



# Développements en protéomique pour mieux comprendre la physiologie de l'ours brun hibernant et ouvrir la voie vers de nouvelles thérapies contre l'atrophie musculaire humaine

Blandine Chazarin

## ► To cite this version:

Blandine Chazarin. Développements en protéomique pour mieux comprendre la physiologie de l'ours brun hibernant et ouvrir la voie vers de nouvelles thérapies contre l'atrophie musculaire humaine. Chimie analytique. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAF037 . tel-02991593

**HAL Id: tel-02991593**

**<https://theses.hal.science/tel-02991593>**

Submitted on 6 Nov 2020

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

**UMR 7178**

**THÈSE** présentée par :

**Blandine CHAZARIN**

soutenue le : **15 octobre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie analytique

**Développements en protéomique pour  
mieux comprendre la physiologie de  
l'ours brun hibernant et ouvrir la voie  
vers de nouvelles thérapies contre  
l'atrophie musculaire humaine**

**THÈSE dirigée par :**

**M. BERTILE Fabrice**

Chargé de Recherche, CNRS, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M. PINEAU Charles**

Directeur de Recherche, INSERM, Université de Rennes

**Mme FOURNIER Isabelle**

Professeur, Université de Lille

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mme BERGOUIGNAN Audrey** Chargée de Recherche, CNRS, Université de Strasbourg





*« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand  
tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. »*

**Albert Einstein**

# Remerciements

Je remercie en premier lieu Sarah Cianferani pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique dès mon stage de master et ensuite pour une thèse.

Je tiens à remercier le CNES (Centre National d'Etude Spatial) et le CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) pour le soutien financier et logistique dont j'ai pu bénéficier durant ces trois années.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, en la personne de Mme Isabelle Fournier, M. Charles Pineau, Mme Audrey Bergouignan et Mme Guillemette Gauquelin-Koch pour le temps et l'investissement qu'ils ont consacrés à la lecture et à l'évaluation de mes travaux.

Un merci particulier à mon responsable de thèse, Fabrice Bertile, qui m'a accepté en stage, en thèse et qui m'a fait participer à des projets toujours plus intéressants et nouveaux. Je n'oublierai pas nos nombreux débats, les expressions de jeunes que je t'ai apprises et j'en passe. Plus sérieusement, je te considérerai toujours comme celui qui m'a laissé ma chance alors que je n'avais aucune expérience en spectrométrie de masse, celui qui m'a poussé à faire toujours mieux et qui a éveillé ma curiosité pour ce fameux ours brun. Pour tout cela : merci ! Je t'attends avec plaisir à Los Angeles et tu verras « ça va être superbe » !

Merci à tous ces collaborateurs, Etienne Lefai, Stéphanie Chanon, Stéphane Blanc, Elin Kure, Kenneth Storey, Laurence Vico, Jean-Pol Fripiat, les équipes du « Scandinavian Brown Bear Research Project » et Jérémy Terrien que j'ai côtoyés de près ou de loin et avec qui les discussions étaient toujours plus enrichissantes.

Enfin, merci à l'ensemble du LSMBO pour les échanges et l'entraide qui m'ont permis d'évoluer et d'en apprendre un peu plus chaque jour sur ce monde merveilleux de la protéomique ! Certaines personnes ont joué un rôle particulier durant ces trois ans :

Ahlala Jean-Marc ! Comment aurais-je pu comprendre la protéomique sans tes coups de main d'expert et tes cours sur « lard du vide » ? Aujourd'hui je pars en sachant utiliser une Nano et ça c'est grâce à toi !

Merci à Patrick d'avoir su relever le défi de toutes les petites exigences « bioinformatiques » que nous avons pu avoir avec Fabrice !

Je ne t'ai pas oublié Alex et j'espère que tu n'oublieras pas ces appels qui commençaient juste par un « Alex, j'ai un problème », qui, j'en suis sûre, vont te manquer ! Promis, je ne t'appellerai pas depuis Los Angeles !

Bien sûr je n'oublierai pas le Professeur (Docteur)<sup>2</sup> Fornecker pour ses conseils et son écoute tout au long de ces trois ans. Te voilà rassuré : ça y est je suis presque partie ! Quelle déception que tu n'aies pas été « disponible » pour être dans mon jury de thèse ! ;)

Merci à tous les doctorants qui ont partagé ces 3 années au laboratoire.

Je pense notamment à Maxime et Thomas pour nos weekends boulot, McDo, boulot qui auraient parus beaucoup plus longs sans votre présence. Merci à Joanna, Paola et Nicolas pour tout le soutien que vous avez su m'apporter au sein et en dehors du club-jeunes SFEAP ! Paola je n'oublierai pas qu'en « Summer School » tu es la meilleure gardienne des clefs qu'il soit ! Nicolas je compte sur toi pour que l'HCD soit connue et reconnue au labo ! Marie C. accroche toi à cette thèse et prouve à tout le LSMBO que les stats c'est pas si terrible ! Steve te voilà dans le même bateau et je te souhaite bon courage ! Tu verras la protéo c'est quand même un autre niveau que la supramol, ahah !

Aurélije je te laisse avec cette éternelle question « Est-ce que tu as déjà ... ? ». Finalement on aura bien éprouvé la loi de Murphy et plus d'une fois !

En tout cas, si aujourd'hui je suis capable de si bien m'occuper d'un Q-Ex c'est en partie grâce à toi Justine ! Ces échantillons nous ont mené la vie dure mais le Q-ex est resté vainqueur (souvent).

Elise je te confie le bureau et c'est promis je ne viendrai plus squatter ton bureau !

Merci à toutes les personnes du LSMBO que je n'oublierai pas : Agnès, Stéphane, Christine C., Christine S. François, Delphine, Evolène, Kevin, Oscar, Véronique, Laurence, Martine, Chloé, Leslie, Justine et Alfred.

Il y a des personnes, anciens du LSMBO, que je n'oublie pas ! Je pense au Dr Tascher qui m'a pris sous son aile et m'a initié au monde mystérieux de MaxQuant ! Je pense également à Danièle et à tous ces moments on a finalement su rire de mes malheurs en salle bio ! Je n'oublie pas Marie L. : tu as été une stagiaire exemplaire et bosseuse ! Je ne m'inquiète pas pour la suite de ton parcours ! En thèse il faut savoir décompresser et quoi de mieux que des discussions pleines d'enseignement, autour d'un café, avec Florent et Mathieu ? Honnêtement, ça restera longtemps gravé dans ma mémoire.

Enfin je remercie mes amis, Clémence en particulier. Tu as toujours été là pour moi, à la salle de musculation, sur le terrain de basket, à la terrasse d'un café, sur mon canapé et surtout à mon mariage ! Merci pour ce que tu as fait, ce que tu as dit ! Grâce à toi cette thèse a été moins lourde sur mes épaules !

Merci à ma famille. Vous avez remarqué mon absence et j'espère qu'aujourd'hui vous comprenez mieux à quoi je me suis consacrée. Cette réussite c'est aussi la vôtre, qu'elle vous apporte autant de force que celle que j'ai à présent.

Le meilleur pour la fin : Merci à mon mari, Hervé. Tu es arrivé dans ma vie comme un ouragan, redistribuant toutes les cartes (comme tu aimes le dire). Aujourd'hui nous sommes mariés et tu l'as bien mérité ce titre de « docteur par alliance » que tu attendais tant ! Tu as toujours su me soutenir, me contenir, me remotiver pour m'accrocher à cet exercice difficile qu'est la thèse. Je n'ai pas d'autres mots, juste : merci

# Publications, communications et médiation scientifique

## PUBLICATIONS (5) :

- B. E. Luu, E. Lefai, S. Giroud, J. E. Swenson, B. Chazarin, G. Gauquelin-Koch, J. M. Arnemo, A. L. Evans, F. Bertile, K. B. Storey (2019). "MicroRNAs facilitate skeletal muscle maintenance and metabolic suppression in hibernating brown bears", Journal of cellular physiology (DOI:10.1002/jcp.29294)
- B. Chazarin, A. Ziemianin, A. L. Evans, E. Meugnier, E. Loizon, I. Chery, J. M. Arnemo, J. E. Swenson, G. Gauquelin-Koch, C. Simon, S. Blanc, E. Lefai and F. Bertile (2019). "Limited oxidative stress favours resistance to skeletal muscle atrophy in hibernating brown bears (Ursus arctos)", Antioxidants (DOI: 10.3390/antiox8090334)
- B. Chazarin, A. Ziemianin, S. Chanon, M. Plumel, I. Chery, C. Durand, A. Evans, J. M. Arnemo, A. Zedrosser, J. E. Swenson, G. Gauquelin-Koch, K.B. Storey, C. Simon, S. Blanc, E. Lefai, and F. Bertile (2019). "Fuel metabolism in the skeletal muscles of hibernating brown bears", Frontiers in Zoology (DOI:10.1186/s12983-019-0312-2)
- G. Tascher, M. Gerbaix, P. Maes, B. Chazarin, S. Ghislin, E. Antropova, G. Vasslieva, N. Ouzren-Zarhloul, G. Gauquelin-Koch, L. Vico, J.P. Fripiat and F. Bertile (2018). "Proteomics analysis of femurs from mice embarked on board BION-M1 biosatellite reveals worsened decrease of B lymphopoiesis after one week of recovery on Earth", FASEB Journal (DOI:10.1096/fj.201801463R)
- S. Chanon, B. Chazarin, B. Toubhans, C. Durand, I. Chery, M. Robert, A. Vieille-Marchiset, J. E. Swenson, A. Zedrosser, A. Evans, S. Brunberg, J. M. Arnemo, G. Gauquelin-Koch, K. B. Storey, C. Simon, S. Blanc, F. Bertile, and E. Lefai (2017). "Proteolysis inhibition by hibernating bear serum leads to increased protein content in human muscle cells", Scientific Reports (DOI:10.1038/s41598-018-23891-5)

## COMMUNICATIONS PAR AFFICHE (7):

- B. Chazarin, S. Chanon, G. Gauquelin-Koch, S. Blanc, E. Lefai, and F. Bertile (Septembre 2019). "Label-free quantitative proteomics of human muscle cells treated with the serum from brown bears", congrès de Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique 2019 (SMAP), Strasbourg, France.

- B. Chazarin, A. Ziemianin, S. Chanon, A. Evans, J. M. Arnemo, G. Gauquelin-Koch, K. Storey, C. Simon, S. Blanc, E. Lefai, and F. Bertile (Mars 2019). "Proteomics unravels metabolic changes in skeletal muscles of hibernating brown bears", congrès européen 2019 (EuPa), Potsdam, Germany.
- B. Chazarin, S. Chanon, G. Gauquelin-Koch, S. Blanc, E. Lefai and F. Bertile (Octobre 2018). « La physiologie de l'ours hibernant pour appréhender de manière originale l'étude de l'atrophie musculaire humaine », CNES Jeunes Chercheurs days (JC2), Toulouse, France. **Lauréate CNES 2018**
- B. Chazarin, L. Kwiatek, A. Evans, J. Armeno, G. Gauquelin-Koch, S. Blanc, E. Lefai and F. Bertile (Octobre 2018). "Phosphoproteomics of bear muscle during hibernation", journée club-jeunes, SFEAP congress 2018, Albi (France) **Prix poster (European Proteomics Association)**
- B. Chazarin, M. Arrivé, I. Chery, A. Evans, J. Arnemo, M. Prost, G. Gauquelin-Koch, C. Simon, S. Blanc, E. Lefai and F. Bertile (2017), "Regional and general oxidative stress in hibernating brown bears", Colloque d'Ecophysiologie Animale (CEPA III), Strasbourg, France. **Prix poster**
- B. Chazarin, S. Chanon, G. Gauquelin-Koch, S. Blanc, E. Lefai and F. Bertile (2017), "Compared effects of beta-hydroxybutyrate and bear serum on the proteome of human muscle cells", Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Analyse Protéomique 2017 (SMMAP), Paris, France.
- B. Chazarin, M. Benhaim-Delarbre, M. Maillard, J. Terrien and F. Bertile (2017), "Liver proteome changes in a seasonal primate reveal possible mechanisms underlying the safe uncoupling of obesity and insulin resistance", Brixen Summer School, Brixen, Italy.

#### COMMUNICATIONS ORALES (7):

- B. Chazarin, L. Kwiatek, A. Evans, J. Armeno, G. Gauquelin-Koch, S. Blanc, E. Lefai and F. Bertile (October 2018). "Phosphoproteomics of bear muscle during hibernation", young clubs day, congress SFEAP 2018, Albi (France)
- B. Chazarin, M. Plumel, A. Ziemianin, I. Chery, P. Guterl, G. Gauquelin-Koch, S. Blanc and F. Bertile (Juin 2018). "Complementary of proteomic strategies to study bear muscle responses to hibernation", Scientific day of AfSep, Club Grand-Est, Strasbourg, France
- B. Chazarin, M. Benhaim-Delarbre, M. Maillard, J. Terrien and F. Bertile (2018). « Liver proteome changes in a seasonal primate reveal possible mechanisms underlying the safe uncoupling of obesity and insulin resistance », club-jeunes SFEAP, Rennes, France
- B. Chazarin, G. Tascher, I. Chery, A. Evans, J. Arnemo, M. Prost, G. Gauquelin-Koch, C. Simon, S. Blanc, E. Lefai and F. Bertile (2017), "Muscle molecular responses elicited during hibernation on brown bears", Colloque d'Ecophysiologie Animale (CEPA III), Strasbourg, France.
- B. Chazarin, M. Arrivé, I. Chery, A. Evans, J. Arnemo, M. Prost, G. Gauquelin-Koch, C. Simon, S. Blanc, E. Lefai and F. Bertile (2017), "Regional and general oxidative stress in hibernating brown bears", Colloque d'Ecophysiologie Animale (CEPA III), Strasbourg, France.

- B. Chazarin, S. Chanon, G. Gauquelin-Koch, S. Blanc, E. Lefai and F. Bertile (2017), “Compared effects of beta-hydroxybutyrate and bear serum on the proteome of human muscle cells”, Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Analyse Protéomique (SMMAP), Paris, France. **Prix presentation jeune chercheur**

MEDIATION SCIENTIFIQUE :

- Participation à un documentaire sur l’hibernation de l’ours brun : “Fort comme un ours” diffusé sur ARTE et à l’international.
- Participation à un reportage sur RTS (Suisse), émission CQFD, “La biologie de l’espace: hibernation pour vols longue durée”.
- **Demi-finaliste nationale** du concours “Ma thèse en 180 secondes”, Univ. de Strasbourg, France. **Prix lycéen de la finale régionale d’Alsace**, Univ. de Strasbourg, France



*Crédit photo : Dr Andreas Zedrosser*



## Liste des principales abréviations

2D-DIGE : *2 Dimensions – Differential Gel Electrophoresis*

ACN : acétonitrile

AF : Acide Formique

ATP : Adenosine TriPhosphate

BOH :  $\beta$ -hydroxybutyrate

BS6 : *Blue Sepharose 6 Fast Flow*

DTT : Dithiothreitol

FC : Facteur de Changement d'abondance

FCS : *Foetal Calf Serum* (sérum de veau foetal)

FDR : *False Discovery Rate*

GO : *Gene Ontology*

IAM : IodoAcétaMide

iRT : *indexed Retention Time*

LCR : Liquide Cephalo-Rachidien

LFQ : *Label-Free Quantification*

MOAC : *Metal Oxide Affinity Chromatography*

MWCO : *Molecular Weight Cut-Off*

PaGE : *Poly-acrylamide Gel Electrophoresis*

PP2 : *Proteome Purify 2*

PTM : *Post-Translational Modification* (Modification Post-Traductionnelle)

RefSeq : *Reference Sequence*

ROS : *Reactive Species of Oxygen* (espèces réactives de l'oxygène)

SBS : *Summer Bear Serum*

SEC : *Size Exclusion Chromatography* (chromatographie d'exclusion stérique)

SDS : Sodium DodecylSulfate

SRM : *Single Reaction Monitoring*

TCA : acide TriChloroAcetic

TiO<sub>2</sub> : dioxyde de titane

UC : UltraCentrifugation

WBS : *Winter Bear Serum*

XIC : *eXtracted Ion Current*

## Table des matières

|                                                                                                                                                                                                  |                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Introduction générale.....</b>                                                                                                                                                                | <b>1</b>                           |
| <b>Partie 1 : Introduction à l'analyse protéomique .....</b>                                                                                                                                     | <b>4</b>                           |
| <b>Chapitre 1 - Analyse protéomique par spectrométrie de masse.....</b>                                                                                                                          | <b>4</b>                           |
| 1. Préparation d'échantillon pour une approche « <i>bottom-up</i> » : de l'extraction des protéines à l'obtention de peptides .....                                                              | 6                                  |
| 2. La chromatographie liquide : décomplexification peptidique en ligne.....                                                                                                                      | 20                                 |
| 3. L'instrumentation en spectrométrie de masse .....                                                                                                                                             | 22                                 |
| <b>Chapitre 2 - Identification, quantification et interprétation biologique.....</b>                                                                                                             | <b>39</b>                          |
| 1. Stratégies d'identification chez les espèces séquencées .....                                                                                                                                 | 39                                 |
| 2. Stratégies d'identifications chez les espèces non séquencées .....                                                                                                                            | 44                                 |
| 3. Stratégies de quantification des protéines .....                                                                                                                                              | 47                                 |
| <b>Contexte et problématique biologique.....</b>                                                                                                                                                 | <b>55</b>                          |
| <b>Partie 2 : Résultats .....</b>                                                                                                                                                                | <b>Erreur ! Signet non défini.</b> |
| <b>Chapitre 1 - Développements bioinformatiques pour l'étude d'espèces « exotiques » par spectrométrie de masse.....</b>                                                                         | <b>62</b>                          |
| 1. Trouver la protéine humaine homologue d'une protéine d'une espèce « exotique » .....                                                                                                          | 63                                 |
| 2. Extractions des annotations fonctionnelles de la base de données <i>Gene Ontology</i> pour une liste de protéines .....                                                                       | 64                                 |
| 3. Calcul d'enrichissement en annotations fonctionnelles .....                                                                                                                                   | 65                                 |
| 4. Visualisation des régulations d'abondance des protéines sur les cartes du métabolisme et des voies de signalisation de la banque de données <i>KEGG</i> .....                                 | 66                                 |
| 5. Extraction des localisations tissulaires des protéines documentées sur la base de données <i>neXtProt</i> .....                                                                               | 68                                 |
| <b>Publication 1 .....</b>                                                                                                                                                                       | <b>263</b>                         |
| 6. Identification des protéines en utilisant une banque de données protéiques issue de données d'assemblages du génome ( <i>RefSeq</i> ) : application à l'étude d'une espèce non-séquencée..... | 71                                 |
| 7. Extraction des rôles biologiques des sites de phosphorylations sur les séquences des protéines de l'ours brun .....                                                                           | 76                                 |
| <b>Chapitre 2 – Développement de stratégies analytiques appliquées à l'étude d'échantillon d'ours brun .....</b>                                                                                 | <b>79</b>                          |
| 1. Des approches complémentaires de protéomique quantitative pour explorer les régulations du protéome musculaire et du tissu adipeux de l'ours brun hibernant .....                             | 80                                 |
| <b>Publication 2 .....</b>                                                                                                                                                                       | <b>86</b>                          |

|                                                                                                                                                                                                                     |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Publication 3</b> .....                                                                                                                                                                                          | 120        |
| 2. Développement d'une méthode microLC-SRM pour quantifier l'adiponectine dans le sérum d'ours .....                                                                                                                | 101        |
| 3. Caractérisation par spectrométrie de masse du cargo protéique des exosomes isolés à partir de sérum d'ours brun .....                                                                                            | 109        |
| 4. Identification des protéines du LCR d'ours brun par spectrométrie de masse.....                                                                                                                                  | 118        |
| 5. Optimisation d'une approche de phosphoprotéomique sur le muscle de l'ours .....                                                                                                                                  | 124        |
| <b>Chapitre 3 : Etude des régulations du protéome de cellules musculaires humaines traitées avec du sérum d'ours hibernant (WBS) par une analyse par spectrométrie de masse quantitative et sans marquage</b> ..... | <b>184</b> |
| <b>Publication 4</b> .....                                                                                                                                                                                          | <b>208</b> |
| <b>Chapitre 4 : identification des composés actifs du sérum d'ours hibernant (WBS)</b> .....                                                                                                                        | <b>206</b> |
| 1. Approche « ciblée » : caractérisation du protéome de myotubes humains exposés à une haute concentration de BOH .....                                                                                             | 209        |
| 2. Approche « globale » : utilisation d'outils biochimiques pour digérer ou fractionner les protéines contenues dans le sérum de l'ours brun .....                                                                  | 221        |
| <b>Conclusion générale</b> .....                                                                                                                                                                                    | <b>262</b> |
| Références bibliographiques .....                                                                                                                                                                                   | 285        |

# Introduction générale

# Introduction générale

Classiquement, la recherche scientifique en biologie utilise des modèles biologiques, cellulaires ou animaux, qui miment la pathologie étudiée pour en déterminer l'étiologie et les mécanismes sous-jacents. Le biomimétisme s'appuie sur l'étude de mécanismes naturels pour en copier les caractéristiques et c'est aujourd'hui une nouvelle branche de la recherche chimique [1]. L'application du biomimétisme à la recherche médicale est de plus en plus répandue et consiste à étudier des organismes capables de se préserver naturellement face à des situations où l'homme développerait une pathologie [2]. Afin d'étudier les phénotypes de ces organismes, l'étude du génome (i.e. ensemble des gènes) et du transcriptome (i.e. ensemble des transcrits exprimés) est courante. Cependant, le protéome (i.e. ensemble des protéines exprimées) est plus proche du phénotype [3], comparé au génome et au transcriptome, ce qui en fait une cible de choix pour mieux appréhender les adaptations physiologiques. Grâce à la spectrométrie de masse, le protéome est caractérisé en identifiant et en quantifiant jusqu'à plusieurs de milliers de protéines, dans des échantillons très complexes [4]. Cette technologie a énormément évolué ces dernières années avec des appareils toujours plus résolutifs, sensibles et précis [5].

Le cycle saisonnier de l'ours brun est caractérisé par une hibernation de 5 à 7 mois pendant laquelle, malgré une immobilisation prolongée et un jeûne total, il est capable de se protéger de l'atrophie musculaire, de problèmes circulatoires, cardiaques, vasculaires et osseux [6]. Ainsi l'étude de la physiologie de l'ours brun hibernant pourrait ouvrir la voie à des solutions thérapeutiques contre de nombreuses pathologies humaines [7], notamment pour lutter contre l'atrophie humaine (voir « Contexte et Problématique biologique », page 55). Nous avons donc

fait le choix d'explorer et de caractériser les adaptations de l'ours brun grâce à des stratégies par spectrométrie de masse.

Ce manuscrit s'articule en deux parties. **Dans la première partie**, sera présentée un état de l'art des stratégies de protéomique qualitative et quantitative. L'ensemble des étapes clefs sera abordé, de la préparation d'échantillons, en passant par l'analyse par spectrométrie de masse et le traitement des données, jusqu'à l'interprétation biologique des résultats.

**Dans une seconde partie**, seront présentés les travaux de cette thèse. **Le premier chapitre** décrira les développements bioinformatiques mis en place pour l'étude par spectrométrie de masse d'une espèce « exotique » (i.e. dont le génome n'est pas séquencé), comme l'ours brun. **Dans un second chapitre**, les résultats obtenus par spectrométrie de masse sur les changements du protéome musculaire et du protéome du tissu adipeux de l'ours brun, entre la phase hibernante et active, seront présentés. Par ailleurs, nous avons mis en place une méthode de dosage de l'adiponectine par LC-SRM et une identification par LC-MS/MS du cargo protéique d'exosomes sériques et des protéines du liquide céphalo rachidien. Par ailleurs, la spectrométrie de masse est également une technologie largement exploitée pour étudier les modifications post-traductionnelles des protéines, comme la phosphorylation, responsables de l'activité, de la durée de demi-vie et de la localisation des protéines. Nous avons donc mis au point un protocole de phosphoprotéomique (i.e. identification et localisation des sites de phosphorylation sur une séquence protéique) pour caractériser les modifications des protéines du muscle squelettique de l'ours hibernant.

Récemment, nous avons démontré qu'il existait des composés actifs dans le sérum d'ours brun hibernant (et non dans le sérum d'ours brun actif) induisant une réduction de la synthèse protéique et de la protéolyse (de manière plus importante) de myotubes humains [8]. Nous avons analysé par spectrométrie de masse, des myotubes humains exposés au WBS (*Winter Bear Serum*) et au SBS (*Summer Bear Serum*) afin de déterminer les régulations globales du protéome des cellules musculaires humaines et les résultats sont présentés **dans un troisième chapitre**.

