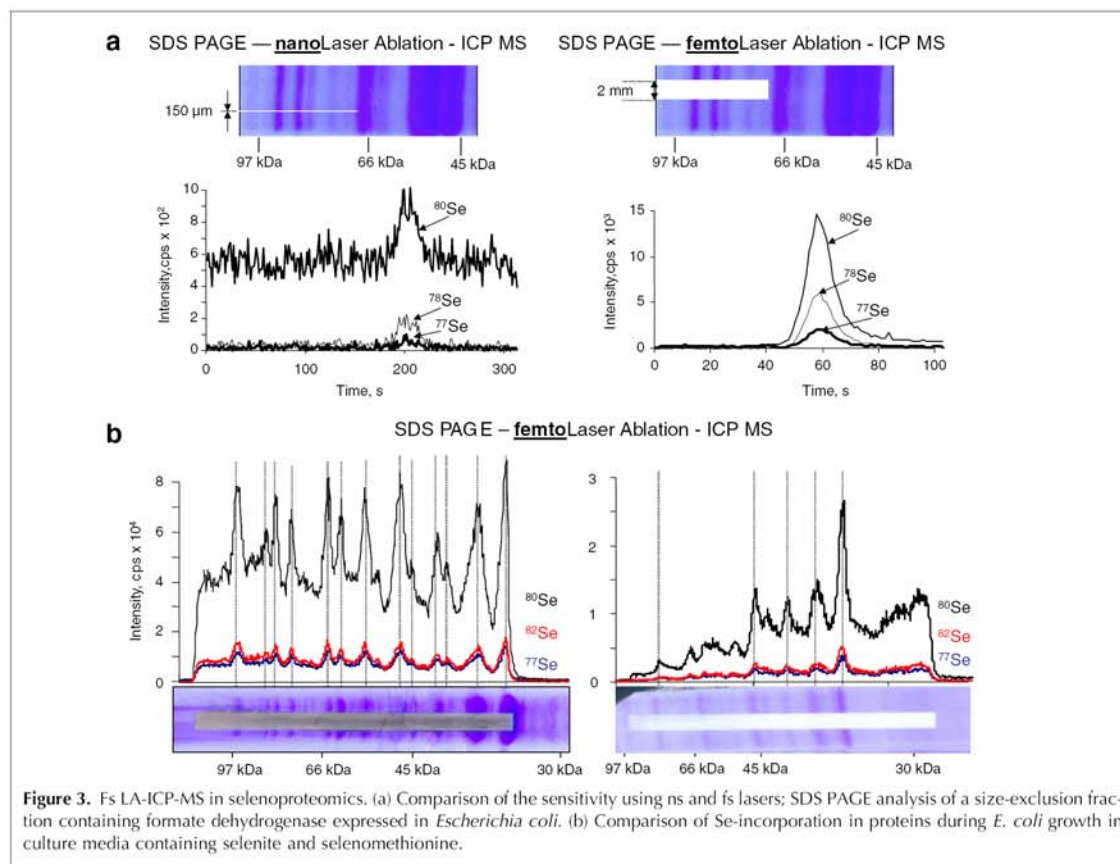


Figure 2. Nanosecond LA-ICP-MS selenium detection in 1D SDS PAGE. The calibration curve is a linear function of the quantity of protein introduced on the gel.

using an fs infra-red laser ($\lambda = 1030 \text{ nm}$) working at a much higher repetition rate (10 kHz) (Novalase, Sa, France) [24]. The energy per pulse is much lower (31 μJ instead of 1.6 mJ), and the fluence is maintained at high level (13 J/cm^2) due to a small spot size (<20 μm) for a better ablation yield. The combination of the high repetition rate and a fast scanning-beam device (patent pending) allows ablating quasi-instantaneously (ICP-MS detection timescale) in relatively large zones. The LA lane width can then reach 2 mm instead of <200 μm with the standard ns laser. The particle size is typically smaller, which facilitates their transport and atomization in the plasma. Fig. 3a compares the sensitivity of ns and fs LA for detecting a selenoprotein, formate dehydrogenase, which contains a single Se atom per 1 molecule (ca. 79 kDa) of the protein. For the GE ns LA-ICP-MS coupling, detection limits were in the sub-pg range [18]. This value is comparable in absolute terms with that attainable by using fs LA-ICP-MS when the same ICP-MS detector is used. However, as distinctly more matter can be ablated in a time unit by fs LA-ICP-MS, the signal-to-background ratio is considerably higher (ca. 20 times) than in the ns LA-ICP-MS.