**Dans un quatrième chapitre** sont développées l'ensemble des stratégies mises en place afin d'identifier les composés actifs ou de fractionner le contenu du sérum d'ours brun. Tout d'abord, nous avons comparé les régulations du protéome de myotubes humains exposés à une molécule « candidate », le beta-hydroxybutyrate, avec les régulations du protéome de myotubes exposés au WBS. Enfin, des outils biochimiques ont été utilisés et optimisés pour fractionner le sérum d'ours brun, afin de déterminer les fractions susceptibles de contenir ces composés actifs.

En conclusion, seront présentés les développements réalisés aux différentes étapes d'une analyse par spectrométrie de masse, et leur application à l'étude des adaptations de l'ours brun hibernant (comparé à la phase active) et à l'identification des composés actifs dans le sérum d'ours brun.

# Partie 1 : Introduction à l'analyse protéomique



# Partie 1 : Introduction à l'analyse protéomique

## Chapitre 1 - Analyse protéomique par spectrométrie de masse

La protéine est une molécule fonctionnelle définie en 1838 par Berzelius pour l'albumine et la fibrine [9]. Depuis, l'intérêt pour le protéome (i.e. ensemble des protéines exprimées à un temps donné, dans un tissu, des cellules ou un organelle) n'a cessé de croître. Représentatif de l'expression génétique et responsable des réactions biochimiques d'un organisme, les variations du protéome sont la réponse majeure aux stimuli environnementaux [10]. Il est désormais courant de l'étudier pour comprendre des adaptations physiologiques ou le développement de pathologies comme le cancer.

La protéomique vise à identifier, caractériser et quantifier les protéines exprimées dans un tissu, des cellules ou une organelle à un temps donné. La spectrométrie de masse s'est imposée dans ce domaine depuis quelques années. Les avancées technologiques dans ce domaine permettant d'identifier et de quantifier jusqu'à plusieurs milliers de protéines simultanément. Il existe aujourd'hui trois approches [11], dont la plus représentée est l'approche « *bottom-up* » [12]. Celle-ci consiste à analyser les peptides issus de la digestion enzymatique des protéines sur un couplage de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse (LC-MS/MS). La trypsine est largement utilisée comme enzyme de digestion protéolytique. Du fait d'une haute spécificité des sites de clivage sur la séquence protéique, elle permet d'avoir une digestion reproductible produisant des peptides de tailles compatibles (en moyenne une dizaine d'acides

aminés) avec une bonne efficacité d'ionisation. Les spectres de masse obtenus pour les peptides sont identifiés *via* l'utilisation de banques de données, permettant de remonter jusqu'à l'identification des protéines dont ils sont issus.

Il existe également une stratégie appelée « *top-down* » [13] qui consiste à analyser les protéines entières. Les spectres de masse obtenus sont très complexes puisqu'ils représentent les différents états de charges des protéines et de leurs fragments. Cette méthode est davantage adaptée à l'étude d'échantillons peu complexes.

Enfin l'approche « *middle-down* » [14] est une combinaison des deux approches présentées ci-dessus. Les informations spectrales sont obtenues avec l'analyse des peptides issus de la digestion protéique mais avec une enzyme protéolytique générant des peptides de tailles plus importantes que dans l'approche « *bottom-up* » (jusqu'à 20kDa).

Dans ce manuscrit, les travaux ont été réalisés par approche « *bottom-up* » et seules les étapes de cette stratégie y seront présentées.

## 1. Préparation d'échantillon pour une approche « *bottom-up* » : de l'extraction des protéines à l'obtention de peptides

### a. Extraction des protéines

Les échantillons biologiques à analyser peuvent être des plus purifiés comme un anticorps, jusqu'à un échantillon des plus complexes comme un organisme entier. Les méthodes d'extraction des protéines tiennent compte de cette complexité. Dans le cas de cellules de mammifères, la membrane plasmique est rompue par ajout d'un tampon de lyse chimique [15], par application d'un choc osmotique ou encore par sonication. Dans le cas de tissus, une étape de broyage mécanique est d'abord nécessaire. Il est essentiel de noter que lors de la phase d'extraction des protéines, un inhibiteur de protéases doit être ajouté afin d'éviter la dégradation des protéines. Dans le cas de la recherche de modifications post-traductionnelles, il est également crucial de compléter le tampon de lyse avec, dans le cas d'études des phosphorylations, des inhibiteurs de phosphatases.

Lors de l'étape d'extraction, l'ensemble du contenu des cellules va être libéré : protéines, acides nucléiques, lipides, sels, etc. Afin d'isoler les protéines, une étape de précipitation des protéines est réalisée. La précipitation avec le TCA (acide TriChloroAcétique) et la précipitation avec des solvants organiques (éthanol, acétone) sont les plus répandues. Cependant, la perte de protéines est moins importante avec une précipitation à l'acétone comparée à une précipitation au TCA ou une précipitation avec du méthanol et du chloroforme [16]. De plus, même si la précipitation à l'acétone induit des modifications sur les séquences peptidiques [17], elle est facile à réaliser et aboutit à un culot plus stable et plus facile à solubiliser [18].

Dans le cas d'échantillons avec des volumes importants (comme des surnageants de cultures cellulaires), l'utilisation de solvants organiques tels que l'éthanol et l'acétone sont peu adaptés pour des échantillons de grand volume, puisque 3 à 9 volumes de ces solvants sont ajoutés, par rapport au volume de l'échantillon [19]. La précipitation avec du phénol démontre une plus grande efficacité, mais le culot de protéines est difficilement solubilisable [20].

### b. Décomplexification du mélange protéique

Un échantillon biologique peut-être extrêmement complexe de par la diversité des espèces protéiques et de leurs concentrations. La gamme dynamique est source de difficultés pour les analyses par spectrométrie de masse. Les protéines majoritaires induisent des signaux MS beaucoup plus importants ce qui empêche la détection des signaux plus faibles des protéines peu abondantes. C'est l'une des grandes problématiques pour l'étude des fluides biologiques dont la gamme dynamique est très importante. Dans le cas du plasma ou du sérum, la gamme dynamique atteint jusqu'à 12 ordres de grandeur, avec 99% du protéome qui sont représentés par seulement 20 protéines majoritaires. Plusieurs milliers de protéines sont inclus dans les 1% restants [21, 22].

Afin de contourner cette contrainte analytique, des solutions sont mises en place dès la préparation d'échantillons avec, par exemple, l'utilisation de gels d'acrylamide pour décomplexifier le mélange protéique ou des méthodes de déplétion en protéines majoritaires.

## Séparation des protéines sur gel d'acrylamide monodimensionnel

Le gel d'acrylamide est une matrice inerte permettant de séparer les protéines selon leurs tailles *via* la création de « mailles de gels » composées d'acrylamide et de bis-acrylamide. Grâce à l'ajout de TEtraMéthylEthylèneDiamine (TEMED) et d'Ammonium PerSulfate (APS), les deux molécules s'associent en un maillage plus ou moins dense selon leurs concentrations.

Avant décomplexification, un tampon est ajouté aux protéines extraites. Il contient des agents réducteurs permettant une rupture des ponts disulfures ce qui aboutit à la perte de la conformation tridimensionnelle des protéines. Il contient également des détergents, comme le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), qui permet d'ajouter des charges négatives sur l'ensemble de la séquence protéique avec 1,4 g de SDS fixé par gramme de protéine, soit une charge négative ajoutée tous les 2 acides aminés en moyenne [23]. Ensuite les échantillons sont incubés à 95°C pour obtenir des protéines complètement déstructurées (i.e. « linéaires »). Une fois déposées sur le gel d'acrylamide, l'application d'un champ électrique amènera les protéines à cheminer au travers des mailles du gel. Plus la séquence d'une protéine sera longue, plus il lui sera difficile d'évoluer dans le gel. Cette méthode de séparation est appelée « électrophorèse » [24].

Dans le cas où les protéines sont séparées uniquement sur la base de leur masse moléculaire (i.e. leur taille) il s'agit d'une migration monodimensionnelle autrement connue sous le nom de gel 1D ou SDS PaGE. Le gel est composé de deux parties : la partie la plus haute sur laquelle sont déposés les échantillons est le gel de concentration. Ce dernier a pour fonction de concentrer les protéines avant l'entrée dans la seconde partie séparative du gel (i.e. le gel de séparation) (Figure 1).

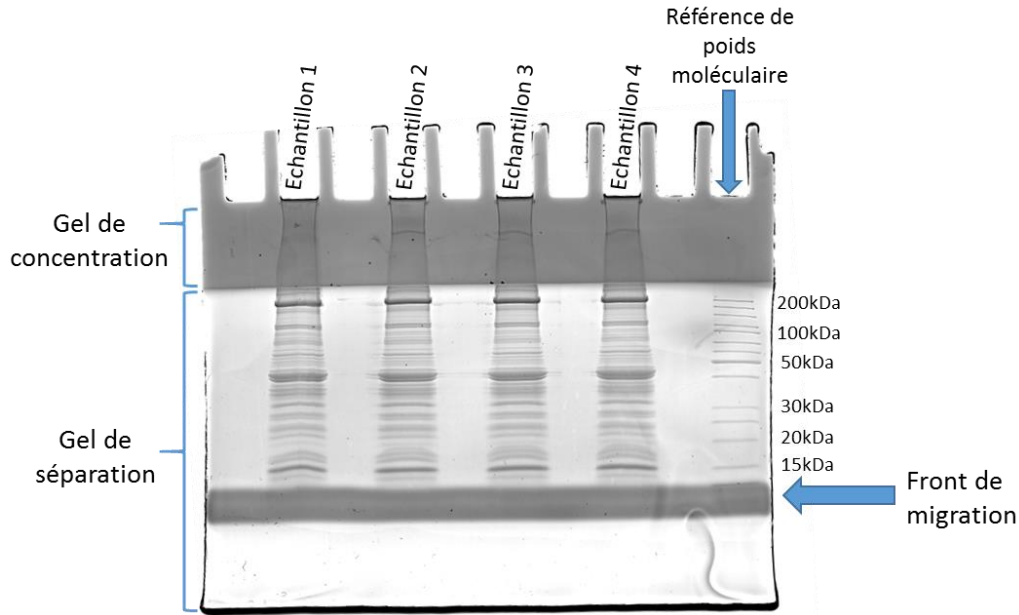


Figure 1 : Prise d'image d'une migration sur gel SDS PaGE de protéines musculaires, après coloration.

Suite à la migration, une étape de fixation est nécessaire afin d'empêcher les protéines de diffuser dans le gel. Celui-ci est plongé dans une solution contenant de l'éthanol et de l'acide phosphorique afin de « fixer », de piéger les protéines au sein du gel. Enfin, l'ajout d'un colorant comme le bleu colloïdal permet de visualiser les protéines qui apparaîtront comme des « bandes protéiques » réparties sur la hauteur du gel.

### Séparation des protéines sur gel d'acrylamide selon deux dimensions

Pour augmenter le niveau de décomplexification, une séparation supplémentaire selon le point isoélectrique des protéines est réalisée dans un premier temps. Il s'agit de l'électrophorèse bidimensionnelle ou gel 2D. Lors de la première étape, une bande de gel d'acrylamide est fonctionnalisée avec l'ajout d'acides et de bases faibles appelés immobilines. Un gradient de pH est ainsi établi sur toute la longueur de la bande de gel. Les protéines qui y sont ensuite ajoutées vont se focaliser sur la zone de pH correspondant à leurs pI (point isoélectrique) grâce à

l'application d'un courant électrique. Par la suite une séparation selon le poids moléculaire des protéines est réalisée comme pour un gel SDS PaGE.

Contrairement à la méthode de migration monodimensionnelle, les espèces protéiques très proches tels que les isoformes ou les protéines modifiées de manière post-traductionnelles sont séparées, grâce à la séparation selon le pI des protéines. De la même manière, il est possible de différencier des espèces protéiques différentes mais de masse moléculaire proches, ce qui n'est pas le cas avec une migration sur gel SDS PaGE.

Pour une approche quantitative avec marquage, différents fluorophores sont ajoutés aux extraits protéiques. Cette technique est appelée 2D-DIGE (*2 Dimensions – Differential Gel Electrophoresis*) décrit en page 49. Sachant qu'un spot protéique peut contenir quelques dizaines de protéines différentes, il est nécessaire d'établir les protéines majoritaires responsables de la différence de fluorescence entre les deux échantillons. Pour cela l'indice d'abondance protéique (*Protein Abundance Index – PAI*) est calculé en divisant le nombre de peptides identifiés par le nombre de peptides tryptiques théoriques pour une protéine donnée [25]. Plus le PAI est élevé, plus la protéine est considérée comme majoritaire dans le spot protéique analysé.

L'avantage de cette technique est de pouvoir garder un important niveau de décomplexification et de faire des mesures quantitatives relatives au niveau protéique sur une même matrice (cela élimine certains biais de la préparation d'échantillons pouvant influencer une approche quantitative). A contrario, l'approche 2D sur gel d'acrylamide est chronophage, et demande que l'utilisateur soit expérimenté dans ce type de préparations [26].

## Décomplexification avec la méthode tube-gel

Depuis 2005, une nouvelle méthode de purification de mélange protéique est étudiée en utilisant une matrice de gel d'acrylamide mais sans migration électrophorétique : le tube-gel [27]. Les extraits protéiques sont directement ajoutés à la matrice de gel d'acrylamide avant la solidification de cette matrice. Le tube-gel est ensuite segmenté et les protéines présentes dans chaque segment sont ensuite digérées au sein du gel pour l'analyse par spectrométrie de masse. Plus récemment, cette technique a été exploitée pour des approches de protéomique, et a été comparée avec la méthode de préparation d'échantillons sur un gel SDS PaGE [28]. Le tube gel a l'avantage d'être une préparation compatible avec un grand nombre de détergents. C'est avant tout une méthode rapide, dont le nombre réduit d'étapes permet de limiter les pertes d'échantillon. Il est important de noter que l'utilisation de tube-gel induit une plus grande proportion de résidus cystéines par des carbamydométhylations comparé au gel SDS PaGE [28]. Selon la complexité de l'échantillon, le niveau d'expérience de l'utilisateur et la volonté de multiplexer les échantillons, la stratégie analytique pour la préparation d'échantillon est définie (Table 1).



Table 1 : Tableau comparatif des différentes méthodes de préparation d'échantillon sur des matrices de gels d'acrylamide.

| méthodes \ critères     | Décomplexification | Difficulté à réaliser | Marquage | Multiplexage |
|-------------------------|--------------------|-----------------------|----------|--------------|
| gel 2D-DIGE             | +++                | +++                   | Avec     | Oui          |
| gel 2D                  | +++                | +++                   | Sans     | Non          |
| gel SDS-PaGE (stacking) | +                  | ++                    | Sans     | Non          |
| gel SDS-PaGE (running)  | ++                 | ++                    | Sans     | Non          |
| tube-gel                | ++                 | +                     | Sans     | Non          |

### c. L'étude de sérum et de plasma : problématique d'une large gamme dynamique

Le sérum ou le plasma sont les fluides biologiques les plus étudiés. Ils peuvent être obtenus rapidement, facilement et de manière non invasive ce qui en fait des échantillons de choix pour le diagnostic [29]. En spectrométrie de masse, l'étude de ces fluides est un défi dû à la large gamme dynamique des protéines sanguines dont les protéines majoritaires masquent les signaux des protéines présentes en plus faibles concentrations. C'est la raison pour laquelle de nombreuses études sont menées dans le but de contourner cette difficulté [30, 31]. La concentration protéique dans le sérum est de 6 à 8 g/dL et l'albumine en représente la majeure partie avec une concentration de 3,5 à 5 g/dL [32]. La déplétion de cette protéine représente un réel enjeu puisqu'elle permettrait de réduire considérablement la gamme dynamique des échantillons sanguins. Il existe de nombreuses solutions commerciales mais seulement une partie est présentée dans ce manuscrit.

Basée sur l'immunoaffinité, *Proteome Purify 2* permet de retenir l'albumine et les immunoglobulines G sur des billes dont la surface est fonctionnalisée avec des anticorps. Un autre système appelé *Blue Sepharose 6 Fast Flow* se base sur l'affinité de la poche hydrophobe de

l'albumine pour une molécule ajoutée sur la surface de billes de sépharose. Le lavage et le retrait de ces billes va permettre d'éluer les protéines non-affines (i.e. protéines d'intérêt) tout en éliminant l'albumine restée fixée sur les billes. D'autres solutions d'isolement de l'albumine utilisent son affinité chimique pour les solvants organiques comme l'éthanol [33].

Parmi les solutions commerciales, certaines permettent d'éliminer plusieurs protéines majoritaires simultanément. Ces méthodes fonctionnent par immunoaffinité avec des anticorps fixés à une matrice comme les colonnes *MARS* (déplétant 6-7 ou 14 protéines majoritaires), le système *ProteoPrep* (déplétant 20 protéines majoritaires) ou les colonnes *SepproIgY* (déplétant 14 protéines majoritaires). Ces différentes méthodes ont été comparées sur du sérum humain *via* la réalisation de gels 2D et ont démontré des bonnes efficacités de déplétion [34]. Cependant, les méthodes d'immunoaffinité se sont révélées peu sélectives puisqu'un certain nombre de protéines non-ciblées ont été identifiées dans la part déplétée.

Toutes les méthodes présentées ci-dessus ciblent un nombre restreint de protéines (6 à 20), et bien qu'efficaces elles ne permettent pas une élimination des protéines de concentrations intermédiaires qui couvrent les signaux des protéines minoritairement représentées. C'est la raison pour laquelle « l'ultradéplétion » a été récemment développée [35] et cela permettrait d'éliminer jusqu'à 100 espèces protéiques majoritaires. Brièvement, du sang humain est subdivisé en 7 fractions par chromatographie échangeuse d'ion. Chaque fraction est administrée à un poulet et les anticorps seront ensuite isolés dans les jaunes de ses œufs. Les anticorps (IgY) sont ajoutés sur une colonne grâce à laquelle un grand nombre de protéines sanguines humains pourra être déplété.

La plupart des techniques sont basées sur l'immunoaffinité et ont été développées sur des modèles d'étude « classiques » tels que l'homme ou la souris. Chez des espèces exotiques, le ou les épitopes (i.e. site(s) protéique(s) reconnu(s) par l'anticorps) ont pu être modifié(s) par l'évolution, ce qui rend la majorité de ces méthodes partiellement ou totalement inefficaces.

En parallèle des méthodes de déplétions sans immunoaffinité existent comme le système *ProteoMiner* [36]. La surface de billes est couverte d'hexapeptides qui fixent la même proportion de chaque espèce. Plus une espèce protéique est présente, plus elle se fixera sur la bille. Des lavages permettront d'éluer la partie non fixée et de conserver une quantité équivalente de chaque espèce protéique. De cette manière, la gamme dynamique est largement réduite.

### d. Digestion des protéines avec des enzymes protéolytiques

En stratégie « *bottom-up* », l'analyse par spectrométrie de masse est réalisée sur les peptides issus de la digestion enzymatique des protéines. L'enzyme protéolytique la plus courante est la trypsine. Il existe de nombreuses enzymes protéolytiques, mais la trypsine fonctionne dans des conditions facilement contrôlables puisqu'elle ne nécessite qu'une incubation à 37°C et digère de manière optimale à pH physiologique. La trypsine utilisée en laboratoire a été modifiée afin d'être plus efficace et être plus résistante à « l'auto-digestion » [37]. De plus, les sites de clivage sont très spécifiques et relativement abondants puisqu'elle ne coupe la séquence protéique qu'après une lysine ou une arginine, du côté C-terminal [38]. En moyenne, les peptides ont une longueur de 14 à 20 acides aminés [39] ce qui est parfaitement adapté pour une bonne efficacité d'ionisation. Classiquement, l'enzyme est directement ajoutée aux protéines en solution (dans le cas d'une digestion en solution) ou sur les pièces de gels

contenant les protéines (spots protéiques de gels 2D ou bandes protéiques de gels SDS PaGE). Habituellement le ratio trypsine : protéines est compris entre 1 :30 et 1 :100 [40]. D'autres enzymes protéolytiques peuvent être utilisées. Bien qu'elles n'aient pas montré des avantages aussi importants que ceux de la trypsine [41], l'utilisation combinée d'enzymes permet d'identifier un plus grand nombre de protéines [42].

Lors la digestion un excès d'enzyme protéolytique peut aboutir à une « auto-digestion » des enzymes. Dans ce cas, les signaux de ces peptides sont très intenses et peuvent empêcher la détection des signaux plus faibles de peptides provenant de l'échantillon. Afin d'éviter ce phénomène, des enzymes protéolytiques immobilisées sont utilisées depuis peu [43]. Les enzymes sont fixés à une matrice ce qui permet de réaliser une digestion et d'éluer les peptides de l'échantillon sans la présence de l'enzyme ou de ses peptides. Cependant, produire ces systèmes exige un important niveau d'expertise et il n'y a aucune assurance de reproductibilité. Une solution est disponible chez *MoBiTech GmbH* qui commercialise des CRC (*Compact Reaction Column*). Il s'agit de colonnes où la phase stationnaire est fonctionnalisée par des enzymes protéolytiques greffées. Bien que réutilisables et qu'il y ait un choix entre plusieurs enzymes, le coût de ces systèmes commerciaux est peu compatible avec une utilisation routinière en laboratoire.

### e. Etude de phosphoprotéomique : nécessité d'un enrichissement en phosphopeptides

La phosphoprotéomique est un sous-domaine de l'analyse protéomique et s'intéresse spécifiquement à l'une des modifications post-traductionnelles (PTM) majoritaires : la

phosphorylation. Historiquement, la première publication présentant la phosphorylation est une étude sur la structure de la vitelline en 1906 [44]. Désormais mieux caractérisée, la phosphorylation est définie comme l'ajout d'un groupement phosphate ( $\text{PO}^4$ ) sur la chaîne latérale polaire de certains résidus. La sérine (S), la thréonine (T) et la tyrosine (Y) sont les résidus majoritairement ciblés (*O*-phosphorylation). Au sein d'une cellule, le groupement phosphate est obtenu, *via* l'ATP (Adénosine TriPhosphate), et il se fixe sur le groupement OH de certains acides aminés par une liaison covalente de type ester. Les kinases sont les enzymes responsables de cette réaction [45]. A l'opposé, les phosphatases sont les enzymes permettant le « détachement » du groupement phosphate (Figure 2). La phosphorylation est une modification labile et son rôle dans les changements conformationnels et fonctionnels des protéines (*via* le passage d'un résidu hydrophobe apolaire en un résidu hydrophile polaire [46] permettent une régulation rapide des voies de signalisation. Ce mode de régulation est très rapide et est peu coûteux en énergie. En effet, la synthèse d'une protéine de 300 acides aminés revient à consommer 1200 molécules d'ATP, tandis que la régulation par ajout d'un groupement phosphate ne consomme qu'un seul ATP [47].

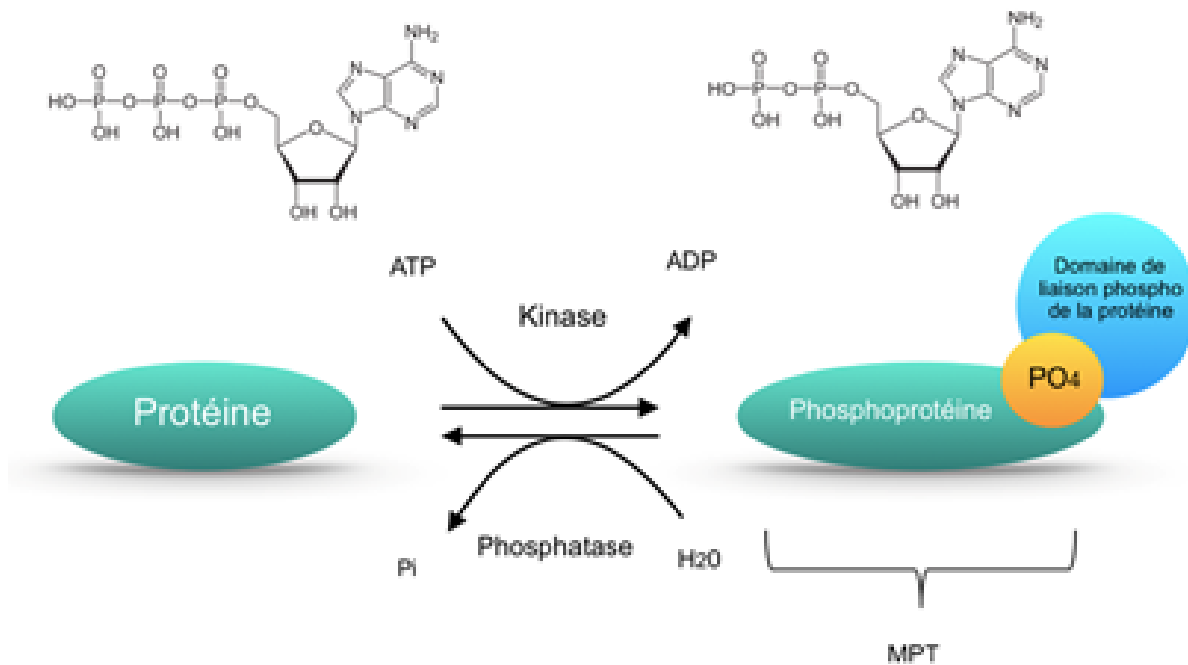


Figure 2 : Schématisation de l'ajout et de l'élimination d'un groupement phosphate sur une protéine par des enzymes spécialisés, kinases et phosphatases, respectivement. Le groupement phosphate est obtenu à partir d'une molécule d'ATP. L'ajout d'un groupement phosphate permettant à des protéines d'interagir. Illustration inspirée de Ardito et al., 2017 [45]

Dans une cellule eucaryote, il a été estimé que près de 30% à 50% des protéines soient phosphorylées au cours de leurs vies [48, 49]. Il existerait plus de 100.000 sites de phosphorylations sur le protéome humain [49]. Cependant l'ajout et l'élimination d'un groupement phosphate sont des mécanismes très dynamiques, de ce fait seulement 1% des protéines sont effectivement phosphorylées à un moment donné [50]. Les peptides portant des phosphorylations présentent des difficultés d'ionisation et leur proportion dans un mélange peptidique est faible. Ils sont donc difficilement analysables par spectrométrie de masse car difficilement détectables. C'est la raison pour laquelle une étape d'enrichissement en phosphopeptides, dont le principe est d'éliminer les peptides non-phosphorylés majoritaires, est nécessaire.