Detection by fs LA-ICP-MS allows sensitive and fine studies of the incorporation of Se into proteins. The example shown in Fig. 3b shows the different incorporation patterns in *E. coli* grown in medium containing selenomethionine and selenite, the left and right panels, respectively. Note that an overlap between the protein pattern and the Se-distribution pattern does not always occur. Se may be incorporated into minor proteins that are not detectable by the Coomassie Blue staining.



3.2. MALDI-TOF-MS

Efficient extraction of intact proteins from the gel is difficult. Se-containing protein extraction was claimed by Chassaigne et al. [17] but neither the recovery or the presence of Se was seen in the ESI mass spectra. The problem is that a Se-containing protein can be accompanied at least by its methionine analogue, and the latter is more abundant and ionized preferentially.

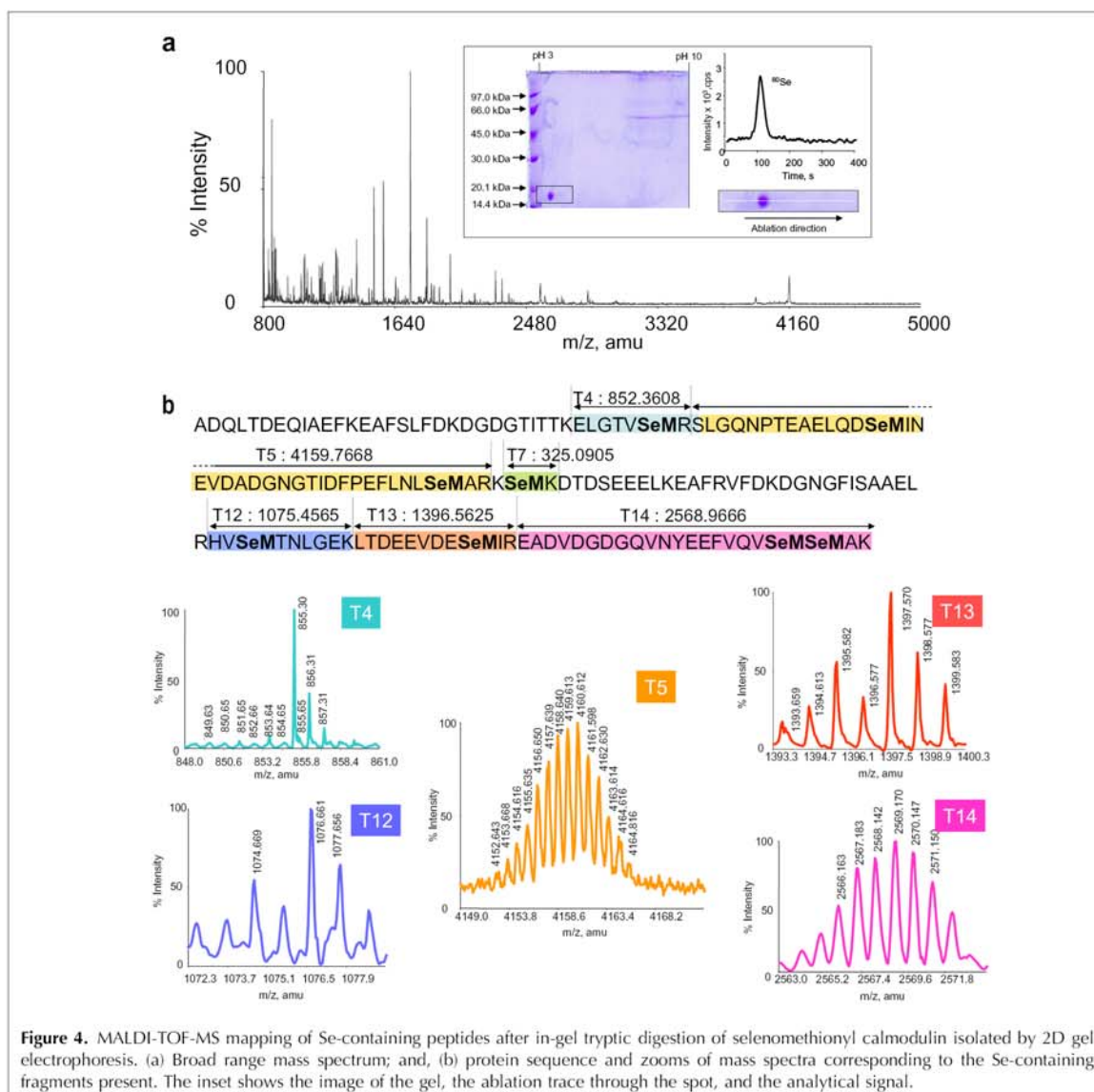
The use of trypsin to digest the original protein in gel is a well-known procedure for efficient protein extraction prior to molecular MS analysis [25]. As Se is covalently bound, it is present in the fragments issued from the tryptic digestion. Carboxymethylation is essential to protect the selenol groups in SeCys-containing selenoproteins but the derivatization agent may react with selenomethionine [26] and produce artefact peaks.