Il existe de nombreuses méthodes d'enrichissement en phosphopeptides [51] dont les plus représentées sont schématisées en Figure 3.

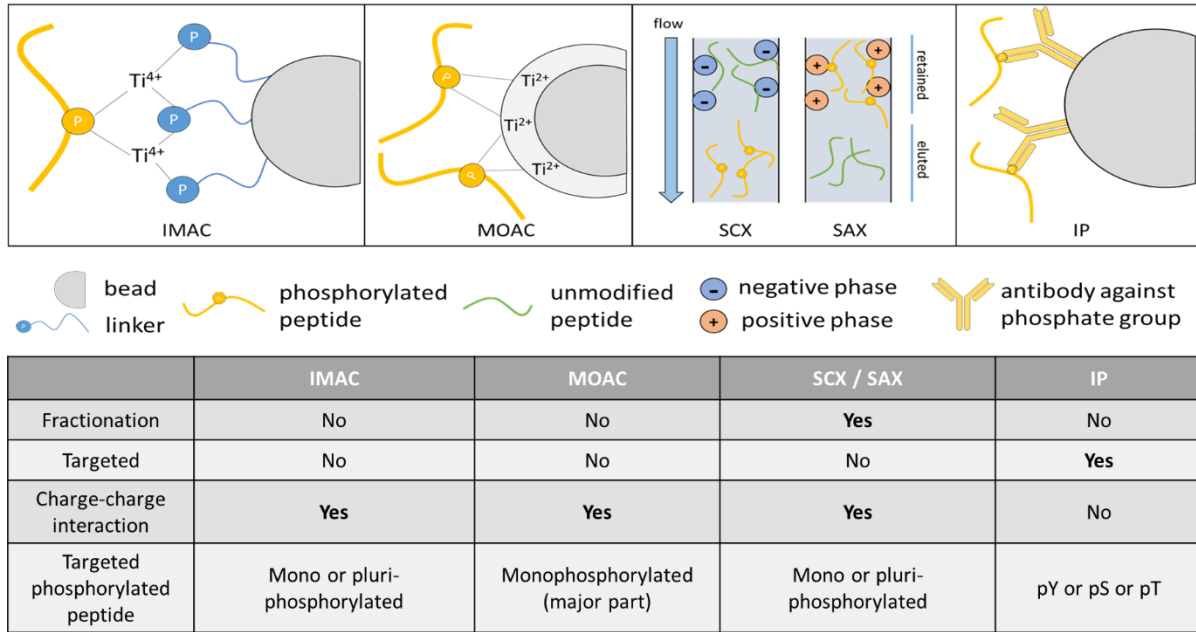


Figure 3 : Schématisation des méthodes d'enrichissement des phosphopeptides

Deux types de chromatographies liquides échangeuses d'ions peuvent être appliquées pour réaliser un enrichissement en phosphopeptides. Brièvement, la SCX (*Strong Cation Exchange*) consiste à utiliser une phase chargée négativement qui va interagir avec les analytes chargé positivement. Les phosphopeptides, qui ont tendance à être chargés négativement à cause des groupements phosphates, seront élués au début du gradient. De la même manière, la SAX (*Strong Anion Exchange*) consiste à utiliser une phase chargée positivement sur lesquels les analytes négativement chargés, comme les phosphopeptides, vont être retenus.

Les méthodes par chromatographies d'affinité, sans fractionnement, IMAC (*Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*) et MOAC (*Metal Oxide Affinity Chromatography*) sont les méthodes d'enrichissement les plus largement utilisées pour des études à grandes échelles. Ces

techniques fonctionnent avec l'affinité particulière du groupement phosphate pour les ions métalliques (IMAC) [52, 53] ou pour les oxydes métalliques (MOAC) [54] comme le titane [55] ou le fer [56]. Les peptides, *via* les phosphorylations, sont fixés à la phase stationnaire de la colonne ou à la surface des billes fonctionnalisées tandis que les peptides non-phosphorylés sont élués. Dans une seconde élution, l'ajout d'un tampon entrera en compétition avec l'interaction phosphopeptides-phase stationnaire et les phosphopeptides seront élués.

Il a été démontré que l'IMAC et le MOAC isolaient des phosphoprotéomes différents [57]. L'IMAC a la capacité de retenir des peptides portant plusieurs phosphorylations tandis que le MOAC cible majoritairement les peptides ne portant qu'une seule phosphorylation. De plus, l'IMAC est une méthode moins sélective puisqu'elle peut également interagir avec les acides aminés acides, et a une plus faible capacité de fixation comparée au MOAC [49].

Les techniques de chromatographies comme la SCX et la SAX (chromatographies échangeuses d'ions) sont généralement utilisées comme méthodes de préfractionnement avant une nouvelle étape d'enrichissement sur des systèmes de type MOAC ou IMAC. Dans le cas où un s'intéresse aux phosphorylations portées par un acide aminé précis (comme la tyrosine – Y), l'isolement des phosphopeptides est réalisé par immunoaffinité avec des anticorps spécifiques (i.e. immunoprécipitation). L'utilisation d'anticorps est particulièrement appliquée à l'étude des phosphotyrosines dont la proportion est particulièrement faible comparée à la proportion de phosphosérines, par exemple [58].



## 2. La chromatographie liquide : décomplexification peptidique en ligne

La chromatographie liquide est une méthode de décomplexification utilisant les propriétés physicochimiques des peptides à analyser. Ils vont interagir avec la phase stationnaire et grâce à une régulation de la composition de la phase mobile, ils sont élués progressivement. L'ajout d'un (1D-LC) ou de plusieurs (MDLC – *MultiDimensional Liquid Chromatography*) [59] chromatographies liquides, en amont d'un système ESI-MS/MS, permet d'augmenter la couverture du protéome en augmentant le nombre de peptides identifiés [60].

### a. La chromatographie en phase inverse

En protéomique, la chromatographie en phase inverse est la plus couramment utilisée. La phase stationnaire apolaire, constituée de silice greffée avec des chaînes d'atomes de carbones. Pour l'analyse par spectrométrie de masse, par stratégie *bottom-up*, des chaînes de 18 atomes de carbone (C18) sont généralement utilisés. La phase stationnaire retient les peptides selon leur hydrophobicité. La phase mobile utilisée est composée de deux solutions d'eau acidifiée et d'un solvant organique (classiquement l'acétonitrile) acidifié. Les proportions de ces deux solutions composant la phase mobile sont volontairement changées au cours du temps, est appelé le « gradient chromatographique ». En augmentant graduellement le taux d'acétonitrile, les peptides hydrophobes sont élués : les peptides les plus hydrophobes sont élués lorsque la proportion d'acétonitrile est la plus importante. La durée du gradient et la vitesse à laquelle le pourcentage d'acétonitrile acidifié est augmenté (pente) sont des caractéristiques majeures de la séparation des analytes (Figure 4). Des peptides élués avec un certain pourcentage d'acétonitrile sont plus ou moins éloignés en temps de rétention, selon la durée accordée pour augmenter le

pourcentage d'acétonitrile (i.e. la pente). Par ailleurs, la capacité chromatographique de séparation des peptides est améliorée en augmentant la longueur de la colonne séparative, en augmentant la pression ou en diminuant la taille des particules composant la phase stationnaire de la colonne séparative [61].

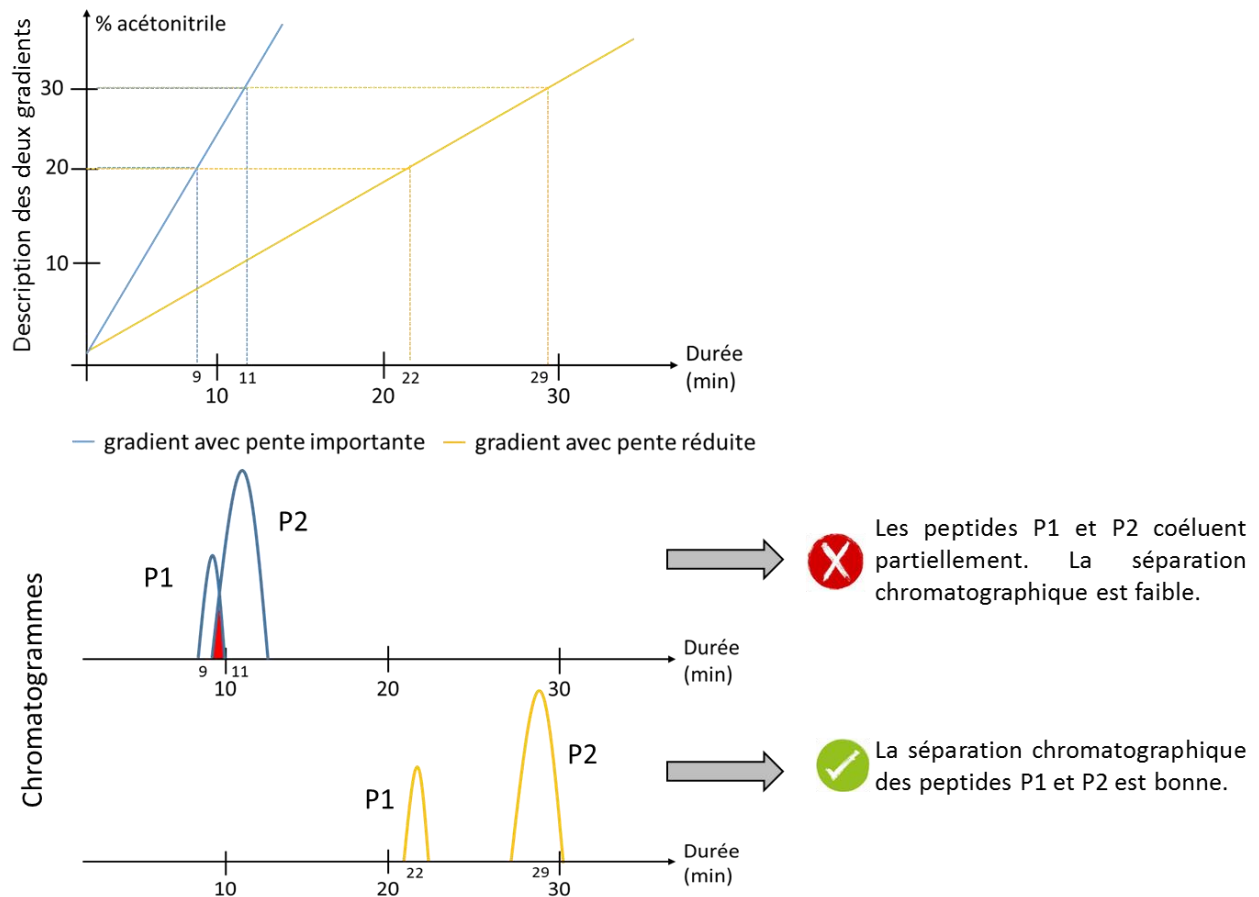


Figure 4 : Schématisation de la séparation de deux peptides (notés P1 et P2) selon l'utilisation de deux gradients chromatographiques de pente plus (bleu) ou moins (jaune) importante. Pour cet exemple le peptide P1 et le peptide P2 sont élués avec 20% et 30% d'acétonitrile, respectivement. Théoriquement, le gradient avec la pente la plus importante ne permet pas une bonne séparation chromatographique des deux peptides puisqu'il y a une co-élution partielle (triangle rouge). En revanche, avec un gradient de pente plus faible, les deux peptides sont parfaitement séparés chromatographiquement

En amont de la colonne séparative, il est courant d'associer une colonne de piégeage des peptides constituée de la même phase stationnaire que la colonne séparative. Elle permet de retenir les peptides, tandis que les contaminants diminuant l'efficacité d'ionisation sont éliminés (comme les sels ou les lipides).

### b. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique (*Size Exclusion Chromatography* - SEC) est généralement utilisée pour séparer des protéines [62] (approche « *top-down* »), et plus rarement pour séparer des peptides (approche « *bottom-up* »). Le pouvoir séparatif de ce système repose sur la capacité des analytes à évoluer au sein d'une phase stationnaire aréactive, constituée de particules sphériques poreuses. Les analytes avec les volumes hydrodynamiques les plus importants circulent entre les particules et sont élués en premier, tandis que les analytes avec des volumes hydrodynamiques moins importants traversent la colonne en circulant au travers des pores des billes ce qui retarde leur élution. Contrairement aux autres méthodes chromatographiques, la SEC est une méthode dont le pouvoir séparatif est indépendant d'une quelconque interaction entre la phase stationnaire et les analytes ce qui permet de travailler en condition native (i.e. condition n'entraînant pas la dénaturation des protéines).

## 3. L'instrumentation en spectrométrie de masse

En protéomique, le système chromatographique est couplé au spectromètre de masse. Les spectromètres de masse se composent de trois grandes parties : la source d'ionisation qui permet d'ioniser les peptides ; un ou plusieurs analyseurs permettant de séparer les ions et d'en déterminer leurs rapports  $m/z$  ; et le détecteur qui enregistre les signaux des ions. Dans le cadre

d'analyse MS/MS, une étape de fragmentation est réalisée dans une cellule de collision. Selon l'architecture du système, les applications divergent. Il a été choisi de présenter dans ce manuscrit les architectures les plus communes à une analyse par stratégie « *bottom-up* ».

### a. Les sources d'ionisation ESI et MALDI

Les peptides issus de la digestion protéolytique sont ionisés grâce à des sources d'ionisation. En protéomique, seules les sources de type MALDI et ESI sont utilisées puisqu'elles sont considérées comme des sources d'ionisation douces, c'est-à-dire n'engendrant pas de destruction des peptides. L'ionisation est caractérisée par une désolvatation des peptides et l'attribution d'une ou plusieurs charges (Figure 5).

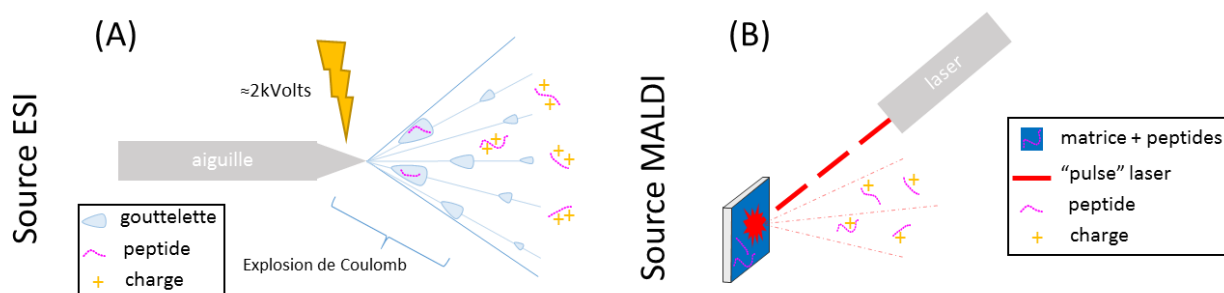


Figure 5 : Schématisation de l'ionisation des peptides en source ESI (A) et en source MALDI (B)

### Source d'ionisation MALDI

La source MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) [63] n'est pas couplée au système chromatographique. L'échantillon, dans une matrice acidifiée, est directement déposé sur une cible métallique qui va être frappée par des impulsions lasers produisant essentiellement des ions simplement chargés (Figure 5B). Ce type d'ionisation est directement applicable à des

tissus et permet donc de garder la localisation tissulaire des protéines identifiés : il s'agit de l'imagerie MALDI [64].

### Source d'ionisation ESI

La source ESI (*Electro Spray Ionization*) [65] est à l'interface entre le système de chromatographie et le spectromètre de masse. En sortie de la colonne séparative, un capillaire va conduire les peptides jusqu'à une aiguille métallique sur laquelle une haute tension (2 à 5kVolts) est appliquée. Cela va engendrer une explosion de Coulomb grâce à laquelle des gouttelettes chargées contenant les peptides vont être produites. Au fur et à mesure, le diamètre de ces gouttelettes va diminuer jusqu'à ce qu'il ne reste que les peptides polychargés (Figure 5A).

### b. Les analyseurs

Les ions néoformés sont filtrés par des systèmes de focalisation composés de séries de lentilles ou de multipôles et dirigés vers l'analyseur. L'analyseur a pour rôle de déterminer le rapport masse sur charge des ions ( $m/z$ ) et en protéomique il s'agit principalement d'un quadripôle (Q), d'un temps de vol (TOF), d'une trappe ionique (IT), d'un analyseur à transformée de Fourier (FT-ICR) ou d'une trappe orbitale (Orbitrap).

Les analyseurs sont définis selon quatre grandes caractéristiques :

- ✓ La gamme de masse : c'est l'intervalle entre le rapport  $m/z$  le plus petit et le rapport  $m/z$  le plus grand dans lequel l'analyseur peut détecter les ions.
- ✓ La résolution : elle détermine la capacité de l'analyseur à différencier deux ions aux rapports  $m/z$  proches.

- ✓ La sensibilité : elle correspond à la plus petite quantité qui est analysable. Sachant que la plupart des analyses protéomiques sont réalisés sur des échantillons dont la gamme dynamique est de plusieurs ordres de magnitude, une bonne sensibilité est indispensable.
- ✓ La précision de masse : elle est définie comme l'erreur faite sur la mesure du rapport  $m/z$ . Plus la précision de masse sera élevée, plus il sera possible de différencier des espèces protéiques de séquences proches (comme les isoformes). Ce dernier critère est à connaître car il est utilisé pour l'identification des peptides.

Pour l'étape d'identification des peptides, la masse obtenue par l'analyseur est utilisée. Cette information est extraite du rapport  $m/z$  après avoir déterminé la charge de l'ion ( $z$ ). Lors de l'analyse, pour chaque ion, un massif isotopique est obtenu. Il représente les pics des différentes formes de l'ion selon l'incorporation de différents isotopes dans la séquence peptidique. Le pic monoisotopique représente la forme de l'ion sans aucune incorporation d'isotopes lourds. Grâce à l'interprétation du massif isotopique, il est possible de déterminer le nombre de charges présentes sur le peptide. Sachant que la différence de masse entre les pics du massif est de 1Da, si l'ion ne porte qu'une charge, la différence de masse entre les pics est de 1. En revanche, s'il y a 2 charges sur le peptide, les pics seront séparés par une différence de 0,5  $m/z$  ( $\Delta m = 1$  ;  $z = 2$ ) (Figure 6). Cette interprétation d'un profil isotopique est appelée une déconvolution et plus un analyseur est résolutif, plus il sera possible de définir avec précision le massif isotopique.

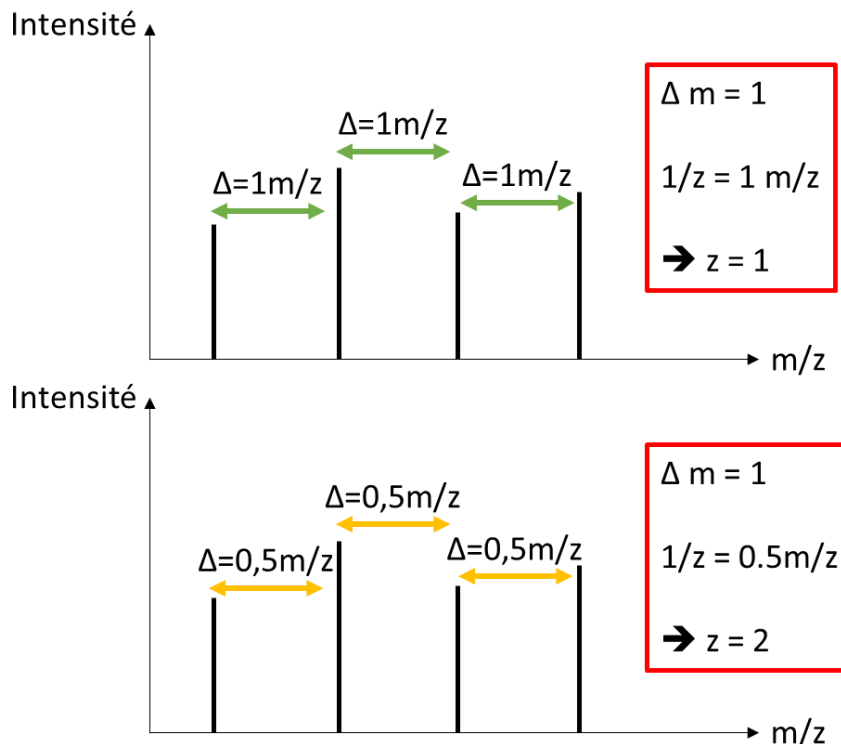


Figure 6 : Schématisation de deux massifs isotopiques pour lesquels le nombre de charge a été déterminé. La différence de rapport  $m/z$  ( $\Delta m/z$ ) entre les pics du massif isotopique est de 1 et de 0.5, dans le panel du haut et le panel du bas, respectivement. Sachant que la différence de masse ( $m$ ) entre les pics est égal à 1 et que cette différence de masse divisée par le nombre de charge ( $z$ ) donne le  $\Delta m/z$ , il a été déterminé que le nombre de charge était de 1 et 2, respectivement.

Dans les travaux de ce manuscrit, seuls les analyseurs de type quadripôle, temps de vol et trappe orbitale sont utilisés et sont décrits ici.

### Quadripôle (Q)

Le quadripôle, ou quadrupôle, se compose de quatre électrodes cylindriques connectées deux à deux. Un potentiel électrique est appliqué de telle sorte que deux électrodes adjacentes aient des potentiels opposés. Le champ électrique au sein du quadripôle induit l'accélération et l'oscillation des ions autour de l'axe central dont l'amplitude corrèle avec leurs masses et à leurs charges. Les ions résonnants ont une vitesse plus élevée et maintiennent une trajectoire peu

oscillante ce qui leur permet de traverser l'analyseur [66]. En revanche, les ions non-résonnants, dont la vitesse est plus faible, sortiront de la trajectoire centrale pour impacter les électrodes (Figure 7).

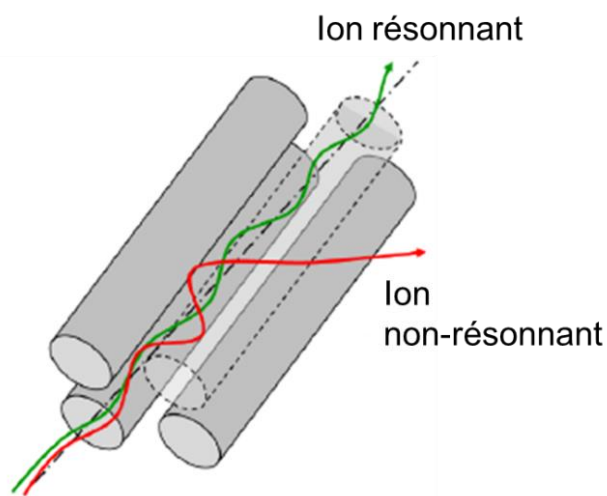


Figure 7 : Schématisation du trajet d'un ion résonnant (vert) et d'un ion non-résonnant (rouge) au sein d'un quadripôle.

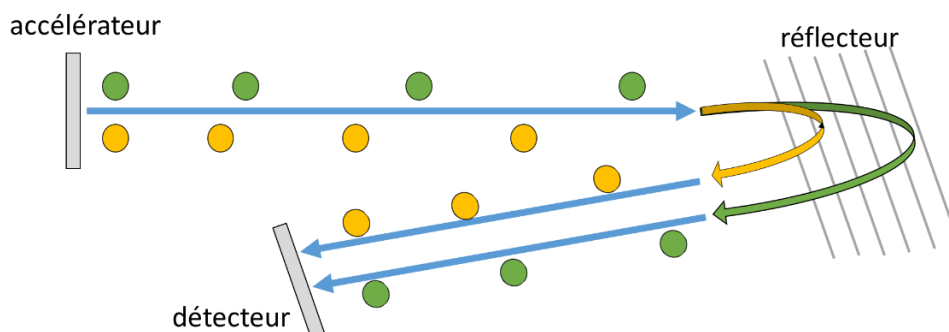
### Temps de vol (Time-Of-Flight - TOF)

Ce type d'analyseur est composé d'un tube de vol, soumis à un vide poussé de l'ordre de  $10^{-7}$  mbar, à l'entrée duquel les ions sont accélérés sous l'effet d'une impulsion électrique [67]. Par la suite, ils parcourent le tube de vol grâce à l'énergie cinétique acquise et sont séparés selon leurs masses. En effet, les ions avec un rapport  $m/z$  faible traversent le tube rapidement, contrairement aux ions avec des rapports  $m/z$  plus grands. Le rapport  $m/z$  d'un ion est déterminé à partir de la durée qu'il a mis pour traverser le tube de vol.

Des ions de même rapport  $m/z$  peuvent avoir des énergies cinétiques différentes ce qui entraîne leur séparation pendant la traversée du tube de vol. La résolution de l'analyseur est alors



diminuée. Pour y faire face, il est désormais courant de placer un réflecteur à la fin du tube de vol [68]. Il s'agit d'une série de lentilles au sein de laquelle les ions les plus rapides entrent plus profondément que les ions avec une énergie cinétique plus faible. De cette manière, les ions d'un même rapport  $m/z$  quittent le réflecteur en même temps et ont donc la même durée de vol (Figure 8).



*Figure 8 : Représentation de l'utilisation d'un réflecteur pour des ions de même rapport  $m/z$  mais avec une énergie cinétique élevée (vert) ou faible (jaune).*

### Trappe Orbitale

La trappe orbitale [69, 70] (commercialisée sous le nom Orbitrap™ par la société Thermo Fisher Scientific) est composée d'une électrode centrale en fuseau et de deux électrodes externes sur lesquelles est appliqué un champ électrique (Figure 9). Les ions sont introduits tangentiellement à l'électrode centrale après avoir été accumulés dans une trappe linéaire (C-trap). Le champ électrique induit une oscillation harmonique des ions avec un mouvement linéaire suivant l'électrode centrale [71], ainsi qu'une rotation autour de celle-ci. Grâce à la transformée de Fourier, le mouvement oscillatoire axial est interprété en fréquence d'oscillation axiale des ions qui définit le rapport  $m/z$  des ions analysés.

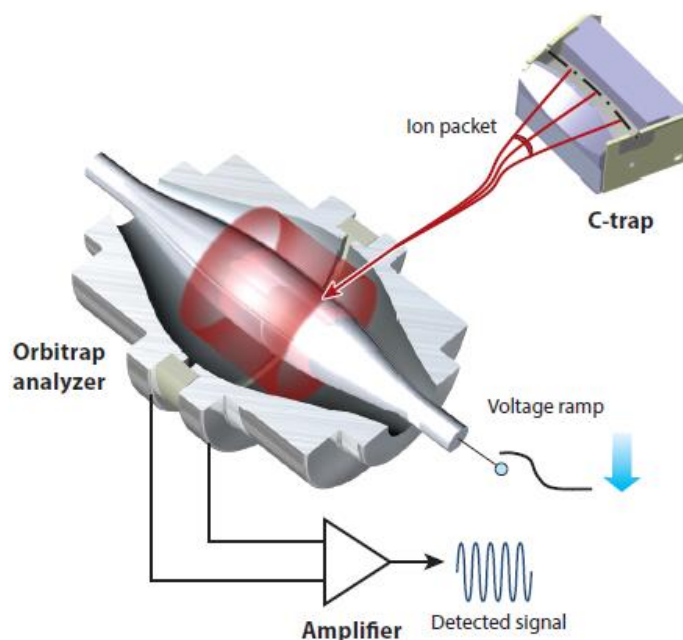


Figure 9 : Représentation de la détection des signaux ioniques au sein d'une trappe orbitale après accumulation des ions dans une C-trap. [72]

### Les instruments hybrides

Les instruments hybrides sont constitués de plusieurs analyseurs permettant de combiner les propriétés de chacun et de fragmenter les peptides pour les analyses en mode MS/MS. Dans un premier temps, en mode MS, l'analyseur a pour rôle de focaliser les ions intacts jusqu'au second analyseur. Dans un second temps, en mode MS/MS, le premier analyseur sélectionne une partie des ions et les focalisent jusqu'au second analyseur où ils seront fragmentés. Il est courant que le premier analyseur soit un quadripôle, couplé à un TOF (Q-TOF), à une trappe orbitale (Q-Orbitrap™) ou à deux autres quadripôles (QQQ).

Les spectromètres de masse de type Q-TOF sont répandus en protéomique à haut débit [73]. Ils ont l'avantage d'être très résolutif (jusqu'à 60.000 de résolution), d'avoir une grande

vitesse de balayage (de 25Hz, soit 25 spectres par seconde) et d'avoir une précision de masse inférieur à 5 ppm.

Les spectromètres de masse de type Q-Orbitrap™ sont également très répandus. Grâce à la C-Trap, les ions sont regroupés avant d'être analysés par l'Orbitrap™. Ainsi la résolution atteinte est de 140.000 à 200 m/z. Par ailleurs, la précision de masse (< 5 ppm), la sensibilité et la large gamme dynamique analysable (plus de 4 ordres de grandeur) en font un instrument de choix pour les analyses quantitatives à haut débit.

Les instruments de type triple-quadripôles sont principalement utilisés pour des analyses ciblées quantitatives en mode SRM (*Selected Reaction Monitoring*). Brièvement, le premier quadripôle permet la sélection d'un ion parent (ou précurseur) qui sera ensuite fragmenté dans le second quadripôle. Le troisième quadripôle permettra la sélection d'un ion fragment qui sera alors envoyé dans le détecteur. La stratégie SRM est développée plus en détail en page 101.

### c. Les détecteurs

Le détecteur enregistre les signaux des ions et les transforme en des signaux électriques qui vont être amplifiés et digitalisés en valeur numérique par un système électronique. Deux modes de fonctionnement sont majoritairement représentés en protéomique :

- ✓ Détection par courant induit : les ions produisent un signal interprétable par la transformée de Fourier, sans être dégradés. Il s'agit du principe de fonctionnement d'une trappe orbitale (voir page 28).

- ✓ Détection par multiplicateur d'électron : fonctionnant sur le même principe, il peut s'agir d'un channeltron [74] ou d'un électromultiplicateur à dynodes discrètes [75]. Les ions percutent une surface semi-conductrice libérant des électrons. Ces derniers percutent eux-mêmes une nouvelle surface ce qui produit des électrons secondaires, et ainsi de suite. De cette manière, le signal est amplifié et un signal électrique est produit. Plus le signal électrique est important, plus le peptide analysé a un signal intense. Ils sont utilisés sur les spectromètres de masse de type Q-TOF ou QQQ.

### d. Les modes de fragmentation

Pour une analyse par spectrométrie de masse en mode MS/MS, les ions appelés « précurseurs » sont fragmentés pour produire des ions « fragments ». Ces derniers vont fournir une nouvelle information qui permettra d'avoir une identification plus robuste. Il existe différents modes de fragmentation chacun produisant des ions fragments spécifiques déterminés selon la nomenclature de Biemann (Figure 10). Les ions de types a, b et c contiennent la partie N-terminale ; et les ions x, y et z contiennent la partie C-terminale.

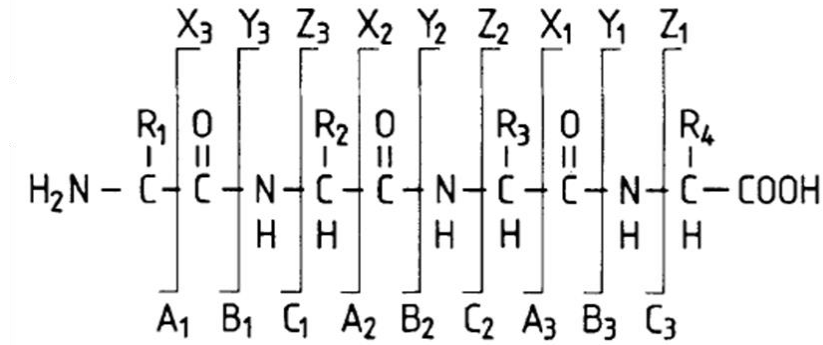


Figure 10 : Nomenclature de Biemann déterminant le type de fragments obtenus [76]

### Collision Induced Dissociation (CID)

Ce mode de fragmentation est le plus répandu en protéomique car il est le plus adapté à la fragmentation de peptides tryptiques. Les ions précurseurs sont amenés jusqu'à une cellule de collision au sein de laquelle se trouve un gaz inerte comme l'azote, l'argon ou l'hélium. Une fois accélérés, les ions précurseurs entrent en collision avec les molécules de gaz entraînant la délocalisation d'un proton [77]. Pour les peptides tryptiques, ces électrons sont situés en position N-terminale. En suivant la théorie du proton mobile, les mouvements de ces électrons entraînent la rupture de liaisons amides. Les ions produits sont de types b ou y. Les peptides monochargés sont difficilement fragmentés car l'énergie cinétique, apportée par l'accélération des ions, est trop faible pour induire un déplacement du proton le long du squelette peptidique.

### Higher energy Collisional Dissociation (HCD)

Ce terme est utilisé par la société Thermo Fisher Scientific et il décrit un mode de fragmentation similaire à la fragmentation par CID. En réalité, les ions sont fortement accélérés en mode HCD ce qui induit une fragmentation des ions qui entrent en collision avec les molécules

du gaz inerte. L'énergie interne est fournie par un nombre de collision réduit, comparé à la fragmentation en mode CID, ce qui permet de conserver les marquages isotopiques ou les modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation [78].

### Electron Capture Dissociation (ECD)

Au sein de la cellule de collision, des électrons sont émis et capturés par les ions précurseurs ce qui induit la fragmentation sans redistribution des charges portées par les ions [79]. Autrement dit, il n'y a pas de redistribution de l'énergie vibrationnelle intramoléculaire. Ce mode de fragmentation est indépendant de la séquence de l'ion et il préserve davantage les modifications post-traductionnelles (comme la phosphorylation) puisque la fragmentation se fait sur le squelette peptidique, contrairement mode CID où la fragmentation peut atteindre les chaînes latérales des acides aminés. Les ions fragments produits sont de types z et c.

### Electron Transfer Dissociation (ETD)

Cette méthode se rapproche de la méthode ECD. Les ions entrent dans une cellule de collision au sein de laquelle des électrons sont capturés par les ions précurseurs [80]. Les électrons proviennent d'anions présentant de faibles affinités pour leurs électrons. Ensuite, la fragmentation se déroule de la même manière que par ECD. Les ions fragments obtenus sont de types z et c.

### Comparaison des méthodes de fragmentation

Dans le tableau suivant les 3 méthodes de fragmentation ci-dessus sont comparés (Table 2):

Table 2 :Tableau comparatif des modes de fragmentation

|                                      | CID | HCD | ECD | ETD |
|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| nombre de charges répondant le mieux | 2   | 2   | >2  | >2  |
| conservation des PTM                 | non | oui | oui | oui |
| types d'ions produits                | b/y | b/y | z/c | z/c |

Une digestion enzymatique des protéines avec la trypsine produit des peptides dont la taille permet, en moyenne, la fixation de 2 charges. De ce fait, le mode CID ou le mode HCD sont les plus adaptés pour la fragmentation de ces derniers, alors que les modes ECD et ETD sont plus avantageux pour la fragmentation de peptides portant au moins 3 charges.

Dans le cas de phosphopeptides, le nombre de charges positive par peptide est réduit. Or, en spectrométrie de masse, les analyses sont globalement réalisées en mode positif. Cela signifie que les espèces peptidiques filtrées et amenées jusqu'à l'analyseur sont positivement chargés. Dans le cas de phosphopeptides, les groupements phosphates apportent des charges négatives aux peptides. De ce fait, le nombre de charges positives portées par un phosphopeptide est moins important, comparé au nombre porté par le même peptide sans phosphorylation. Il est possible d'augmenter le nombre de charges par peptide en ajoutant des réactifs *supercharging* (comme le m-NBA) [81] dans les solvants chromatographiques permettant une meilleure détection des phosphopeptides. Cette méthode a déjà été éprouvée dans le cas d'une étude de phosphoprotéomique avec une fragmentation en mode ETD [82].

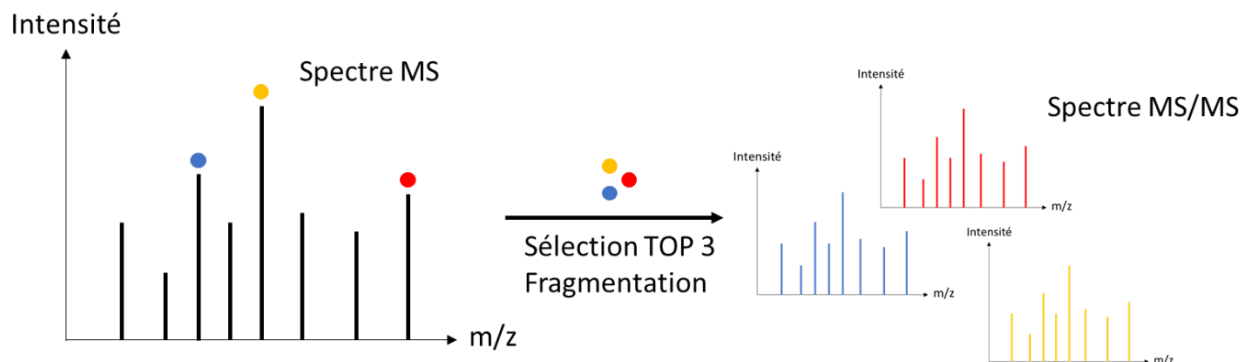
### e. Les modes d'acquisition

Il existe différents modes d'acquisition qui sont choisis selon la stratégie sélectionnée pour répondre à la question biologique.

## Analyse protéomique non-ciblée

### i. *Data Dependent Acquisition (DDA)*

Après analyse en mode MS des ions, un certain nombre de précurseurs sont sélectionnés. Les N plus intenses (aussi appelés « TOP N ») du spectre MS sont isolés pour être fragmentés pour une analyse en mode MS/MS (Figure 11). Cette méthode est appelée « acquisition dépendante des données », puisque le choix des ions pour l'analyse MS/MS dépend des données acquises en mode MS.



*Figure 11 : Schématisation d'une acquisition réalisée en mode DDA sur un TOP 3. Les 3 ions les plus intenses détectés en MS sont sélectionnés, séquentiellement isolés puis fragmentés. Pour chaque peptide, un spectre MS/MS est acquis pour l'ensemble des fragments obtenus à partir du peptide sélectionné.*

Afin de s'assurer que les ions précurseurs sélectionnés ne soient pas toujours les mêmes, il est possible de paramétrer un temps d'exclusion dynamique selon lequel un ion déjà sélectionné ne le sera plus durant une durée déterminée. De cette manière, les précurseurs moins intenses qui co-éluent pourront être analysés à leur tour. La complexité élevée de l'échantillon ainsi que les co-élutions empêchent une fragmentation de tous les ions avec le mode DDA. Afin d'augmenter le nombre d'ions sélectionnés pour une analyse en mode MS/MS il est courant



d'ajouter une étape de décomplexification ou de fractionnement de l'échantillon lors de la préparation de l'échantillon.

ii. *Data Independent Acquisition (DIA)*

Ce mode d'acquisition a été développé en 2004 pour contourner la limitation de l'utilisation du mode DDA [83]. Il n'y a pas de sélection des précurseurs, la fragmentation est réalisée sur l'ensemble des ions inclus dans une fenêtre de masse définie.

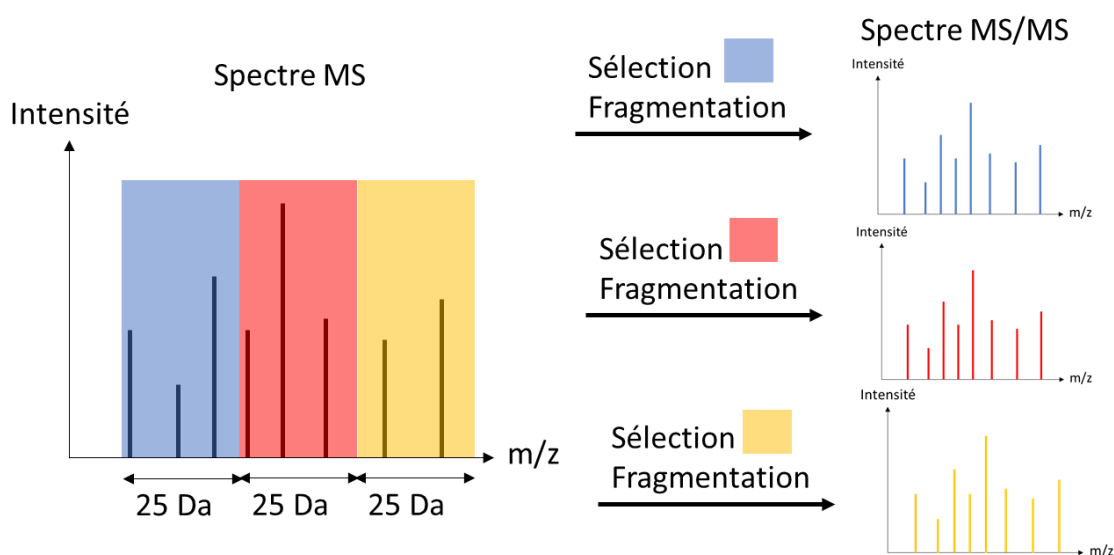


Figure 12 : Schématisation d'une acquisition réalisée en mode DIA avec une fenêtre d'isolation de 25 Da. Les ions précurseurs détectés dans chacune des fenêtres d'isolation sont séquentiellement isolés puis fragmentés. Pour chaque fenêtre d'isolation, un spectre MS/MS est acquis pour l'ensemble des fragments obtenus.

Ce type d'analyse est généralement combinée avec une analyse en mode DDA réalisée auparavant. Elle permet de construire une librairie spectrale qui servira à l'identification des peptides. La publication de ces librairies spectrales sur des banques de données spécialisées permet, dans certains cas, de se passer d'une analyse en mode DDA. Bien que prometteur pour les approches quantitatives, l'interprétation des données en mode DIA est encore problématique.

En effet, comme tous les ions précurseurs sont fragmentés simultanément, l'attribution des signaux des ions fragments est difficile et nécessite une validation rigoureuse des données.

Dans ce manuscrit, l'ensemble des données ont été acquises en mode DDA.

### En analyse protéomique ciblée

#### i. *Single Reaction Monitoring (SRM)*

Ce mode d'acquisition est appelé SRM [84] (*Single Reaction Monitoring*) ou MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) utilisé sur des spectromètres de masse hybrides de type triple quadripôle (QQQ). Ce mode permet d'analyser des transitions ion précurseur – ion fragment dans une approche quantitative ciblée (Figure 13). Les ions précurseurs et les ions fragments sont choisis avant l'analyse. Le premier quadripôle va permettre d'isoler un ion précurseur avant de le focaliser vers le second quadripôle où la fragmentation a lieu. Arrivés dans le troisième quadripôle, un des ions fragments est focalisé jusqu'au détecteur. Généralement, 3 à 5 peptides protéotypiques (i.e. dont la séquence est unique à la protéine ciblée) sont choisis pour chaque protéine ciblée et entre 3 et 6 transitions sont ciblées pour chaque peptide.

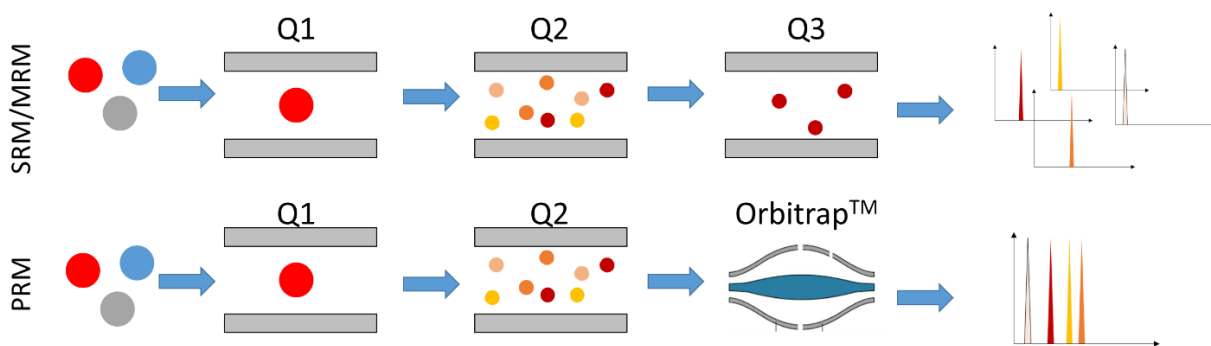


Figure 13 : Schématisation des modes d'acquisition SRM/MRM (panel du haut) et PRM (panel du bas). L'acquisition en mode SRM/MRM réalisée sur des spectromètres de masse de type QQQ : les fragments obtenus à partir d'un peptide sélectionné sont séquentiellement analysés en MS/MS. Une acquisition en

*mode PRM réalisée sur des spectromètres de masse de type Q-Orbitrap<sup>TM</sup> : les fragments obtenus à partir d'un peptide sélectionné sont simultanément analysés en MS/MS.*

ii. *Parallel Reaction Monitoring (PRM)*

Contrairement à la méthode SRM, la méthode PRM permet la détection simultanée de fragments inclus dans une même fenêtre  $m/z$ . Cette méthode est réalisée sur un spectromètre de masse dont le troisième analyseur est un TOF ou une trappe orbitale [85] (Figure 13). L'intérêt de la PRM, par rapport à la SRM, est que le nombre de transitions suivies par peptides n'est pas limité. Ainsi la quantification est réalisée sur un plus grand nombre de transition, la rendant plus spécifique et plus robuste. En contrepartie, la méthode est moins sensible du fait que l'ensemble des fragments sont analysés simultanément, contrairement à l'acquisition en mode SRM.

## Chapitre 2 - Identification, quantification et interprétation biologique

## Chapitre 2 - Identification, quantification et interprétation biologique

### 1. Stratégies d'identification chez les espèces séquencées

#### a. Identification par empreinte de fragments peptidiques

Lors d'une analyse MS/MS, les informations obtenues sont des spectres MS (pour les ions précurseurs) et des spectres MS/MS (pour les ions fragments), représentant les intensités des signaux en fonction de la gamme de masse ( $m/z$ ) de l'analyseur. L'interprétation des rapports  $m/z$  permet de déduire les masses des ions. Ces données de masse expérimentales sont ensuite comparées à des données théoriques provenant de la digestion *in silico* d'une banque de données de séquences protéiques [86]. Plus un peptide est identifié avec un grand nombre de fragments, plus l'identification est considérée robuste. Cette stratégie est appelée « identification par empreinte de fragments peptidiques ». La digestion *in silico* de la banque de données, ainsi que la comparaison des données, sont réalisées par un algorithme de recherche comme Mascot [87] ou Andromeda [88] (intégré à MaxQuant). L'algorithme tient compte de l'enzyme utilisée pour la digestion des protéines, de la précision de masse de l'analyseur et du mode de fragmentation (pour prédire le type d'ions fragments obtenus). Par la suite, la correspondance entre les masses des données théoriques et expérimentales est réalisée (Figure 14).

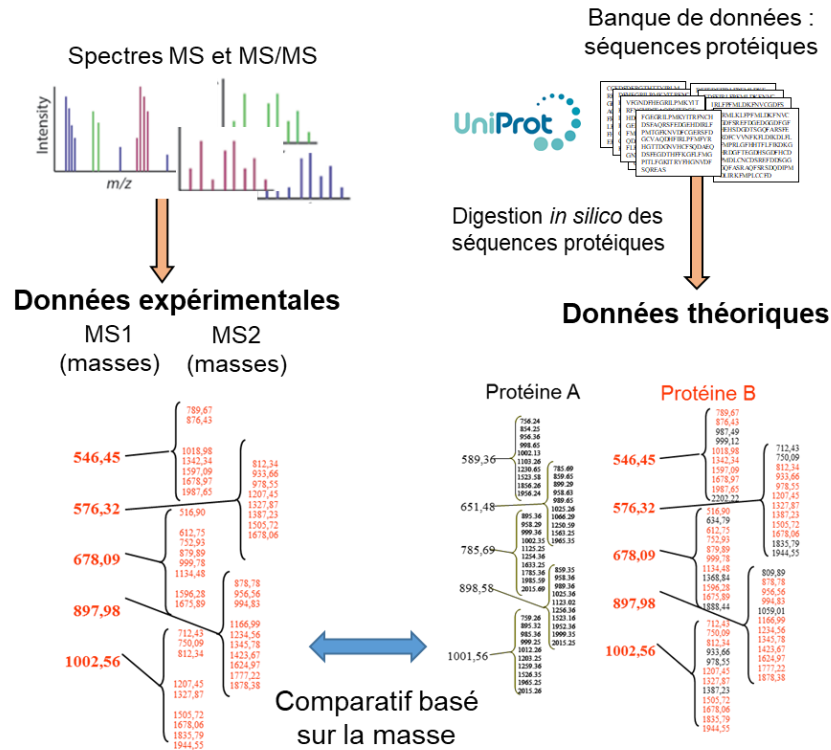


Figure 14 : Schématisation du processus d'identification par comparaison des masses mesurées sur les spectres MS et MS/MS, avec les masses théoriques obtenues par digestion in silico de la banque de données de séquences protéiques.