Fig. 4 shows a MALDI-MS spectrum obtained after extraction of the Se-calmoduline spot and the zooms on Se-containing peptides. As can be seen from the full-range mass spectrum (Fig. 4a), the Se compounds are

not the major ones, and isotopic patterns characteristic to selenocompounds cannot be recognized. Only careful selection of appropriate mass ranges (requiring prior knowledge of the protein sequence) allows detection of the Se-containing compounds in the extract. The sequence coverage is almost complete (except for T4 and T7 peptides) in terms of Se-containing peptides. Taking into account the amount of the protein present in the spot (1.34 μg), the detection limits are poor. They are negatively affected by:

- ionization of SeMet-containing peptides that is apparently poorer than that of their sulphur analogues;
- the rich isotopic pattern of Se; and,
- the multi-isotopic peaks present.

Note that no success was obtained for detection by MALDI-MS of the peptides extracted from the same amount of protein separated by 1D sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (without isoelectric focusing (IEF)) because some compounds extracted from the gels were apparently sufficient to suppress the signal.

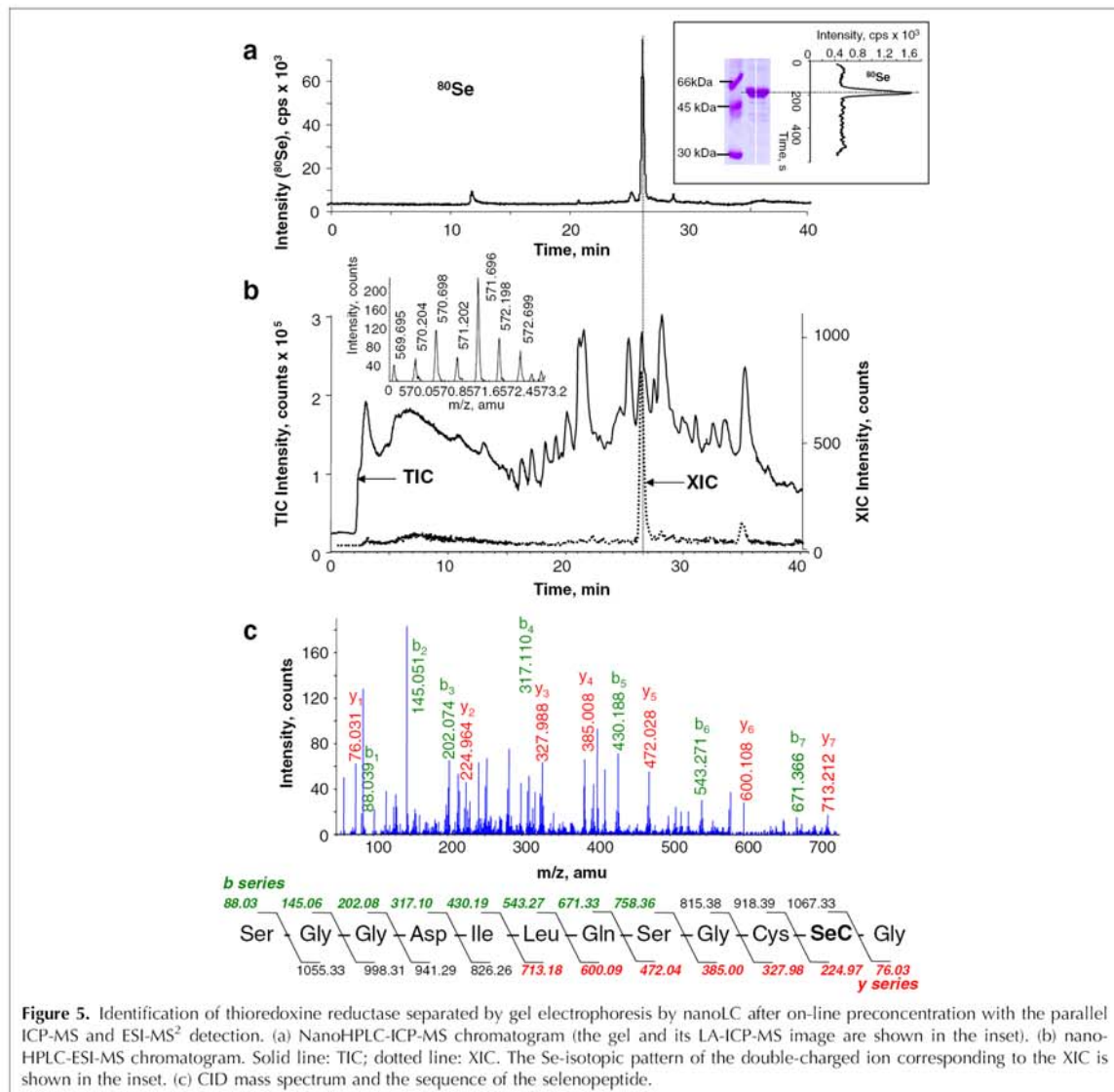


3.3. NanoHPLC with parallel ICP-MS and ESI-MS