Au cours de la recherche de correspondance, il est possible de tenir compte d'éventuelles modifications sur les peptides (PTM ou modifications induites par la préparation d'échantillons). En tenant compte de ces éventuelles modifications, de nouvelles masses sont calculées pour chaque peptide, issu de la digestion *in silico*. Lorsqu'une correspondance entre la masse théorique d'une séquence peptide et un spectre expérimental (PSM – *Peptide Spectrum Match*) est établie, un score est attribué. Il reflète la probabilité P que l'attribution soit due au hasard. Avec Mascot, le score est égal à  $-10 \cdot \log(P)$ , ainsi, plus le score est élevé, plus l'assignation est robuste.

Dans le cas de PTM, comme la phosphorylation, un score supplémentaire (appelé *PTM Score*) représente la probabilité de bonne localisation de la modification par le résidu auquel elle

a été assignée. Ce score a une valeur entre 0 et 1 : plus il est proche de 1, plus la probabilité que la PTM se trouve sur le résidu sélectionné est grande [89]. Classiquement, la validation des sites modifiés se fait avec un *PTM Score* supérieur ou égal à 0,75 (soit au moins 75% de probabilité de la bonne localisation de la PTM).

### b. Choix de la banque de données protéiques

Le choix de la banque de données protéiques est l'un des points critiques du processus d'identification des protéines. Elles sont construites à partir de bases de données génomiques.

La banque de données *UniProt* regroupe deux banques différentes :

- ✓ *Swiss-Prot* [90] est une banque de données protéiques, utilisée largement comme banque de référence pour les études de protéomiques. L'ensemble des annotations protéiques qui y figurent sont revues et validées manuellement.
- ✓ *TrEMBL* [90] est une banque de données protéiques où les annotations sont faites automatiquement et sans aucune validation.

Il existe également la banque de données protéiques NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) [91]. Cette dernière est moins plébiscitée car un certain nombre d'entrées protéiques sont redondantes. Les annotations protéiques sont issues de transferts d'informations de plusieurs autres banques de données protéiques (*Swiss-Prot*, *RefSeq*...).

*RefSeq (Reference Sequence)* [92] est une banque de données protéiques et nucléotidiques, plus rarement utilisée. Les données protéiques sont issues de l'interprétation des données génomiques. Cependant, il existe une forte redondance au niveau protéique et cela en dépit des

différents tests qualités. Une partie des données protéiques sont curées manuellement (entrées avec le préfixe NP) tandis que d'autres sont issues de prédictions automatiques (entrées avec le préfixe XP).

### c. Validation des identifications

Afin de valider les identifications protéiques, il est possible de s'appuyer sur le score donné par l'algorithme de recherche mais également d'utiliser une méthode évaluant le taux de faux-positifs (FDR – *False Discovery Rate*) appelée méthode *target-decoy*. Pour ce calcul, il est nécessaire d'intégrer des séquences leurres (appelées « *decoys* ») dans la banque originale (« *targets* »). Ces séquences sont construites à partir des séquences *targets* de la banque de données selon différentes manières [93] (Figure 15) :

- ✓ Méthode « *reverse* » : la séquence en acides aminés du peptide est inversée. Cette méthode présente l'avantage d'être facilement reproductible et de conserver la masse entre la séquence *target* et *decoy*.
- ✓ Méthode « *shuffled* » : les acides aminés de la séquence sont aléatoirement repositionnés dans la séquence peptidique. L'inconvénient c'est que cela peut aboutir à une séquence identique à celle d'un peptide provenant d'une protéine *target*.
- ✓ Méthode « *randomized* » : une nouvelle séquence est construite en gardant les proportions d'acides aminés présente dans la banque de données protéiques des séquences *targets*.



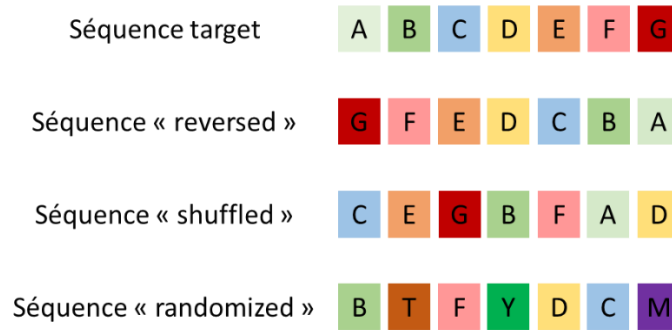


Figure 15 : Schématisation des différentes méthodes de production de séquences decoys à partir d'une même séquence peptidique issue de la banque de données (« target »).

Il n'existe pas de méthode universelle pour produire les séquences *decoy*, cependant certains critères comme une même distribution en acides aminés et des longueurs identiques, entre séquences *decoy* et séquences *target*, sont fortement recommandées. Par ailleurs, il est conseillé d'avoir des nombres de séquences *decoy* et *target* équivalents.

Dans ce manuscrit, les séquences *decoys* sont produites par la méthode « *reversed* ».

Les entrées *decoy* identifiées représentent la proportion d'assignations aléatoires (i.e. faux-positifs) présentes dans l'ensemble des identifications peptidiques. Le taux de ces « fausses » identifications (FDR) est calculé comme suit :

$$FDR (\%) = \frac{\text{Nombre de decoy}}{(\text{Nombre de target} + \text{nombre de decoy})} * 100$$

Les identifications peptidiques et protéiques, sont classées grâce à leurs scores, puis filtrées jusqu'à l'obtention d'un FDR inférieur au seuil d'acceptation fixé (généralement 1%). Il est généralement appliqué au niveau peptidique et au niveau protéique. Cette étape est réalisée par différents logiciels comme *Proline*, *Scaffold* ou *Andromeda*.

## 2. Stratégies d'identifications chez les espèces non séquencées

### a. L'empreinte de fragments peptidiques

Les espèces non-séquencées représentent une difficulté à étudier car les banques de données comptent peu de séquences protéiques. Cependant, il est possible de réaliser des identifications par empreinte de fragments peptidiques en utilisant une banque de données protéiques à partir de séquences protéiques d'une ou de plusieurs espèces. Ainsi, les peptides identifiés seront ceux dont la séquence est strictement conservée entre les espèces et pourront servir à l'identification des protéines de l'espèce non-séquencée étudiée. Cette approche peut être combinée à une stratégie par séquençage *De Novo*.

### b. Séquençage *De Novo*

Cette stratégie utilise les informations des spectres de fragmentation (spectre MS/MS) qui permettent de reconstituer une partie de la séquence du peptide analysé (« *tag* ») [94]. Lors de la fragmentation de l'ion précurseur, plusieurs fragments différents sont obtenus et détectés par le spectromètre de masse. La différence de masse entre deux pics monoisotopiques consécutifs correspond à la masse d'un acide aminé, ce qui permet de reconstituer la séquence du peptide (Figure 16).

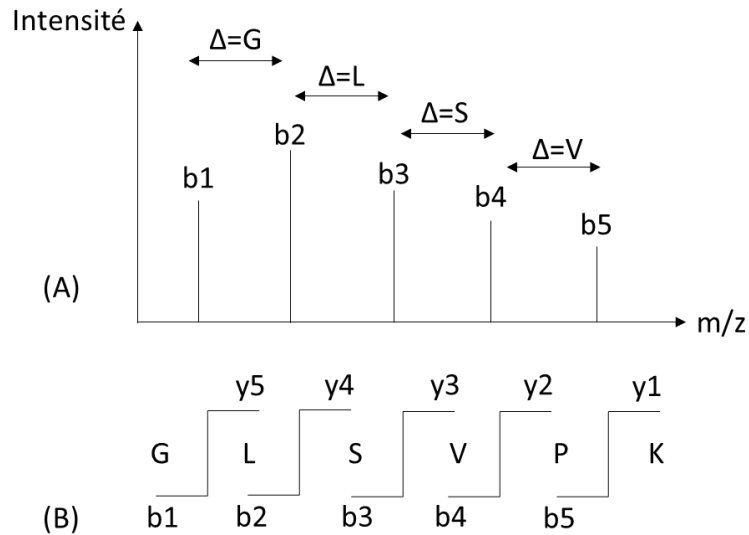


Figure 16 : Schématisation du spectre MS/MS obtenu pour les fragments issus du peptide GLSVPK (A) et nomenclature de fragmentation de Biemann appliquée à ce peptide (B).

Cette méthode nécessite des spectres MS/MS de bonne qualité, c'est-à-dire aillant suffisamment de pics de fragmentation et dont le rapport signal/bruit est important. Le logiciel *Recover* permet de ne conserver que les spectres répondant à ces exigences [95]. Il permet de filtrer les spectres selon le nombre de pics utiles (UPN – *Useful Peak Number*), ce qui correspond au nombre de pics dépassant un seuil d'intensité (E). Ce seuil est un multiple de l'intensité du bruit de fond qui correspond à la médiane des intensités de tous les pics du spectre MS/MS. Il est également possible d'éliminer les spectres déjà assignés par la recherche classique, ce qui permet de limiter l'espace de recherche.

Etant donné la complexité des spectres, plusieurs séquences *tags* peuvent correspondre à un même spectre MS/MS. Le logiciel *PepNovo* [96] permet, *via* des scores, de filtrer les résultats obtenus afin de conserver le *tag* le plus probable.

La dernière étape de cette stratégie d'identification est de comparer les séquences *tags* obtenues avec les séquences protéiques d'une banque de données. Contrairement à l'approche d'identification par empreinte de fragments peptidiques, la comparaison est faite sur la base des séquences peptidiques, grâce au logiciel *MS BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) [97]. Cette recherche est permissive aux erreurs de masse puisque les séquences peptidiques peuvent être légèrement différentes entre l'espèce étudiée et l'espèce phylogénétiquement proche sélectionnée. En effet, l'évolution engendre parfois des mutations. Le logiciel *MS BLAST* est donc utilisé pour rechercher des séquences similaires mais pas forcément identiques.

### 3. Stratégies de quantification des protéines

En protéomique, il est possible de mettre en place des stratégies de quantification des protéines selon la problématique posée (Figure 17).

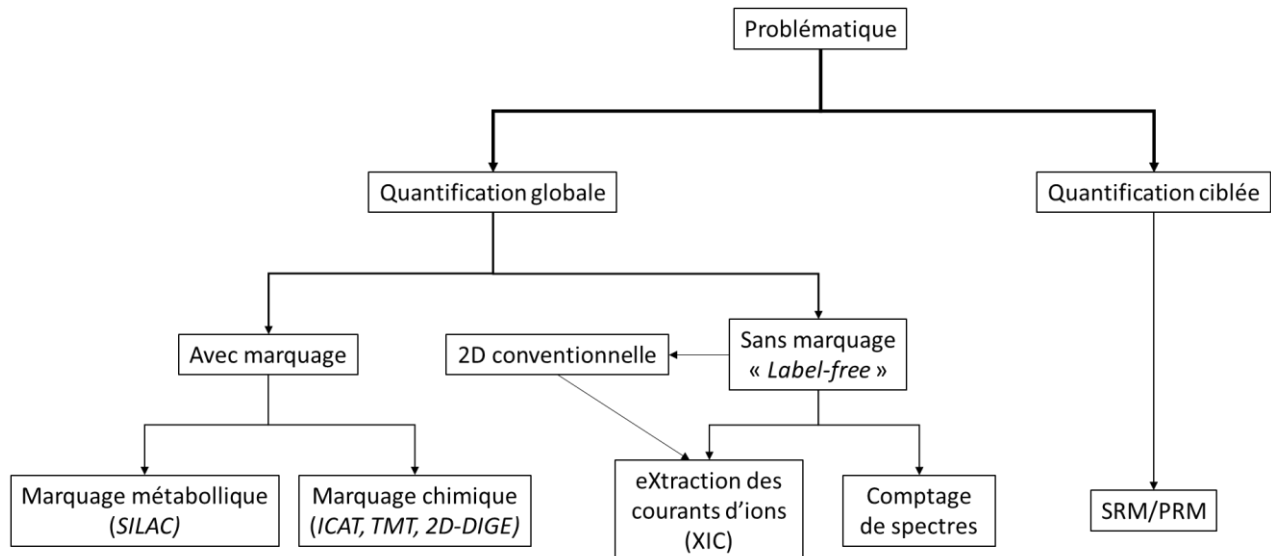


Figure 17 : Stratégies quantitatives en protéomique

#### a. Stratégie de quantification globale

Ce type de stratégie est appliquée dans le cas d'études exploratoires, où aucun *a priori* n'est posé avant l'analyse protéomique. Elle permet de quantifier plusieurs centaines, voire plusieurs milliers de protéines, simultanément. La mesure quantitative n'est pas une mesure absolue mais une mesure relative entre les différentes conditions comparées. Ces données permettent de mettre en évidence des régulations en abondance protéiques, aboutissant à des hypothèses sur les adaptations mises en place entre les conditions. Généralement les résultats sont validés par des mesures complémentaires comme des Western-Blot, des dosages enzymatiques ou chimiques, des tests fonctionnels...

Il est possible de réaliser ce type de quantification avec ou sans marquage.

### Quantification globale avec marquage

Les protéines ou les peptides sont marqués, grâce à des isotopes stables, avant ou après l'étape d'extraction des protéines. Certaines de ces méthodes sont compatibles avec un multiplexage si les différents échantillons sont marqués avec différents isotopes stables. Bien que les isotopes soient différents, les propriétés physicochimiques des peptides sont comparables (temps de rétention, efficacité d'ionisation et fragmentation), mais ont des masses différentes selon l'isotope incorporé.

Plusieurs stratégies de marquage se différencient en fonction du type de marquage et de l'étape à laquelle il est réalisé, comme présenté succinctement ci-dessous :

- ✓ Le marquage métabolique : le plus représentatif est le marquage SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell culture*) [98]. Il consiste à marquer les protéines dès l'étape de la culture cellulaire, en ajoutant un acide aminé marqué avec un isotope stable différent pour chaque condition. De cette manière, les protéines nouvellement synthétisées sont porteuses de ce marquage. Tous les extraits protéiques sont mélangés en équiquantité avant de poursuivre la préparation d'échantillon pour l'analyse en spectrométrie de masse. Cette méthode n'est compatible qu'avec des cultures cellulaires et le nombre d'échantillons par comparaison est limité à 3 : un échantillon sans incorporation de marquage et deux échantillons marqués avec l'arginine ( $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_4$ ) et

la lysine ( $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_2$ ), respectivement [99]. L'incorporation précoce du marquage est un atout pour limiter les biais techniques.

Le marquage chimique : cette méthode est basée sur la modification chimique de groupes réactifs des peptides par des isotopes stables. Plusieurs méthodes existent : ICAT (*Isotope Coded Affinity Tag*), TMT (*Tandem Mass Tags*) ... Parmi ces méthodes il y a également le marquage chimique en gel 2D-DIGE (Figure 18). Les extraits protéiques à comparer sont marqués à la cyanine 5 et à la cyanine 3, permettant un multiplexage [100]. La cyanine 2 est ajoutée à un échantillon référence constitué de quantités équivalentes de tous les échantillons. Cet échantillon de référence est déposé sur l'ensemble des gels. Lors du traitement des données de fluorescence, il permet le réaligement des différentes images et une normalisation des intensités de fluorescence entre tous les gels. Une mesure de fluorescence est faite pour chaque longueur d'onde des trois cyanines sur tous les gels et une mesure densitométrique est réalisée pour chaque spot protéique. Un test statistique détermine les spots protéiques différentiels, i.e. dont les intensités de fluorescence pour la cyanine 5 et la cyanine 3 sont statistiquement différentes. Toutes ces étapes d'alignement d'images et de mesure densitométrique sont réalisées par des logiciels de type *SameSpot* ou *DeCyder* [101] mais nécessitent un important travail manuel. Les spots protéiques différentiels sont ensuite excisés pour identifier les protéines en spectrométrie de masse.

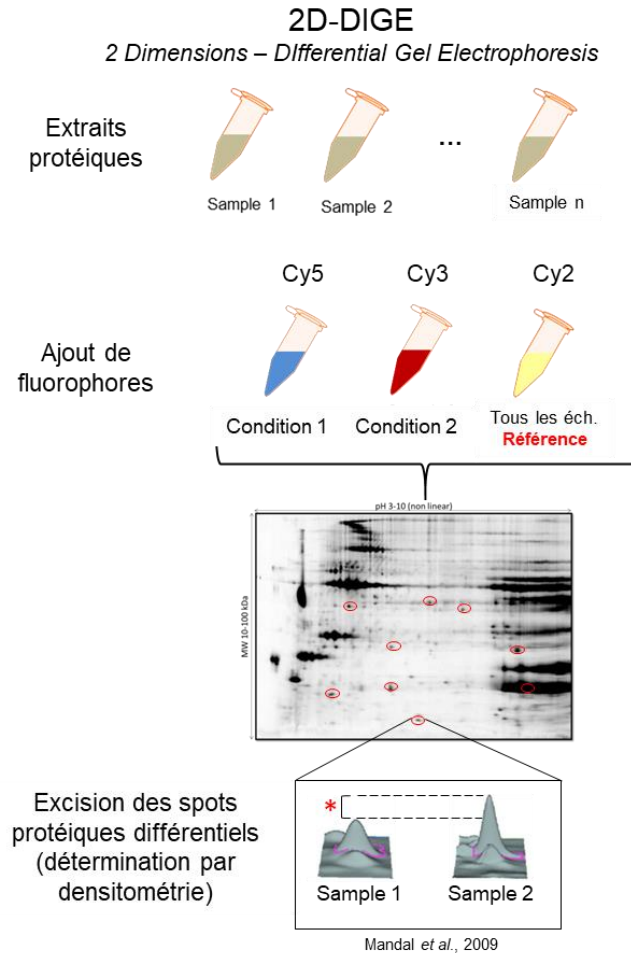


Figure 18 :Schématisation de l'approche 2D-DIGE, Cy5 = cyanine 5 (bleu), Cy3 = cyanine 3 (rouge), Cy2 = cyanine 2 (jaune)

### Quantification globale sans marquage (méthode « label-free »)

La quantification sans marquage (« label-free » [102]) est une technique où l'abondance des protéines est déduite de l'abondance des peptides tryptiques. Ces méthodes sont plus simplement réalisables que celles utilisant un marquage. Les échantillons sont analysés les uns après les autres sur le système et comparés pour obtenir des valeurs de quantification protéique relatives. L'avantage majeur d'une méthode sans marquage est le fait que le nombre d'échantillon analysable n'est pas limité contrairement à la méthode avec marquage. L'information quantitative peut être obtenue selon deux méthodes :



- ✓ Par extraction des courants d'ions (XIC) [103] : l'intensité du signal sur les spectres MS1 est considérée comme représentative de l'abondance du peptide (Figure 19). L'information quantitative est obtenue par intégration de l'aire sous la courbe. Les systèmes doivent être de haute résolution pour permettre de différencier les courants d'ions des peptides élués à des temps de rétention proches. De nombreuses solutions logicielles sont disponibles pour le traitement de données en mode d'acquisition DDA, ces travaux ont été réalisés avec le logiciel MaxQuant.

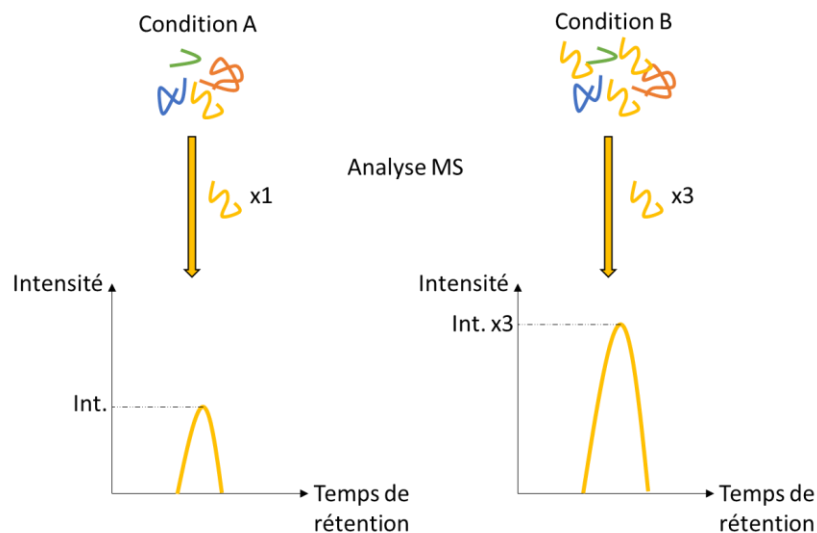


Figure 19 : Représentation schématique de la méthode de quantification sans marquage par XIC.

MaxQuant est un logiciel utilisant les données brutes pour aboutir à l'identification et à la quantification des protéines et des peptides. Dans un premier temps, l'algorithme Andromeda [88] identifie les peptides par stratégie d'empreintes de fragments peptidiques après avoir aligné les temps de rétention et les rapports  $m/z$  entre les différentes analyses. La quantification est ensuite réalisée par l'algorithme LFQ (*Label-Free Quantification*). Il est possible de prendre en compte un préfractionnement de

l'échantillon. Les signaux des peptides provenant d'une même protéine et répartis sur plusieurs fractions sont alors « regroupés » pour obtenir une quantification de la protéine sur l'ensemble des fractions analysées. L'utilisation des informations MS pour la quantification permet de dépasser la limitation de sous-échantillonnage rencontrée avec la méthode de comptage de spectres (voir ci-dessous). Lorsqu'un peptide est identifié, à un temps de rétention et un rapport  $m/z$  donné, il est possible de reporter cette information dans les autres analyses même si ce pic n'a pas été sélectionné pour être analysé en MS/MS. Il s'agit de l'option « *Match between runs* » [104].

- ✓ Par comptage des spectres : cette méthode repose sur l'hypothèse que plus un peptide est abondant, plus il est sélectionné pour l'étape de fragmentation et plus il y a de spectres MS/MS [105]. C'est la raison pour laquelle cette méthode est également appelée « quantification MS2 ». Le nombre de spectres MS2 obtenus est donc représentatif de la quantité du peptide, et donc de la protéine dont il est issu. Cependant, les protéines ayant de longues séquences génèrent un plus grand nombre de peptides et donc un plus grand nombre de spectres. Pour tenir compte de ce paramètre, un indice est calculé pour chaque protéine : le NSAF (*Normalized Spectral Abundance Factor*). Il correspond au rapport du nombre de spectres acquis (SpC) en fonction de la taille de la protéine (L), le tout divisé par la somme des SpC/L de toutes les protéines. Ainsi il est possible de comparer l'ensemble des protéines de l'échantillon et pas seulement une même protéine entre toutes les analyses. Cette méthode nécessite un temps d'exclusion dynamique réduit afin que les peptides soient suffisamment sélectionnés pour détecter des différences significatives. Une des limitations majeures est le phénomène de sous-échantillonnage :

les peptides peu intenses ne sont pas systématiquement sélectionnés dans toutes les analyses, malgré leur présence dans l'échantillon. A tort, il serait conclu que le peptide, et dans certains cas la protéine, est absent de l'échantillon.

Dans le cas d'approches quantitatives sans marquage, le nombre d'échantillons analysables peut être important ce qui implique la nécessité d'avoir des systèmes LC-MS/MS robustes au cours du temps. La mise en place de « contrôles qualité » est indispensable pour s'assurer de la stabilité du système chromatographique et du spectromètre de masse. Au cours de ces travaux, deux méthodes ont été utilisées :

- Les peptides iRT (*indexed Retention Time*) : les temps de rétention de ces peptides, ainsi que leurs intensités, sont suivis tout au long des analyses. Il est possible de sélectionner des peptides endogènes [106] ou d'utiliser 11 peptides synthétiques ajoutés en même quantité dans tous les échantillons.
- L'analyse récurrente d'un échantillon de référence : des quantités équivalentes de tous les échantillons sont mélangées pour former un échantillon « *pool* » qui est préparé comme les échantillons. Cet échantillon de référence est analysé régulièrement, tout au long du temps des analyses des échantillons. Les variations de temps de rétention des peptides et d'intensité sont calculées afin de suivre la stabilité du système.

### b. Stratégie de quantification ciblée

La plus représentative des méthodes de quantification ciblée est la méthode SRM. Il s'agit de l'analyse exclusive d'une combinaison de peptides donnés. La précision et la force de cette technique reposent sur l'utilisation de standards internes qui sont des peptides marqués avec des

isotopes stables. Théoriquement, ces peptides ont des temps de rétentions et des efficacités d'ionisation identiques aux peptides endogènes ciblés. Pour les peptides standard, l'intensité du signal MS obtenue est représentative de la quantité de ces peptides. Pour les peptides endogènes, l'intensité du signal est comparée à celles des peptides standards pour en déduire la quantité initialement présente dans l'échantillon.

Cette approche quantitative est réalisée grâce au logiciel Skyline [107]. Dans un premier temps, les peptides et protéines sont identifiés par une approche classique pour constituer la librairie spectrale. Elle contient les séquences des peptides identifiés, leurs temps de rétention et leurs masses. L'utilisateur fournit ensuite la liste des séquences peptidiques à chercher et Skyline recherche ces séquences dans la librairie et extrait le courant d'ions à la masse de ces peptides à partir des données brutes. Un « *idot product* » est calculé (valeur comprise entre 0 et 1), et plus cet indice est élevé, plus la distribution isotopique expérimentale est proche de la distribution théorique prédite par le logiciel. Chaque intégration est vérifiable et ajustable manuellement.

Indépendamment de la méthode de quantification choisie, toutes les valeurs quantitatives obtenues sont généralement utilisées pour des calculs statistiques pour mettre en évidence les protéines différentiellement abondantes entre les conditions comparées.

# Contexte et problématique biologique

# Contexte et problématique biologique

## 1. Contexte : l'atrophie musculaire, une atteinte à la santé difficile à combattre

L'inactivité physique, associée à une mauvaise alimentation, est aujourd'hui la quatrième cause de mortalité dans le monde [108]. Puisque les muscles représentent environ 40% de la masse corporelle chez l'homme, et sont essentiels au maintien de la santé (e.g. locomotion, production de chaleur, métabolisme), leur atrophie est une des conséquences les plus délétères de l'inactivité physique. L'atrophie musculaire est caractérisée par la perte de masse, de force et de mobilité musculaire. Elle est observée en situation de microgravité [109], d'immobilisation prolongée [110], lors du vieillissement [111] ou en association avec certaines maladies comme le cancer [112] ou le SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis) [113]. La connaissance sur les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents de l'atrophie musculaire est en continuelle progression grâce à des études menées sur des modèles humains ou murins d'atrophie musculaire [114]. Cependant, nous ne disposons toujours pas de thérapie efficace (que ce soit sous la forme de programmes nutritionnels, d'exercices physiques, ou en faisant appel à des traitements médicamenteux) pour sa prévention et son traitement.

Parmi les « symptômes » déclenchés par des voyages spatiaux, on retrouve l'atrophie musculaire [109], la perte de masse et de densité osseuse [115-120], des dérèglements du système neurophysiologique (connu sous le nom de « mal de l'espace » [121, 122]) et la redistribution des fluides préférentiellement dans la partie supérieure du corps [123, 124]. La perte musculaire et osseuse est induite par un manque de charge sur la structure musculo-squelettique [116, 119, 125, 126]. L'atrophie musculaire touche essentiellement les muscles

posturaux [127, 128] et les membres inférieurs [129]. Il a été démontré que la balance protéique musculaire était déséquilibrée avec notamment une diminution de la synthèse protéique [126]. Cela pourrait participer à la perte de masse musculaire de 10 à 20% observée lors de courts voyages spatiaux et pouvant atteindre plus de 50% pour de plus longs vols et sans mise en place de contremesures [115]. Dans de telles conditions, la santé des astronautes se détériore de manière importante et limite la durée des vols.

## 2. Contremesures actuelles pour lutter contre l'atrophie musculaire induite par microgravité

Pour limiter la perte musculaire, des contremesures sont mises en place comme des programmes nutritionnels, des exercices physiques ou encore une modification de l'environnement en créant une gravité artificielle [130]. Une complémentation en antioxydants a déjà démontré une efficacité à stimuler la synthèse protéique et donc à préserver la masse musculaire de rats suspendus [131]. De plus, une alimentation complémentée en protéines [132, 133] ou en acides aminés [134] est notamment utilisée pour prévenir la sarcopénie (i.e. atrophie musculaire due au vieillissement). L'efficacité de ces programmes nutritionnels pour limiter la perte musculaire reste partielle. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour, par exemple, déterminer le type de protéines/acides aminés à ingérer ainsi que la quantité et la durée de la supplémentation. Les programmes d'exercices physiques proposés aux astronautes [135], qu'ils soient aérobiques ou résistifs, ont déjà démontré une efficacité partielle limitant la perte musculaire induite par microgravité [136]. Cependant, il reste à déterminer la nature, la durée et la fréquence des différents exercices physiques permettant la meilleure protection possible contre l'atrophie musculaire. Enfin la création d'une gravité artificielle (force centrifuge de 0.5 à

1g) semble efficace pour prévenir l'atrophie musculaire [137, 138]. Néanmoins, il est encore nécessaire de déterminer la durée sur laquelle les astronautes seraient soumis à la gravité artificielle pour maximiser la préservation musculaire.

Pour conclure, de nombreuses contremesures ont été envisagées, testées et ont montré des résultats prometteurs pour limiter le développement de l'atrophie musculaire en situation de microgravité. Cependant, des études supplémentaires sont encore nécessaires pour établir des protocoles et aboutir à une plus grande efficacité [130]. Pour aller plus loin, s'inspirer d'organismes ayant les capacités naturelles de lutter contre l'atrophie musculaire dans des conditions pourtant favorables à son développement pourrait permettre de découvrir des solutions thérapeutiques ou préventives innovantes. C'est notamment le cas des animaux hibernants.

### 3. Problématique : L'hibernation, un modèle de choix pour identifier des mécanismes anti-atrophie

L'hibernation est une stratégie adaptative adoptée par de nombreuses espèces pour survivre aux conditions hivernales difficiles, i.e. la baisse importante des températures et la diminution de la disponibilité en ressources alimentaires [139, 140]. Durant cette période de plusieurs mois, les organismes présentent une dépression métabolique importantes (jusqu'à 2-4% du taux métabolique basal en période active), combinée à une diminution de la température corporelle (seulement 2 à 10°C) et à une réduction du rythme cardiaque et respiratoire [139]. De plus, les mammifères hibernants sont immobilisés sur de longues périodes, sans manger, pouvant



être entrecoupées de phase de réveil [141]. Toutes ces caractéristiques permettent aux hibernants d'économiser de l'énergie.

L'ours hibernant fait figure d'exception. En effet, lors de son hibernation de 5 à 7 mois, il ne présente aucune phase de réveil. De plus, sa température corporelle est proche de celle de la période estivale avec une réduction de seulement 2 à 5°C [142]. Par ailleurs, le taux métabolique est réduit de 75% [143]. Malgré des conditions extrêmes d'immobilisation et de jeûne prolongé, l'ours brun hibernant a la capacité unique de préserver sa masse [144] et sa force musculaire [145]. Il représente donc un modèle de choix pour étudier les mécanismes permettant de lutter contre l'atrophie musculaire. A ce jour, les mécanismes sous-jacents de l'épargne protéique musculaire chez l'ours ne sont toujours pas compris.

#### 4. Projet de thèse

Nous avons décidé d'explorer plusieurs mécanismes susceptibles de participer à la préservation musculaire de l'ours brun, ce qui pourrait aboutir, sur le long terme, à une transposition éventuelle à l'homme :

- Durant l'hibernation, à l'échelle de l'organisme entier, il est connu que les substrats énergétiques préférentiels sont les lipides, au détriment du glucose. Nous avons donc choisi de nous focaliser sur le métabolisme des substrats énergétiques dans le muscle de l'ours brun hibernant, afin de mettre en évidence les adaptations énergétiques à l'hibernation spécifiques du muscle.
- L'équilibre de la balance protéique (i.e. équilibre entre synthèse et dégradation protéique) est maintenu dans le muscle durant l'hibernation. En effet, il a été

démontré que la synthèse et la dégradation des protéines musculaires étaient fortement diminuées pendant l'hibernation de l'ours brun [146]. Nous avons donc fait le choix d'explorer également ce mécanisme sur des échantillons musculaires d'ours bruns.

- Le stress oxydant est connu pour induire des dommages sur les protéines musculaires, pouvant ainsi conduire à la dégradation de ces dernières. Une limitation du stress oxydant pourrait en effet être l'un des mécanismes participant à la préservation des protéines musculaires en période d'hibernation. Nous avons donc choisi d'examiner également la régulation du stress oxydant dans le muscle squelettique de l'ours brun.
- Durant l'hibernation, la dépression métabolique impacte également le système nerveux central (SNC) [147]. Par ailleurs, il a déjà été démontré que l'hibernation était caractérisée par une neuroprotection du SNC, avec par exemple une limitation des dommages cérébraux chez des écureuils [148]. Le liquide cérébro-spinal (LCS) est directement en contact avec le système nerveux central et sa composition protéique est à 80% similaire à la composition sanguine [149, 150]. Caractériser le LCS chez l'ours brun hibernant vs l'ours actif pourrait mettre en évidence des régulations impliquées dans la neuroprotection ou le métabolisme énergétique. De plus, étant donné la similarité de la composition protéique avec le système sanguin, cela permettrait d'identifier une partie des protéines sériques.
- En 2012, une équipe a étudié l'implication du système nerveux central dans la préservation musculaire chez l'ours brun hibernant. Il a été observé qu'après

dénervation (i.e. condition atrophiante), la perte musculaire observée chez l'ours brun hibernant était moins importante, comparé à la condition active [REF – Lin 2012]. Le système nerveux central ne semble donc pas impliqué au premier plan, et l'hypothèse de l'existence de composés circulants participant à la protection musculaire peut être proposée. Nous avons choisi d'étudier la composition du sérum de l'ours brun hibernant, et ce sur différents plans :

- Les hormones sont des molécules circulantes pouvant agir sur la synthèse et la dégradation des protéines, et donc indirectement sur l'intégrité musculaire [151]. Par exemple, les glucocorticoïdes (comme le cortisol) stimulent la dégradation des protéines musculaires, tandis que les hormones comme la ghréline, IGF-1 (Insuline-like Growth Factor-1) et l'adiponectine stimule la synthèse. Notre intérêt s'est donc porté sur le niveau d'hormones circulantes chez l'ours brun hibernant.
- Dans le système circulant, il existe également des vésicules extracellulaires (comme les exosomes) constituées de lipides, d'acides nucléiques et de protéines [152]. Elles sont produites par invagination de la membrane cellulaire et leur composition, dont le cargo protéique, est donc représentatif de la cellule. Ainsi, caractériser le cargo protéique de vésicules extracellulaires, provenant du sérum d'ours hibernant, permettrait de mieux appréhender les régulations physiologiques de l'ours brun.

Afin d'explorer ces mécanismes, nous avons développé des stratégies de protéomique quantitative par spectrométrie de masse. Pour explorer le protéome de manière approfondie, nous avons mis en place des stratégies quantitatives complémentaires (SDS PaGE-XIC et 2D-DIGE-MS). Nous avons également développé un protocole d'enrichissement en phosphopeptides pour une analyse phosphoprotéomique ainsi qu'une méthode SRM (Single Reaction Monitoring) pour doser l'adiponectine circulante. En parallèle, des approches d'indentification par spectrométrie de masse ont été mises en place pour l'étude du LCS et d'exosomes sériques. Enfin, la recherche des composés actifs dans le sérum d'ours hibernant a été débuté par l'analyse des régulations du protéome de myotubes humains traités avec des sera complémenté en molécules candidates comme le beta-hydroxybutyrate. Dans un même temps, différents protocoles ont été optimisés afin de digérer, fractionner ou dépler le sérum d'ours brun.

L'ensemble des stratégies développées, ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans la partie « Résultats » de ce manuscrit.

## Partie 2 : Résultats

## Chapitre 1 - Développements bioinformatiques pour l'étude d'espèces « exotiques » par spectrométrie de masse

### **Collaborations :**

- L'équipe bioinformatique du LSMBO, avec les Drs. Patrick Guterl et Alexandre Burel.
- Drs Jean-Pol Fripiat (Université de Lorraine, Laboratoire Stress, IMMunité, Pathogènes, Vandœuvre-lès-Nancy, France) et Laurence Vico (Université Jean Monnet, INSERM, Santé Ingénierie Biologie St Etienne, Laboratoire de Biologie des Tissus Ostéoarticulaires , St Etienne, France)
- Dr Jérémy Terrien (Museum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Brunoy, France)

## Chapitre 1 - Développements bioinformatiques pour l'étude d'espèces « exotiques » par spectrométrie de masse

*Les développements présentés dans ce chapitre ont été réalisés en collaboration avec l'équipe bioinformatique du laboratoire (Dr P. Guterl et A. Burel), ainsi que les informaticiens en charge de la base de données neXtProt.*

Après une analyse de protéomique quantitative globale par LC-MS/MS ou 2D-DIGE-MS, la quantité de données produites est très importante ce qui peut rendre difficile l'interprétation biologique. Pour dépasser cette difficulté et accélérer cette étape, nous avons développé des solutions logicielles nous permettant (i) de trouver la protéine humaine homologue d'une protéine d'une espèce « exotique », (ii) de mettre en évidence les fonctions biologiques dans lesquelles sont impliquées les protéines différentiellement exprimées entre deux conditions, (iii) de visualiser les variations d'abondance protéique sur les cartes du métabolisme et des voies de signalisation de la base de données *KEGG* et (iv) de déterminer l'origine tissulaire des protéines identifiées. Par ailleurs, identifier les protéines à partir de données MS/MS est dépendant de la qualité de la banque de données de séquences protéiques utilisée. Pour l'analyse d'échantillons d'espèces « exotiques », l'utilisation d'une banque « classique », issue par exemple de la base de données *UniProtKB* [153], n'est souvent pas réalisable car elle ne contient pas ou trop d'informations. Pour l'étude par spectrométrie de masse de la physiologie de l'ours brun, nous proposons une alternative consistant à créer une banque de données protéiques à partir de données d'assemblage du génome contenues dans la banque de données *RefSeq* [92].

## 1. Trouver la protéine humaine homologue d'une protéine d'une espèce « exotique »

Afin d'interpréter les rôles biologiques des protéines identifiées à partir de données de spectrométrie de masse, les annotations fonctionnelles de la base de données *Gene Ontology* sont généralement utilisées. Dans le cas d'une espèce « exotique », c'est-à-dire dont le génome n'est pas séquencé ou pour laquelle il n'existe pas ou peu d'annotations fonctionnelles, cette étape n'est pas réalisable. En effet, bien que la base de données *Gene Ontology* soit documentée pour 4.467 espèces, seulement 6 espèces de mammifères sont renseignées avec plus de 14.000 produits de gènes annotés. Afin de palier à cette difficulté, les annotations de protéines homologues, généralement *homo sapiens sapiens*, sont utilisées. Les protéines homologues sont des protéines dont les séquences sont très similaires puisqu'elles sont les produits de gènes provenant d'un gène ancestral commun [154]. Pour déterminer la séquence protéique homologue humaine (données théoriques) correspondant à la séquence d'une protéine de l'espèce « exotique » (données expérimentales), l'algorithme FASTA (EMBL-EBI) est requis [155]. Une séquence protéique, de l'espèce exotique, est alignée avec plusieurs protéines de la banque de données et chaque comparaison est caractérisée par un score, un pourcentage de similarité et d'identité. Seule la correspondance ayant le score le plus élevé est considérée comme protéine homologue.

Au laboratoire, nous avons implémenté l'utilisation de l'algorithme FASTA v36 [156, 157] sur une plateforme Galaxy [158]. La recherche de protéines homologues, à partir d'une large liste de protéines, peut ainsi être réalisée dans une banque de données protéiques restreinte à une taxonomie choisie (pourvues d'annotations fonctionnelles dans la base de données *Gene Ontology* pour la majorité des protéines) ou dans un fichier fasta fourni par l'utilisateur. Les



annotations fonctionnelles des protéines homologues identifiées seront ensuite recherchées pour poursuivre le traitement bioinformatique des données.

## 2. Extractions des annotations fonctionnelles de la base de données *Gene Ontology* pour une liste de protéines

Pour décrire un système biologique de manière structurée, un vocabulaire contrôlé a été établi depuis quelques années par le consortium *Gene Ontology* (GO) [159] avec 3 types d'annotations fonctionnelles des protéines : la fonction moléculaire de la protéine (FM), le processus biologique (PB) dans lequel la protéine est impliquée et sa localisation subcellulaire (CC) [160]. Ces annotations regroupent un ensemble de termes diversifiés qui définissent plus précisément les rôles biologiques des protéines étudiées. Ces termes GO sont régulièrement revus manuellement par des bioinformaticiens du consortium GO, afin de limiter la redondance, de changer les relations entre les termes et d'ajouter ou de supprimer des termes pour une protéine donnée [161]. L'utilisation de cette banque de données permet donc de décrire de manière simple et structurée un modèle biologique.

Afin de définir les rôles biologiques et les fonctions dans lesquelles les protéines identifiées sont impliquées, nous avons établi un algorithme capable d'extraire les termes GO de la base de données *Gene Ontology* à partir d'une longue liste de protéines. Cet algorithme a été implémenté dans la suite logicielle MSDA [95] et sur notre plateforme Galaxy. Ces informations peuvent ensuite être analysées de manière statistique avec un calcul d'enrichissement en annotations fonctionnelles.

### 3. Calcul d'enrichissement en annotations fonctionnelles

Pour mettre en évidence les fonctions biologiques les plus représentées par une liste de protéines données (par exemple un ensemble de protéines différentiellement exprimées), les annotations fonctionnelles sont tout d'abord extraites (voir page 64). La fréquence de l'occurrence d'une fonction biologique donnée dans le jeu de données est comparée à la fréquence d'occurrence de cette même fonction dans la banque de données regroupant l'ensemble des annotations fonctionnelles connues pour l'espèce considérée. Nous utilisons pour cela les algorithmes du site *David* (<https://david.ncifcrf.gov/>). Or, jusqu'à il y a peu, ces calculs étaient effectués en ligne sans mise à jour de la base de données d'annotations fonctionnelles. C'est une limitation que nous avons dépassée en utilisant l'algorithme *EASE David* [162] (version des algorithmes du site *David* fonctionnant en local), et en générant à la demande une banque de données GO mise à jour. La fréquence d'occurrence d'une annotation fonctionnelle entre les données expérimentales et les données théoriques est statistiquement évaluée par un test de Fisher (teste l'égalité des variances) et un test de Benjamini-Hochberg (augmente les p-values en fonction du nombre de p-values et du taux de p-values non-significatives). Grâce à cela, un score est attribué à chaque annotation fonctionnelle. Par la suite, nous calculons un facteur d'enrichissement (FE) pour chaque annotation fonctionnelle :

$$\text{Facteur d'Enrichissement (FE) de l'annotation « X »} = \frac{\left( \frac{\text{Nombre de protéines dans une catégorie GO}}{\text{Nombre de protéines avec l'annotation « X »}} \right) \text{ Dans la banque de données GO}}{\left( \frac{\text{Nombre de protéines dans une catégorie GO}}{\text{Nombre de protéines avec l'annotation « X »}} \right) \text{ Dans le jeu de données}}$$

Les tests statistiques et le facteur d'enrichissement (FE) sont représentatifs de l'importance avec laquelle une fonction biologique donnée est statistiquement très représentée pour une liste de protéines données. S'il s'agit de protéines différentiellement exprimées, cela révèle les fonctions les plus régulées entre les conditions comparées.

#### 4. Visualisation des régulations d'abondance des protéines sur les cartes du métabolisme et des voies de signalisation de la banque de données *KEGG*

Pour interpréter le rôle d'une protéine dans une voie métabolique et/ou une cascade de signalisation, il est possible de localiser cette protéine sur les cartes du métabolisme et des voies de signalisation de la base de données *KEGG* [163]. Pour cela, nous avons reproduit certains algorithmes, disponibles sur le site de la base de données *KEGG* (<https://www.genome.jp/kegg>), en les implémentant sur notre plateforme Galaxy. La procédure en 3 étapes est la suivante : (i) identification des cartes de la base de données *KEGG* sur lesquelles des protéines sont identifiées, (ii) récupération des cartes d'intérêt et (iii) visualisation des protéines sur les cartes isolées (Figure 20) (avec un code couleur reflétant la différence statistique et le facteur de changement d'abondance de la protéine [FC]).

PP123 la protéine est présente dans le jeu de données mais ne présente pas de p-value inférieure au seuil fixé

PP123 la protéine possède une p-value inférieure au seuil fixé.

PP123 la protéine a une p-value inférieure au seuil fixé ET la valeur du FC est supérieure à une valeur seuil fixée par l'expérimentateur.

PP123 la protéine a une p-value inférieure au seuil fixé ET la valeur du FC est inférieure à une valeur seuil fixée par l'expérimentateur.

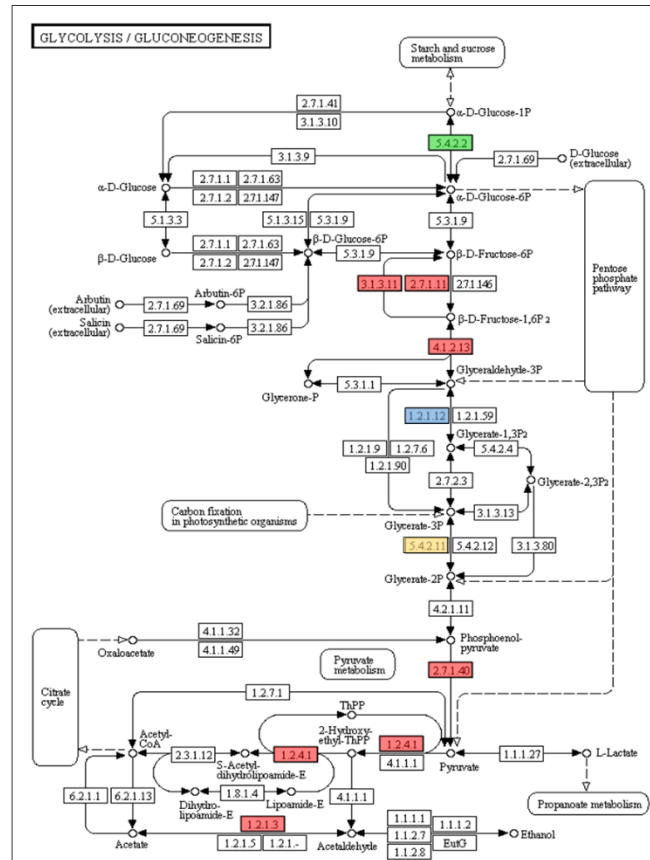


Figure 20 : visualisation des abondances de la liste de protéines données selon la p-value et le facteur de changement d'abondance de la protéine (FC) selon un code couleur jaune, bleu, vert ou rouge. La signification de chaque code couleur est détaillée dans la partie gauche de la figure et un exemple de visualisation est présentée en partie droite.

Sur notre plateforme Galaxy, l'utilisateur indique les seuils à prendre en compte pour la p-value, le FC ou les deux. Il est également possible de réaliser une simple localisation sans prendre en compte la p-value ou le FC. Ce type de visualisation permet d'appréhender de manière précise et simple les régulations biologiques mises en place entre les différentes conditions. Cet algorithme a été utilisé sur un grand nombre des projets présentés dans cette thèse.

## 5. Extraction des localisations tissulaires des protéines documentées sur la base de données *neXtProt*

*NeXtProt* est une base de données du SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*) regroupant de nombreuses annotations fonctionnelles des protéines humaines [164]. Ces annotations sont issues notamment des banques de données *UniProtKB/SwissProt*, *Peptide Atlas* [165] et *Human Protein Atlas* [166], et sont manuellement vérifiées et catégorisées selon la qualité de l'information. Les protéines dont les informations sont de très bonne qualité sont annotées « *Gold* », et celles de moins bonne qualité sont annotées « *Silver* ». Les protéines classées dans la catégorie « *Bronze* » ne présentent pas une qualité d'information suffisante pour être ajoutées à la base de données *neXtProt* [164]. Parmi les informations contenues dans cette base de données, les localisations tissulaires des protéines et des ARNm sont disponibles. Nous avons pu bénéficier de ces informations dans le cadre d'un projet visant à explorer les effets d'un voyage spatial de 30 jours sur le fémur de souris mâles C57BL/6. Lors des voyages spatiaux, les organismes des astronautes sont atteints de pertes osseuses, de pertes musculaires, de dérégulations métaboliques et de dérégulations du système immunitaire [123]. Afin de mieux appréhender les effets des voyages spatiaux sur le système immunitaire humoral, et plus précisément le développement des lymphocytes B, les protéomes de fémurs de souris ont été comparés entre trois groupes : (i) après 30 jours de voyage spatial (groupe de vol), ou (ii) après 30 jours de voyage spatial suivis d'une semaine de récupération sur Terre (groupe de récupération), ou (iii) resté sur Terre (groupe contrôle). Par spectrométrie de masse, 3254 protéines ont été identifiées dont 3063 ont été quantifiées de manière robuste. Or les fémurs de souris contenaient encore la moelle osseuse. Nous avons donc voulu déterminer l'origine des protéines, à savoir si elles

provenaient de l'os ou de la moelle osseuse. Pour cela nous avons bénéficié de l'aide de l'équipe bioinformatique de *neXtProt* afin de développer un algorithme capable d'extraire la liste des protéines et ARNm connus pour être exprimés dans chacun de ces tissus, facilitant ainsi l'interprétation biologique de nos résultats. L'algorithme développé est aujourd'hui implémenté sur notre plateforme Galaxy.