Se peptides in the tryptic digest can be identified by nanoHPLC-ESI-MS². Our experience shows that the success of this approach strongly depends on the purity of the sample analyzed. In order to be detected, a minor selenopeptide must arrive virtually pure at the source at a given moment. Selenocompounds are located in the mass spectrum because of their isotopic patterns [27]. The search is manual so knowledge of the retention time is extremely helpful unless the protein is known and a particular ion can be searched for in order to generate an extracted ion chromatogram. The retention time at which

an Se compound should be detected can be determined by parallel ICP-MS detection [27,28]. An unbeatable advantage of ICP-MS detection is sub-femtogram sensitivity, regardless of the compound structure, quantitative response, and the lack of ionization suppression, even in the presence of a high concentration of co-eluting compounds. Hence, ICP-MS detection gives information about the number of compounds that should be identified by ESI-MS², their concentrations, the digestion efficiency, and the recovery from the column.

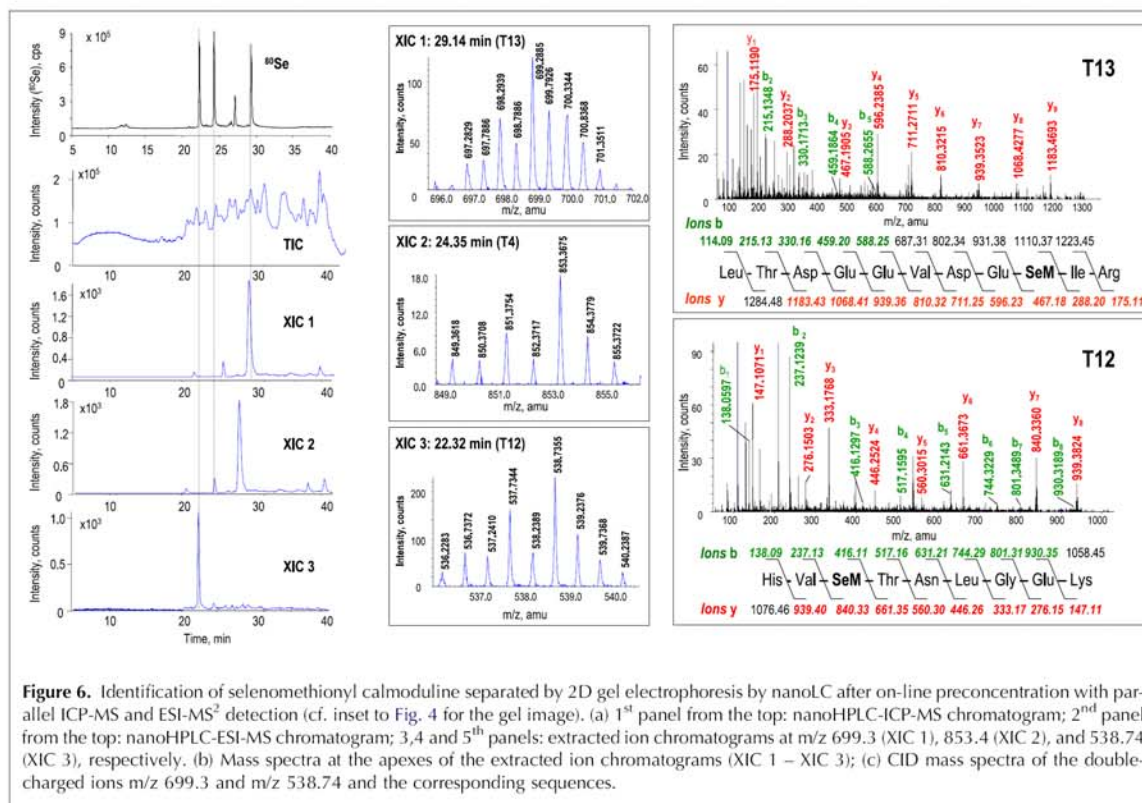
Fig. 5 illustrates principle of 1D-GE-LA-ICP-MS followed by nanoHPLC with parallel ICP-MS and ESI-MS² detection



for identification of rat thioredoxine reductase in the gel. The protein detected in the band by ns LA-ICP-MS (Fig. 5, inset in the top panel) was recovered by enzymatic digestion and analyzed by nanoHPLC-ICP-MS using a setup described elsewhere [28]. It produced a single intense peak corresponding to the selenopeptide peptide (only one was expected on the basis of the protein-database sequence). The middle panel shows a total ion chromatogram (TIC): the signal-to-noise ratio in the extracted ion chromatogram (XIC) of the ion corresponding to the peptide (see inset) is comparable to that with ICP-MS detection. This is because of the high purity of the Se-protein standard used. The thioredoxine reductase did

not need to be derivatized because of the presence of an internal S-Se bridge. The bottom panel of Fig. 5 confirms the identity of the peptide by MS². Most of *b*-series (green) and *y*-series (red) ions could be detected. This approach is sensitive (pg level) and can be considered as generic on the condition that the protein is well purified.

Another example of this approach shown in Fig. 6 concerns selenomethionyl calmodulin extracted from the 2D electrophoretic gel. NanoHPLC-ICP-MS shows four peaks out of six that should be present (*cf.* the sequence in Fig. 4). The smallest SeMetK dipeptide was not hydrophobic enough to be trapped on the pre-concentration column. The biggest, T5, could not be



detected for unknown reason. Of the four peaks detected, only three could be detected by ESI-MS. No Se pattern was identified in peak 3 probably because it was insufficiently pure. Only the signal-to-noise ratio of peptides T12 and T13 was enough to obtain sufficiently intense MS² spectra and to determine the peptide sequences. The intensity of the T4 peptide did not allow a reliable MS² spectrum to be obtained. This example shows the importance of the nanoHPLC-ICP-MS step to double check whether the lack of a signal in ESI-MS² detection is due to the absence of the peptide or the suppression of ionization by the concomitant species.

4. Conclusions

The recent advances in analytical methodology seem to be crucial in accelerating progress in the specific detection and identification of selenoproteins *in vivo*. Fs LA-ICP-MS appears to be the most sensitive detection technique for GE because of the capability of introducing considerably more material in a given time than when using ns LA. In contrast to radioactive-tracer-detection methods, GE-LA-ICP-MS is applicable to human samples. NanoHPLC-ICP-MS analysis is a valuable method for the

quantitative determination of the recovered peptides from bands or spots and very helpful for targeting peptides for ESI-MS² analysis. The sensitivity of MALDI-MS is sufficient for tryptic peptides originated from only well-purified and relatively concentrated proteins.

Acknowledgements

This work was financially supported by ANR (Agence Nationale de la Recherche). Support of the Aquitaine Region for the MS platform is acknowledged. Guillaume Ballihaut acknowledges the Ph.D. fellowship from the French Ministry of Research. The authors thank Dr. Elias Arner (Karolinska Institute, Stockholm, Sweden) for the gift of thioredoxine reductase and Judith Richter (LEM, UPPA) for technical help with gel electrophoresis and *E. coli* culture.