Les localisations tissulaires ont été extraites, de la base de données *neXtProt*, pour près de 79% des protéines quantifiées (soit 2425 protéines), dont 2331 provenaient de la moelle osseuse, et 94 de l'os exclusivement (Figure 21).

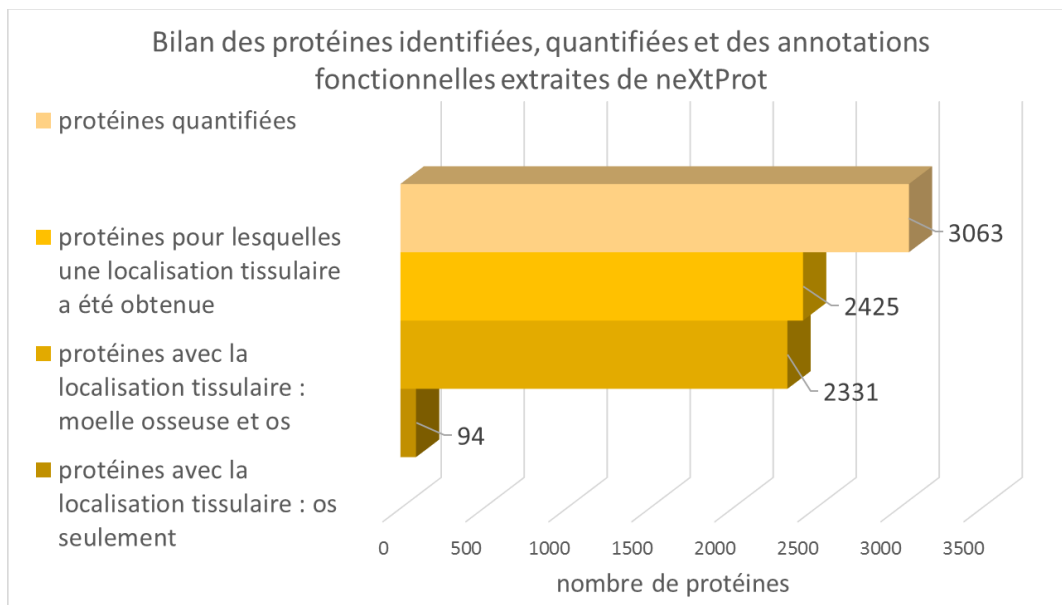


Figure 21 : localisations tissulaires (moelle osseuse et os, ou os seulement) obtenues pour 79% des protéines quantifiées après analyse LC-MSMS de fémurs de souris.

Parmi les protéines quantifiées, un certain nombre de protéines étaient différentielles entre les groupes dont des protéines impliquées dans le développement des cellules immunitaires. Les variations d'abondance protéique entre le groupe de récupération et les deux autres groupes

(groupe contrôle et groupe de vol) étaient en accord avec une diminution du développement des cellules immunitaires après une semaine de récupération sur Terre. Ces résultats ont été confirmés par une réduction du nombre de ces cellules dans la rate (-41%) et dans la moelle osseuse (-61%). Cependant, cela ne semble pas être dû à un phénomène d'apoptose cellulaire puisque les facteurs d'apoptose identifiés n'étaient pas plus exprimés dans le groupe de récupération. Après un voyage spatial de 30 jours suivis d'une semaine de récupération sur Terre, le développement des cellules immunitaires B est donc perturbé. Il sera intéressant d'évaluer le temps nécessaire pour limiter les risques d'infections des astronautes après leur retour sur Terre.

Par ailleurs, les abondances des peptides des immunoglobulines étaient plus importantes dans le groupe de vol comparé au groupe contrôle et au groupe de récupération, suggérant la mise en place d'une réponse immunitaire liée à une infection contractée par les souris durant le vol. La réponse immunitaire innée n'est donc pas réprimée lors des vols spatiaux. De plus, le niveau d'expression de la protéine C5 (médiateur majeur de la réponse inflammatoire) était moins important dans les groupes de vol et de récupération, comparés au groupe contrôle, démontrant que les vols spatiaux impactent de manière négative la réponse inflammatoire, et ce même après une semaine de récupération sur Terre. Enfin, les niveaux d'expression de protéines impliquées dans des processus de synthèse des protéines étaient significativement diminués dans les groupes de vol et de récupération, comparés au groupe contrôle, démontrant que la synthèse des protéines osseuses est réduite durant les vols spatiaux et qu'une récupération d'une semaine n'est pas suffisante pour restaurer cette fonction.

L'ensemble de ces résultats a été valorisé dans une publication en 2018 présentée en annexe [167], en collaboration avec le Centre National d'Etude Spatial (CNES), Jean-Pol Fripiat (Université de Lorraine) et Laurence Vico (Université de St Etienne).

## 6. Identification des protéines en utilisant une banque de données protéiques issue de données d'assemblages du génome (*RefSeq*) : application à l'étude d'une espèce non-séquencée

Pour les espèces séquencées, les identifications sont réalisées par comparaison des données expérimentales (spectres MS et MS/MS) avec une banque de données de séquences protéiques classiquement constituée à partir de la base de données *UniProtKB/SwissProt* (voir page 41). Dans le cas d'une espèce non-séquencée, les bases de données « classiques » peuvent être utilisées mais ne contiennent généralement qu'un très faible nombre de séquences protéiques. Par exemple, pour l'ours brun (Taxonomie 9644, URSAR) seulement 7 protéines sont renseignées dans la base de données *SwissProt*, ce qui est clairement insuffisant pour produire une banque de données. En comparaison, les protéomes de l'homme (Taxonomie 9606, HUMAN) ou de la souris (Taxonomie 10090, MOUSE) comptent respectivement 20.432 et 17.026 séquences protéiques dans la base de données *SwissProt*. Pour interpréter les informations obtenues par spectrométrie de masse lors de l'analyse d'échantillons d'une espèce « exotique », il est possible d'utiliser une banque contenant les séquences protéiques d'une espèce phylogénétiquement proche de l'espèce étudiée. La nouvelle solution que nous avons développée au laboratoire est de construire une banque de données de séquences protéiques à partir de données d'assemblage du génome issues de la base de données *RefSeq* (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) [92]. Le génome de l'ours brun (*Ursus arctos horribilis*) a en effet été mis en ligne le 20 Septembre



2018. A partir de ces données, les séquences complètes des protéines sont prédites par des algorithmes. Des séquences partielles sont également ajoutées à partir de prédictions faites par des laboratoires, ou issues d'une prédiction automatique à partir d'une séquence de génome incomplète [168]. Les séquences partielles ajoutées sont souvent identiques aux séquences complètes prédites automatiquement ce qui entraîne la présence d'une forte redondance dans le protéome issu de la base de données *RefSeq*. Nous avons mis en place (i) la génération d'une banque de données du protéome complet pour une taxonomie choisie à partir de la base de données *RefSeq* et (ii) la suppression de la redondance contenue dans cette banque de données. Ainsi nous obtenons une banque de données protéiques pour des espèces non représentées dans les banques « classiques » et ce en éliminant la redondance des séquences protéiques.

Afin d'évaluer les apports de l'utilisation d'une banque de données protéiques issue de la base de données *RefSeq*, comparée à une banque de données « classique », les protéines identifiées après une analyse par spectrométrie de masse de muscle d'ours brun ont été comparées. Des extraits protéiques de muscle squelettique d'un ours brun hibernant (échantillon « hiver ») et d'un ours actif (échantillon « été »), après préfractionnement en 35 bandes protéiques sur gel SDS PaGE, ont été analysés par LC-MS/MS. Les identifications protéiques ont été réalisées en interrogeant une banque de données protéiques générée à partir de la base de données *RefSeq* (taxonomie : 116960, *Ursus arctos horribilis*, *RefSeq*, 33.139 entrées) et une banque de données générée à partir de la base de données *Uniprot* (taxonomie : 9632, *Ursidae*, *SwissProt* et *TrEmbl*, 63.385 entrée).

90.5% des protéines identifiées dans l'échantillon « hiver » (Figure 22A) et 90.7% des protéines dans l'échantillon « été » (Figure 22B) ont été communément identifiées en utilisant la banque de données issue de *RefSeq* et la banque de données issue de *UniProt*, démontrant que le protéome identifié était très similaire entre l'utilisation de l'une ou de l'autre des banques de données.

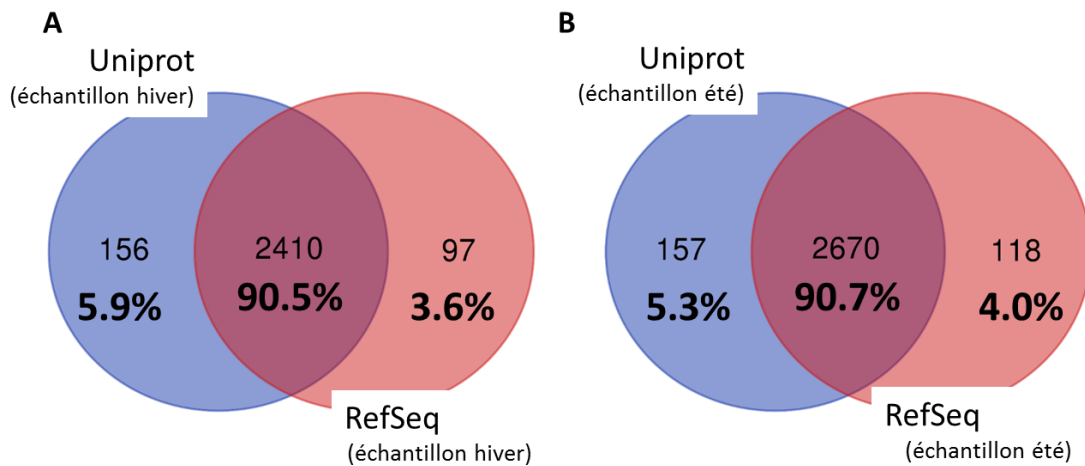


Figure 22 : Recouvrement entre les identifications protéiques obtenues en utilisant la banque UniProt (bleu) ou de la banque RefSeq (rose) pour les protéines identifiées sur les deux échantillons (A), sur l'échantillon hiver (B) ou l'échantillon été (C).

Par ailleurs, le nombre de peptides identifiés par protéine pour l'utilisation des deux banques de données, *RefSeq* et *UniProt*, a été comparé pour l'échantillon « hiver ». 1621 protéines ont été identifiées avec le même nombre de peptides, indépendamment de la banque utilisée. En revanche, 410 protéines ont été identifiées avec un plus grand nombre de peptides en utilisant la banque de données *RefSeq* et 374 protéines avec un plus grand nombre de peptides en utilisant la banque de données *UniProt*. Il est important de noter que la banque de données protéiques issue de *RefSeq* est une banque de données spécifique à l'espèce étudiée, contrairement à la banque de données issue de *UniProt* qui contient les séquences protéiques de plusieurs

taxonomies. Des séquences protéiques provenant de différentes espèces peuvent être très similaires, voire identiques. De ce fait, les protéines identifiées avec l'utilisation de la banque de données issue de *UniProt* sont plus susceptibles d'être identifiées avec un seul peptide unique. De plus, les identifications protéiques obtenues avec l'utilisation de la banque de données *RefSeq* peuvent alors être considérées comme plus représentatives du protéome de l'espèce étudiée et sera donc à privilégier à l'avenir.

Enfin, dans une approche de protéomique quantitative, les protéines quantifiées avec seulement un peptide unique ne sont généralement pas conservées. En effet, la quantification d'une protéine basée sur l'intensité d'un seul peptide n'est pas suffisamment robuste pour représenter l'abondance de cette protéine. Or, 660 protéines ont été identifiées avec un seul peptide avec les deux bases de données, dont 91 protéines uniquement avec l'utilisation de la banque de données issue de *RefSeq* et 170 protéines uniquement avec l'utilisation de la banque de données issue de *UniProt*. Aux vues de ces résultats il semble que l'utilisation de la banque de données issue de *RefSeq* permette d'obtenir un moins grand nombre de protéines identifiées avec un seul peptide et sera à privilégier pour une analyse quantitative par spectrométrie de masse d'une espèce « exotique », comme l'ours brun.

Notre algorithme a déjà été utilisé dans le cadre d'une étude des régulations d'abondance des protéines hépatiques de lémuriens (*microcebus murinus*) qui était le sujet de mon stage de Master. Ce projet a été réalisé en collaboration avec le Dr J. Terrien du Museum National d'Histoire Naturelle (UMR CNRS/MNHN 7179, Brunoy).

Chaque année, la saison hivernale du microcèbe peut être divisée en deux phases au cours desquelles la physiologie du lémurien évolue : durant la première phase (phase obésogène) le poids de l'animal augmente avec une insulinémie et une tolérance au glucose normales. Dans la seconde phase (phase diabétogène), l'animal perd du poids, une hyperinsulinémie et une intolérance au glucose se mettent en place, suggérant l'établissement d'un état insulino-résistant [169]. Cependant, sur le long terme, aucune pathologie ne se développe ce qui fait de ce lémurien un bon modèle d'obésité réversible. Le foie est un organe clef du métabolisme glucidique et une dérégulation du fonctionnement hépatique a été observé chez des personnes diabétiques [170]. Etant donné que le microcèbe ne développe pas de diabète malgré les dérégulations de la phase diabétogène, déterminer les adaptations hépatiques, mises en place entre les deux phases hivernales du microcèbe, pourrait ouvrir la voie à de nouvelles solutions thérapeutiques contre le diabète chez l'homme. Pour cela, une analyse de protéomique différentielle entre la phase diabétogène et la phase obésogène a été réalisée sur des extraits de protéines hépatiques. Etant donné l'absence de séquences protéiques dans les bases de données « classiques » (e.g. 15 protéines dans la base de données *SwissProt*), les protéines ont été identifiées en utilisant une banque de données protéiques générée à partir de la base de données *RefSeq* grâce à l'algorithme présenté ci-dessus (taxonomie : 30608, 39.712 entrées, Janvier 2019). 4964 protéines ont été identifiées, dont 4522 protéines ont été quantifiées (avec plus d'un peptide unique). L'analyse bioinformatique des données est en cours de réalisation.

## 7. Extraction des rôles biologiques des sites de phosphorylations sur les séquences des protéines de l'ours brun

L'ajout d'un groupement phosphate (i.e. phosphorylation) sur la séquence d'une protéine peut réguler sa durée de demi-vie, sa localisation et son activité (voir page 16). La localisation des événements de phosphorylations sur les protéines par spectrométrie de masse (i.e. phosphoprotéomique) permet donc de mieux caractériser les régulations du protéome.

Cependant, il reste à déterminer si la phosphorylation identifiée sur un acide aminé donné, possède un rôle fonctionnel connu. Pour cela, il est possible de se référer aux informations contenues des bases de données comme *HPRD* [171] (<https://www.hprd.org>), *PhosphoELM* [172] (<http://phospho.elm.eu.org>), *PHOSIDA* [173] (<http://www.phosida.de>) ou *PhosphoSite Plus* [174] (<https://www.phosphosite.org>). Cette dernière a été créée en 2003 et les effets sur les conformations des protéines (e.g. pour l'hydrolase phénylalanine [175]) et sur les interactions protéine-protéine [176], par exemple, induits par une phosphorylation sont référencés. Les informations sont compilées à partir de publications et sont automatiquement comparées aux informations des bases de données protéiques comme *UniProt* ou *RefSeq* avant d'être vérifiées manuellement [174]. La base de données *PhosphoSite Plus* est renseignée pour 18 espèces (l'homme et la souris majoritairement), mais pas pour des espèces exotiques comme l'ours brun. De ce fait, pour interpréter les rôles biologiques des événements de phosphorylations identifiés chez une espèce exotique comme l'ours brun, il est nécessaire d'utiliser (avec prudence) les informations de la base de données *PhosphoSite Plus* renseignées pour l'homme. Nous sommes en train de développer une procédure fonctionnant en 4 étapes (Figure 23) : (i) déterminer la protéine homologue humaine de la protéine d'ours brun identifiée grâce l'algorithme *Fasta v36*

## || Partie 2 – Chapitre 1 : Développements bioinformatiques pour l'étude d'espèces « exotiques » par spectrométrie de masse

(voir page 63), (ii) aligner les séquences de la protéine ours et de la protéine homologue humaine grâce à l'algorithme *Clustal W* [177], (iii) vérifier si le site de phosphorylation identifié sur la protéine d'ours brun correspond à un site de phosphorylation sur la protéine homologue humaine et s'il est renseigné dans la base de donnée *PhosphoSite Plus*, avant (iv) d'extraire les informations connues pour ce site de phosphorylation pour la protéine homologue humaine et d'utiliser ces informations pour comprendre les régulations induites par phosphorylation sur la protéine d'ours brun.

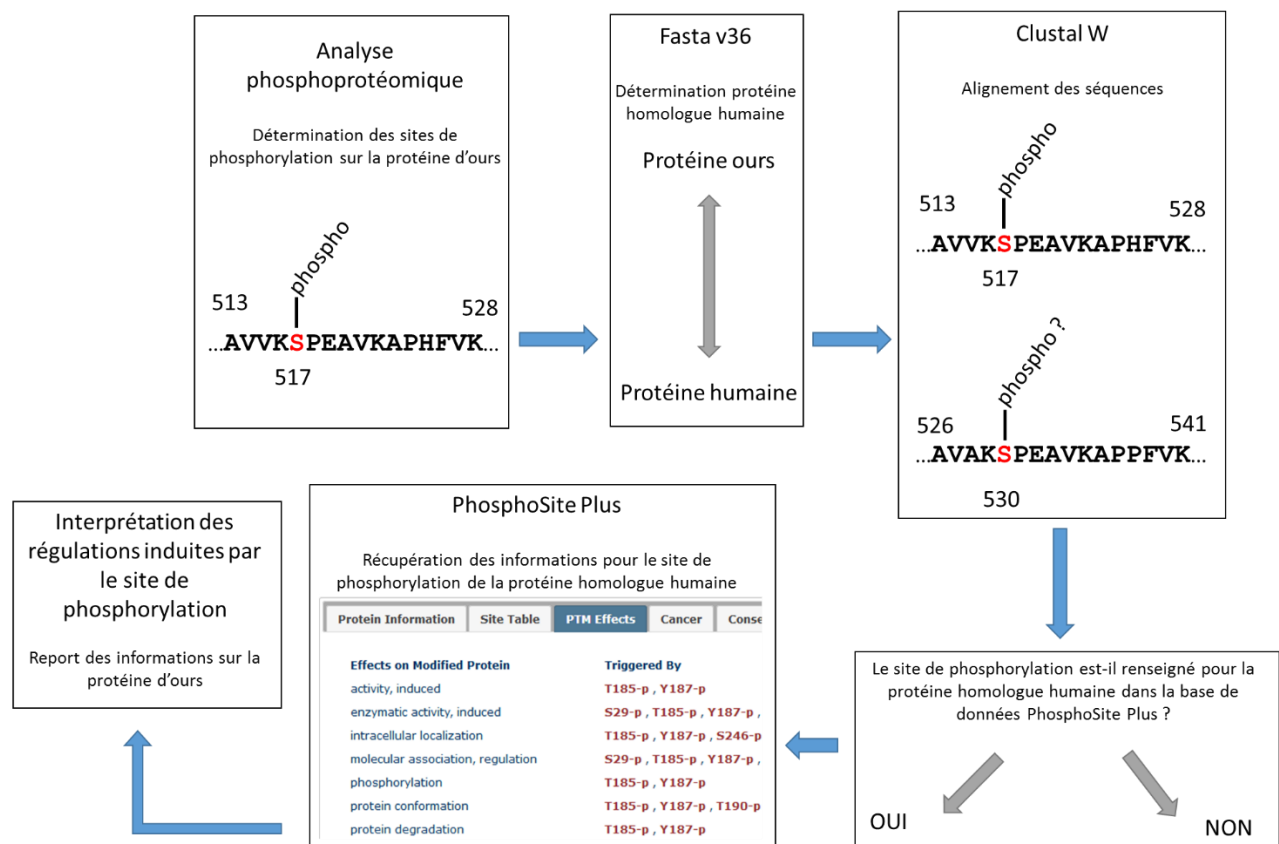


Figure 23 : Schématisation de la procédure pour déterminer les effets d'un site de phosphorylation identifié par spectrométrie de masse sur une protéine d'ours brun. Dans un premier temps, la protéine homologue humaine est déterminée (algorithme Fasta 36), puis les séquences des protéines sont alignées (algorithme Clustal W). Si le site de phosphorylation identifiée sur la protéine d'ours brun correspond à un site de phosphorylation sur la protéine homologue humaine, et s'il est renseigné dans la base de données

## || Partie 2 – Chapitre 1 : Développements bioinformatiques pour l'étude d'espèces « exotiques » par spectrométrie de masse

*PhosphoSitePlus, ces informations seront extraites permettant de comprendre les régulations induites par ce site de phosphorylation sur la protéine d'ours brun.*

A l'heure actuelle, la validation de cette méthode n'est pas encore terminée et nécessite encore des développements.



*Crédit photo : Dr Fabrice BERTILE*

## Chapitre 2 - Développement de stratégies analytiques appliquées à l'étude d'échantillon d'ours brun

### **Collaborations :**

- Les équipes du « Scandinavian Brown Bear Research Project » (<https://bearproject.info/>)
- Dr Etienne Lefai (Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, St Genès Champanelle, France)
- Dr Stéphane Blanc (Université de Strasbourg, CNRS, IPHC, Strasbourg, France)
- Prof. Kenneth Storey (Université Carleton, Département de Biologie, Ottawa, Canada)
- Dr Elin Kure (University Hospital, Department of Cancer Genetics, Institute for Cancer Research, Oslo, Norway)



## Chapitre 2 – Développement de stratégies analytiques appliquées à l'étude d'échantillon d'ours brun

Nous avons tout d'abord voulu explorer les régulations du protéome musculaire et du tissu adipeux chez l'ours brun hibernant, comparé à l'ours brun actif. Pour cela, des stratégies quantitatives complémentaires par spectrométrie de masse (SDS PaGE-XIC et 2D-DIGE-MS) ont été mises en place.

Par ailleurs, le dosage d'hormones circulantes n'ayant pu aboutir avec l'utilisation de la méthode ELISA, une méthode de microLC-SRM a été développée permettant de quantifier l'adiponectine circulante dans le sérum d'ours brun.

En parallèle, l'étude par spectrométrie de masse a été appliquée pour caractériser le cargo protéique d'exosomes sériques, mais également pour identifier les protéines présentes dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de l'ours brun.

De plus, les modifications post-traductionnelles (et plus précisément la phosphorylation) sont connues pour réguler l'activité, la localisation cellulaire ou encore la durée de demi-vie des protéines. Caractériser les changements dans le phosphoprotéome musculaire (i.e. identification des sites de phosphorylations des protéines) pourrait aboutir à une meilleure appréhension des mécanismes impliqués dans la préservation musculaire chez l'ours brun. Nous avons alors mis en place des développements dans la préparation d'échantillons musculaires pour une analyse de phosphoprotéomique.

## 1. Des approches complémentaires de protéomique quantitative pour explorer les régulations du protéome musculaire et du tissu adipeux de l'ours brun hibernant

Etudier les changements du protéome dans le muscle squelettique de l'ours brun hibernant vs actif, permettrait de mieux appréhender les régulations mises en place pour préserver son intégrité musculaire (masse et force). Durant l'hibernation, il a été démontré que le métabolisme des carbohydrates était minoritaire pour l'ours noir hibernant [178]. Par ailleurs, le niveau d'expression des gènes liés au catabolisme lipidique était inchangé entre la phase hibernante et la phase active de l'ours noir américain [179], tandis qu'une seconde étude a mis en évidence une augmentation de l'expression des gènes liés au catabolisme des acides gras dans le muscle squelettique de l'ours noir japonais, ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes liés à la glycolyse, la lipogenèse et le catabolisme des acides aminés [180].