References

- [1] J. Szpunar. *Analyst* (Cambridge, U.K.) 125 (2000) 963.
- [2] A. Sanz Medel, M. Montes Bayon, M. Luisa Fernandez Sanchez. *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 236.
- [3] J. Szpunar. *Analyst* (Cambridge, UK) 130 (2005) 442.
- [4] S. Beranova-Giorgianni. *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 273.

- [5] T. Rabilloud, *Proteomics* 2 (2002) 3.
- [6] C.C. Chery, E. Dumont, R. Cornelis, L. Moens, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 371 (2001) 775.
- [7] D. Behne, A. Kyriakopoulos, *Annu. Rev. Nutr.* 21 (2001) 453.
- [8] R.L. Ma, C.W. McLeod, K. Tomlinson, R.K. Poole, *Electrophoresis* 25 (2004) 2469.
- [9] H.E. Ganther, *Carcinogenesis* 20 (1999) 1657.
- [10] M. Birringer, S. Pilawa, L. Flohe, *Nat. Prod. Rep.* 19 (2002) 693.
- [11] M.P. Rayman, *Lancet* 356 (2000) 233.
- [12] G.V. Kryukov, S. Castellano, S.V. Novoselov, A.V. Lobanov, O. Zehrab, R. Guigo, V.N. Gladyshev, *Science (Washington, D.C.)* 300 (2003) 1439.
- [13] G.V. Kryukov, V.N. Gladyshev, *EMBO Rep.* 5 (2004) 538.
- [14] S. Ma, R.M. Caprioli, K.E. Hill, R.F. Burk, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003) 593.
- [15] T.W.M. Fan, E. Pruszkowski, S. Shuttleworth, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1621.
- [16] C.C. Chery, D. Gunther, R. Cornelis, F. Vanhaecke, L. Moens, *Electrophoresis* 24 (2003) 3305.
- [17] H. Chassaing, C.C. Chéry, G. Bordin, F. Vanhaecke, A.R. Rodriguez, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 19 (2004) 85.
- [18] G. Ballihaut, L. Tastet, C. Pécheyran, B. Bouyssiére, O. Donard, R. Grimaud, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 493.
- [19] L. Tastet, D. Schaumlöffel, B. Bouyssiére, R. Lobinski, *Anal Bioanal Chem.* 385 (2006) 948.
- [20] C. Hammel, A. Kyriakopoulos, U. Rosick, D. Behne, *Analyst (Cambridge, U.K.)* 122 (1997) 1359.
- [21] S. Ma, K.E. Hill, R.F. Burk, R.M. Caprioli, *Biochemistry* 42 (2003) 9703.
- [22] L.H. Fu, X.F. Wang, Y. Eyal, Y.M. She, L.J. Donald, K.G. Standing, G. Ben-Hayyim, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25983.
- [23] A.T. Bauman, D.A. Malencik, D.F. Barofsky, E. Barofsky, S.R. Anderson, P.D. Whanger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2004) 308.
- [24] C. Pécheyran, S. Cany, O.F.X. Donard, *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.* 50 (2005) 228.
- [25] R.H. Aebersold, J. Leavitt, R.A. Saavedra, L.E. Hood, S.B. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 6970.
- [26] J.R. Encinar, D. Schaumlöffel, Y. Ogra, R. Lobinski, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6635.
- [27] M. Dernovics, P. Giusti, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 41.
- [28] P. Giusti, D. Schaumlöffel, H. Preud'homme, J. Szpunar, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 26.

Guillaume Ballihaut obtained his M.Sc. degree from the University of Pau, France, in 2003, and is currently finishing his Ph.D. at the same institution. His research is focused on the detection of selenoproteins in bacteria.

Christophe Pécheyran is research engineer at the CNRS (French National Research Council) working on the development of fs LA for sample introduction into the ICP.

Sandra Mounicou is CNRS research scientist working in the area of Se- and metal-protein complexes in biological systems.

Hugues Preud'homme is engineer at the CNRS, in charge of the MS platform at the UMR 5034 in Pau.

Régis Grimaud is lecturer in the Department of Biology at the University of Pau.

Ryszard Lobinski is research director at the CNRS and full professor at the Warsaw University of Technology. He leads the Group of Bio-inorganic Analytical Chemistry at the UMR 5034 in Pau dealing with topics related to element speciation in biological systems, metalloproteomics and metallomics.

Détection et identification de sélénoprotéines par électrophorèse sur gel associée aux spectrométries de masse atomique et moléculaire

Résumé : Le sélénium est un élément trace connu pour son caractère essentiel au développement de nombreux organismes vivants mais également pour ses effets bénéfiques sur la santé humaine. Les recherches effectuées ces cinq dernières années ont renforcé l'idée que ces propriétés seraient dues à la synthèse de sélénoprotéines chez les êtres vivants. Les méthodes classiques d'analyse protéomique ne sont pas adaptées à l'identification ciblée de ces sélénoprotéines très minoritaires. Les travaux de cette thèse ont consisté à développer des méthodes complémentaires plus spécifiques et sensibles en vue de leur détection et de leur identification. Un étalon protéique sélénié stable a été produit pour développer ces méthodes. Le couplage de l'ablation laser et de la spectrométrie de masse couplée à un plasma induit (LA-ICP-MS) a été mis en œuvre pour la détection des sélénoprotéines après une séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE). Le dispositif d'ablation laser conventionnel a ici été amélioré avec un laser femtoseconde à balayage très rapide permettant une détection plus sensible des sélénoprotéines dans les échantillons biologiques. Une fois détectées, les sélénoprotéines ont été identifiées en spectrométrie de masse moléculaire. Pour cela les sélénopeptides issus de la digestion enzymatique des sélénoprotéines sont d'abord repérés en nanochromatographie couplée à l'ICP-MS puis séquencés en nanochromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem à ionisation électrospray (nanoHPLC-ESI-MS/MS). La procédure en LA-ICP-MS développée a notamment permis la détection de nouvelles sélénoprotéines chez la bactérie *Desulfococcus multivorans*. La procédure d'identification a été validée sur deux sélénoprotéines purifiées thioredoxine réductase et glutathione peroxydase carboxyméthylée. La méthodologie développée contribuera à l'identification de nouvelles sélénoprotéines pour une meilleure compréhension des rôles physiologiques de ces molécules chez de nombreux êtres vivants.

Mots clefs : Sélénium - essentiel - sélénoprotéines - électrophorèses sur gel de polyacrylamide - ablation laser ICP-MS – nanoHPLC-ICP-MS – nanoHPLC-ESI-MS/MS - *Desulfococcus multivorans* - thioredoxine réductase - glutathione peroxydase

Detection and identification of selenoproteins in gel electrophoresis by atomic and molecular mass spectrometries

Abstract: Selenium is a trace element known for its necessity in organisms' development and its beneficial roles in human health. Research in the past five years strengthened the idea that these properties are largely due to the synthesis of selenoproteins in living organisms. Classical methods in proteomics are not adapted to identify minor selenoproteins. In this PhD work, more sensitive and more specific methods complementary to proteomics have been developed for their detection and identification. A stable selenized protein standard has been produced to develop these methods. The development of laser ablation - Inductively Coupled Plasma - Mass spectrometry coupling (LA-ICP-MS) lead to the detection of selenoproteins after separation by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Conventional device of laser ablation has been used and then improved with a new device using femtoseconde laser with ultrafast scanning for more sensitive detection of selenoproteins in biological samples. Once detected, selenoproteins have been identified by molecular mass spectrometry. For this purpose selenopeptids from enzymatic digestion of selenoproteins have been detected first by nanochromatography coupled to ICP-MS and sequenced then by means of by nanochromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry (nanoHPLC-ESI-MS/MS). LA-ICP-MS device has been successful for detection of new selenoproteins in *Desulfococcus multivorans* bacteria. This identification procedure has been validated on two purified selenoproteins thioredoxin reductase and carboxymethylated glutathion peroxidase. This developed methodology will lead to identification of selenoproteins and a better understanding of the physiological role of these molecules in numerous living organisms.

Key words: Selenium - essential - selenoproteins - polyacrylamide gel electrophoresis - laser ablation ICP-MS – nanoHPLC-ICP-MS – nanoHPLC-ESI-MS/MS - *Desulfococcus multivorans* - thioredoxin reductase - glutathion peroxidase