L'analyse par spectrométrie de masse est aujourd'hui largement considérée pour caractériser le protéome [181]. Les extraits protéiques d'un tissu présentent un important niveau de complexité dû au nombre d'espèces protéiques et aux différentes concentrations de chacune de ces espèces [182]. Afin de dépasser cette contrainte et d'augmenter la couverture du protéome, il est possible de mettre en place une ou plusieurs étapes de décomplexification lors de la préparation de l'échantillon protéique. Dans ce but, nous avons choisi d'appliquer une première méthode de décomplexification en 5 bandes protéiques sur gel SDS PaGE avant une quantification des protéines par spectrométrie de masse (stratégie SDS PaGE-XIC). En parallèle, les échantillons ont été plus largement décomplexifiés avec une séparation en deux dimensions (stratégie 2D-DIGE) et les spots protéiques présentant une intensité significativement différente entre la phase hibernante et la phase active (étape de quantification) ont été excisés. Les

protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse (stratégie 2D-DIGE-MS). Cette double approche quantitative complémentaire a été appliquée à l'étude du muscle squelettique et du tissu adipeux de l'ours brun, en comparant la phase hibernante à la phase active (Figure 24).

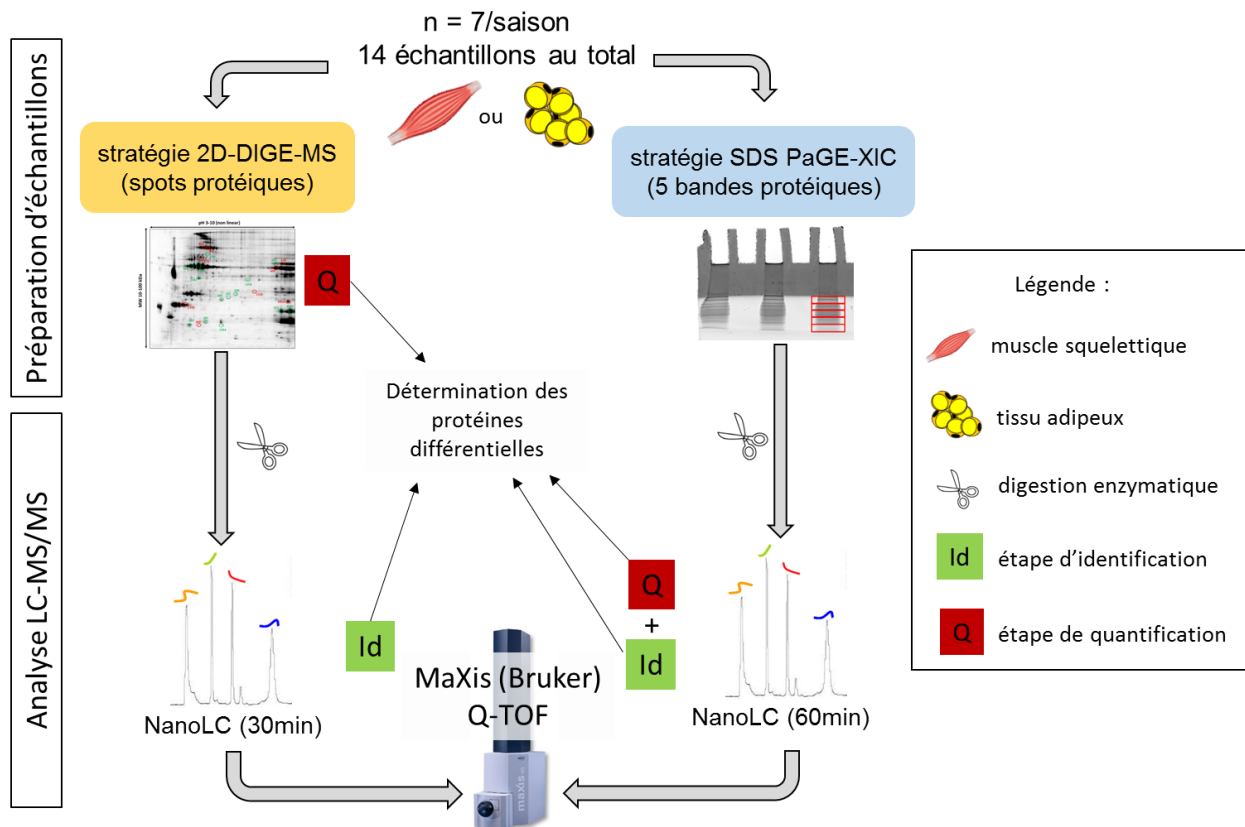


Figure 24 : Schématisation de la stratégie analytique mise en place pour bénéficier de la complémentarité de la stratégie quantitative 2D-DIGE-MS et de la stratégie SDS PaGE-XIC, pour la détermination des protéines différentiellement abondantes entre la période hivernale (hibernation) et la période estivale (phase active) pour le muscle squelettique et le tissu adipeux chez l'ours brun.

Grâce à l'interprétation des données obtenues par spectrométrie de masse sur le muscle squelettique de l'ours brun, nous avons déterminé les fonctions biologiques dans lesquelles les protéines différentielles étaient impliquées (Figure 25).

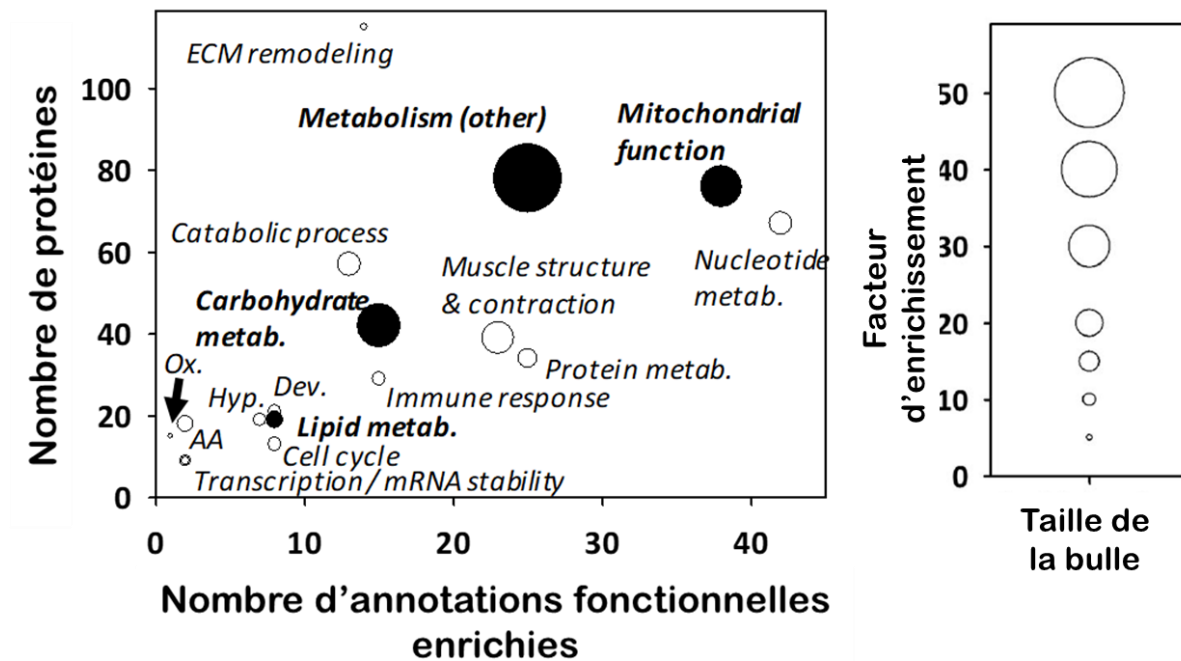


Figure 25 : Résultat du calcul d'enrichissement en annotations fonctionnelles sur les protéines musculaires différemment exprimées entre la phase hibernante et la phase active. ECM : Matrice ExtraCellulaire ; Hyp : réponse à l'Hypoxie ; Ox. Stress : réponse au stress oxydant. Les bulles colorées en noir sont liées au métabolisme musculaire des substrats énergétiques.

Parmi les 15 fonctions majoritairement régulées, nous avons mis en évidence une régulation du métabolisme et de la réponse au stress oxydant. Nous avons donc choisi de nous focaliser sur ces fonctions et les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

a. Analyse du protéome du muscle squelettique de l'ours brun hibernant comparé à l'ours actif

**Matériels et méthodes**

Les protocoles de préparation d'échantillons et le traitement des données sont disponibles dans la partie « *Methods* » de la publication « *Metabolic reprogramming involving glycolysis in the hibernating brown bear skeletal muscle* » (page 146 à 166) [183].

**Résultats et interprétation des analyses LC-MS/MS obtenues sur le muscle squelettique**

- ❖ Contrôles qualités : suivi des temps de rétention (peptides) et des intensités MS (protéines) pour les injections répétées de l'échantillon de référence

Un échantillon de référence a été constitué à partir de quantités de protéines équivalentes de l'ensemble des extraits protéiques individuellement analysés. Cet échantillon a été traité comme les extraits protéiques individuels et a été analysé régulièrement sur l'ensemble de la durée des analyses des échantillons. Les temps de rétention de 11 peptides de la protéine GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), une protéine de ménage, identifiés dans au moins 8 des 10 analyses de l'échantillon de référence, ont été suivis (Figure 26). Le coefficient de variation médian des temps de rétention calculé de 3.3%, a démontré une excellente stabilité de notre système chromatographique.

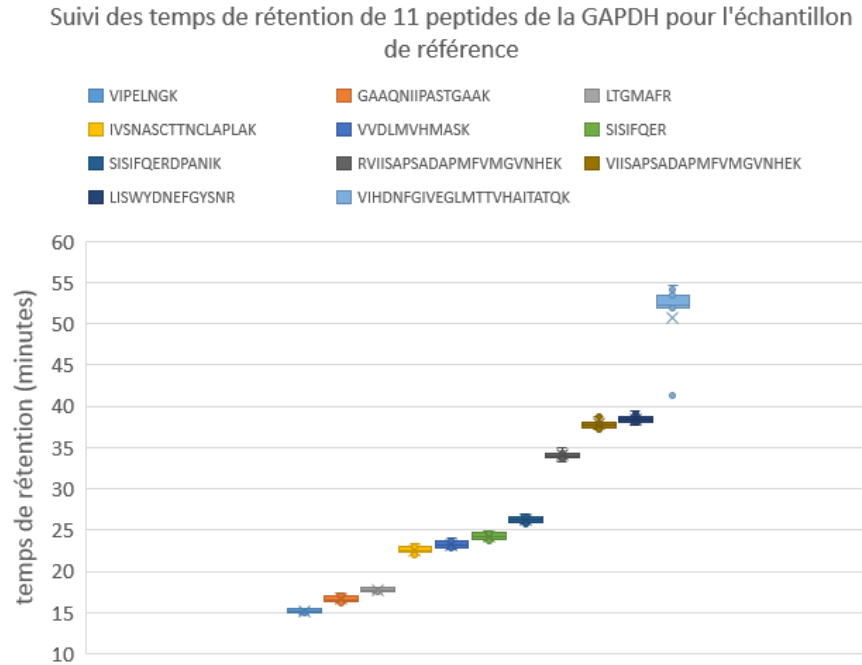


Figure 26 : Suivi des temps de rétention de 11 peptides issus de la digestion enzymatique de la protéine GAPDH dans les analyses de l'échantillon de référence.

Par ailleurs, le coefficient de variation médian sur les intensités LFQ (*Label-Free Quantification*) de l'ensemble des protéines quantifiées dans au moins 8 analyses de l'échantillon de référence a été évalué à 25%, démontrant la reproductibilité de la détermination des abondances protéiques.

#### ❖ Résultats de la stratégie SDS PaGE-XIC pour l'analyse du protéome du muscle squelettique

Les 5 bandes protéiques issues de la décomplexification sur gel SDS PaGE de chaque échantillon ont été analysées par LC-MS/MS. 725 protéines ont été identifiées dont 538 protéines ont été quantifiées. 383 protéines présentant des mesures d'intensités reproductibles entre les répliques de préparation et les répliques d'injection ont été conservées, dont 146 protéines musculaires étaient différentiellement exprimées entre la phase hibernante et la phase active. 67

protéines différentielles présentaient une abondance plus faible en phase hibernante qu'en phase active et 79 protéines présentaient une abondance plus élevée en phase hibernante.

❖ Résultats de la stratégie 2D-DIGE-MS pour l'analyse du protéome du muscle squelettique

Sur l'ensemble des gels 2D-DIGE, 28 spots protéiques ont été quantifiés avec des intensités de fluorescence statistiquement différentes entre la phase hibernante et la phase active. Seuls 9 des spots protéiques différentiels présentaient une intensité moins importante durant la phase hibernante comparée à la phase active. Après excision, l'analyse LC-MS/MS des spots différentiels a permis d'identifier 62 protéines dont 47 protéines ont été définies comme protéines majoritaires. Les protéines majoritaires sont les protéines identifiées avec un plus grand nombre de peptides comparé à l'ensemble des protéines identifiées dans le spot. Le nombre de peptides théoriques attendus a également été pris en compte pour déterminer les protéines majoritaires : plus la protéine a été identifiée avec une grande proportion de peptides, comparé au nombre de peptides théoriques, plus la protéine est considérée comme majoritaire.

❖ Résultats des deux approches quantitatives pour l'analyse du muscle squelettique

Seulement 8 protéines différentielles ont été communément identifiées entre les deux stratégies avec des différences d'abondance entre la phase hibernante et la phase active identiques entre les deux approches, démontrant la complémentarité et la robustesse des deux approches quantitatives.

Après un calcul d'enrichissement en annotations fonctionnelles à partir des protéines différentielles obtenues avec les deux stratégies, 15 fonctions biologiques majoritairement régulées entre la phase hibernante et la phase active ont été mises en évidence (Figure 25).

### **Résultats 1 : Régulations du métabolisme énergétique dans le muscle squelettique de l'ours brun hibernant**

Dans un premier temps, nous avons choisi de nous focaliser sur les régulations protéiques impliquées dans le métabolisme musculaire des substrats énergétiques. Les voies métaboliques et les voies de signalisation dans lesquelles étaient impliquées des protéines différentielles ont été visualisées sur les cartes de la base de données *KEGG* grâce à l'algorithme présenté en page 66. La majorité des protéines dont les abondances étaient moins importantes en phase hibernante étaient impliquées dans les voies d'oxydation des substrats lipidiques (beta-oxydation des lipides), du cycle de Krebs et de la respiration mitochondriale, suggérant une diminution de l'oxydation des lipides durant l'hibernation. Bien que l'oxydation des substrats lipidiques reste préférentielle, la glycolyse (consommation des carbohydrates) semble également maintenue dans le muscle squelettique des ours hibernants. Le glucose, alimentant la glycolyse, pourrait provenir du foie où le glucose serait obtenu grâce à la néoglucogenèse. Or il a été démontré que l'expression de gènes de protéines impliquées dans la néoglucogenèse était augmentée dans le foie d'ours hibernants [184] suggérant une augmentation de la néoglucogenèse hépatique. Le glucose pourrait également être obtenu à partir des réserves de glycogène musculaire, qui sont plus importantes dans le muscle squelettique des ours hibernants comparées aux réserves dans le muscle d'ours actif [183].



Il a été démontré que le contenu en glycogène des muscles squelettiques de souris était plus élevé après une alimentation riche en acides gras omega 3, comme l'acide docosahexaénoïque (DHA) [185]. De plus, un régime riche en DHA induit l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'absorption de glucose dans le muscle squelettique des souris [186]. Or chez l'ours brun hibernant, le niveau de DHA circulant est plus élevé, comparé au niveau chez l'ours brun actif. Sachant qu'une alimentation riche en DHA protège contre la perte musculaire, il est probable que les acides gras omega 3 (DHA) soient impliqués dans la préservation musculaire de l'ours brun durant l'hibernation.

## **Résultats 2 : Régulations du stress oxydant dans le muscle squelettique de l'ours brun hibernant**

D'autre part, l'exploitation des données obtenues par spectrométrie de masse (Figure 25), combinée à des mesures complémentaires, ont mis en évidence des régulations impliquées dans la réponse au stress oxydant. Succinctement, par RT-qPCR, il a été démontré que l'expression des transcrits des protéines CIRBP et RBM3 (i.e. gènes dont l'expression est induite en réponse à une hypothermie modérée) était plus importante lors de l'hibernation et cela pourrait permettre de limiter le stress oxydant dans le muscle squelettique de l'ours hibernant. Par ailleurs, l'abondance de protéines de la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale est significativement diminuée dans le muscle des ours hibernants, ce qui pourrait favoriser la diminution de la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène). De plus, l'expression d'enzymes antioxydantes, de protéines du système glutathion et de protéines HSP était augmentée dans le muscle squelettique d'ours brun hibernant, ce qui pourrait procurer une protection accrue contre les effets délétères des radicaux libres. Les dommages oxydatifs sur les lipides et l'ADN ne sont pas significativement

plus importants dans les échantillons d'ours hibernants. En revanche, les dommages oxydatifs sur les protéines sont significativement plus importants pour les échantillons d'ours hibernants ce qui pourrait être dû à une réduction de l'élimination des protéines durant l'hibernation. Enfin, l'expression de la protéine NRF2 (un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress oxydant en régulant l'expression d'enzymes antioxydantes) était significativement plus importante dans les échantillons provenant d'ours bruns hibernants. L'ensemble de ces mécanismes permettrait de diminuer le stress oxydant dans le muscle squelettique de l'ours brun hibernant. Or, il a déjà été démontré que le stress oxydant est directement responsable d'une inhibition de la synthèse protéique ainsi que d'une augmentation de la protéolyse dans les muscles squelettiques, ce qui favoriserait le développement de l'atrophie musculaire [187]. De ce fait, en diminuant le stress oxydant, l'intégrité des protéines musculaires serait préservée permettant le maintien des muscles squelettiques de l'ours brun durant l'hibernation. Ces résultats ont fait l'objet d'une rédaction d'article sur la réponse au stress oxydant du muscle squelettique de l'ours brun hibernant qui est en cours de révision dans le journal *Antioxidants* (pages 167 à 183).

### **Conclusions pour l'analyse du muscle squelettique de l'ours hibernant**

L'analyse par spectrométrie de masse du protéome du muscle squelettique de l'ours brun hibernant et de l'ours brun actif par une double approche quantitative, a permis d'obtenir une couverture du protéome plus importante que par l'emploi d'une seule des deux méthodes quantitatives. De plus, la similarité des régulations d'abondances des protéines communément identifiées et quantifiées entre l'approche SDS PaGE-XIC et l'approche 2D-DIGE-MS démontre la robustesse de notre stratégie analytique. Ainsi, nous avons mieux caractérisé les régulations

métaboliques mises en place (maintien de la glycolyse et diminution de la lipolyse), et la réponse au stress oxydant dans le muscle squelettique de l'ours brun durant l'hibernation.

### **Perspectives : régulation de la balance protéique dans le muscle squelettique de l'ours brun hibernant**

Les données obtenues par spectrométrie de masse sur le muscle squelettique de l'ours brun vont également être exploitées afin de déterminer les régulations de protéines impliquées dans la balance protéique (i.e. synthèse et dégradation des protéines). L'objectif est de déterminer si la balance protéique est régulée de telle sorte à ce que la masse musculaire de l'ours brun soit préservée grâce à une préservation du contenu protéique. Ces résultats seront valorisés par la rédaction d'une publication.

#### **b. Analyse du protéome du tissu adipeux de l'ours brun hibernant comparé à l'ours actif**

Le métabolisme du tissu adipeux de l'ours hibernant a été peu caractérisé. Il a néanmoins été démontré chez l'ours noir japonais que l'expression des gènes liés à la glycolyse, la lipogenèse et le catabolisme des acides aminés était significativement diminués dans le tissu adipeux [180].

Dans le paragraphe précédent, nous avons présenté les résultats obtenus sur le protéome musculaire de l'ours brun grâce à l'utilisation d'une double approche combinant une stratégie SDS PaGE-XIC et une stratégie 2D-DIGE-MS. De la même manière, nous avons appliqué cette stratégie analytique pour caractériser le protéome du tissu adipeux d'ours brun hibernants et actifs (n=6). Les protocoles de préparation d'échantillons et d'analyse des données sont identiques à ceux mis en place dans l'analyse du muscle squelettique de l'ours brun [183].

## Résultats et interprétation des analyses LC-MS/MS obtenues sur le tissu adipeux

- ❖ Contrôles qualités : suivi des temps de rétention (peptides) et des intensités MS (protéines) pour les injections répétées de l'échantillon de référence

Un échantillon de référence a été constitué à partir de quantités de protéines équivalentes de l'ensemble des extraits protéiques individuellement analysés. Cet échantillon a été traité comme les extraits protéiques individuels et a été analysé régulièrement sur l'ensemble de la durée des analyses des échantillons. Les temps de rétention de 9 peptides de la protéine beta-actine, une protéine de ménage, identifiés dans au moins 7 des 9 analyses de l'échantillon de référence, ont été suivis (Figure 27). Le coefficient de variation médian des temps de rétention a été calculé à 2.1%, démontrant une excellente stabilité de notre système chromatographique.

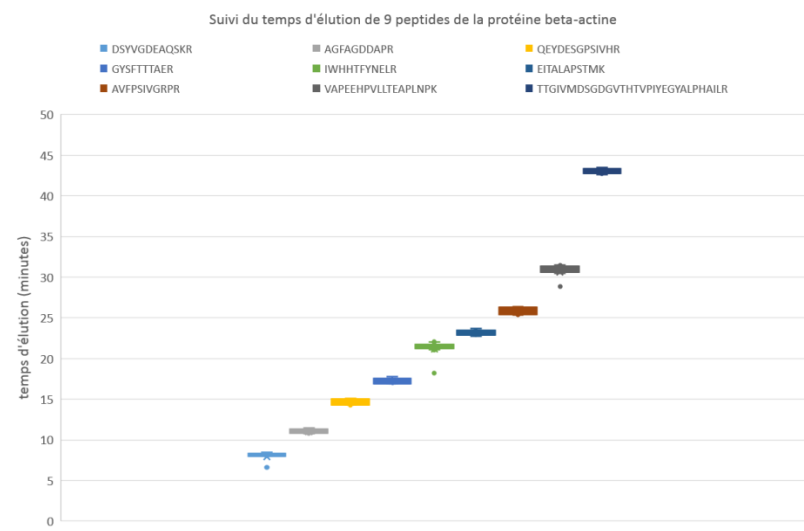


Figure 27 : Suivi des temps de rétention de 9 peptides issus de la digestion enzymatique de la protéine beta-actine dans les analyses de l'échantillon de référence

Par ailleurs, le coefficient de variation médian sur les intensités LFQ (*Label-Free Quantification*) de l'ensemble des protéines quantifiées dans au moins 7 analyses de l'échantillon de référence a été évalué à 23.1%, démontrant la reproductibilité de la détermination des abondances protéiques.

#### ❖ Résultats de la stratégie SDS PaGE-XIC pour l'analyse du protéome du tissu adipeux

Le traitement de ces données a été réalisé avec le logiciel MaxQuant (constitué des algorithmes *Andromeda* et *MaxLFQ*) avec des paramètres identiques à ceux présentés dans la publication *Chazarin et al., 2019* (pages 146 à 166). 1306 protéines ont été identifiées sur l'ensemble des 5 bandes protéiques obtenues sur gel SDS PaGE, 717 protéines ont été quantifiées de manière robuste. Les cas des protéines présentes dans une condition et absentes de la seconde condition ont été conservées (i.e. « cas présent/absent ») : 21 protéines absentes de la condition « active » et 14 protéines absentes de la condition « hibernante ». Les protéines différentielles

entre les deux conditions ont été statistiquement mises en évidence sur la base des médianes des intensités LFQ (*Label-Free Quantification*) des triplicats d'injection. Après validation de la distribution des données selon une loi normale (Shapiro test ;  $p\text{-value} > 0.01$ ) ; de l'égalité des variances (Bartlett test ;  $p\text{-value} > 0.01$ ) et d'une différence significative des valeurs d'intensités médianes entre les deux conditions (T-test apparié ;  $p\text{-value} < 0.05$ ), 173 protéines différentielles ont été identifiées entre la phase hibernante et la phase active (dont 35 cas présent/absent).

❖ Résultats de la stratégie 2D-DIGE-MS pour l'analyse du protéome du tissu adipeux

L'analyse densitométrique des gels 2D-DIGE a mis en évidence 44 spots protéiques différentiels (Bartlett test :  $p\text{-value} > 0.01$  ; Shapiro test :  $p\text{-value} > 0.01$  et T-test :  $p\text{-value} < 0.05$ ) (Figure 28) entre la phase hibernante et la phase active, qui ont été excisés pour une analyse LC-MS/MS. Les protéines ont été identifiées grâce au logiciel Mascot et les identifications protéiques ont été validées grâce au logiciel Proline. Les paramètres utilisés pour ces deux logiciels sont identiques à ceux présentés dans la publication *Chazarin et al.*, 2019 (pages 146 à 166). 103 protéines ont été identifiées sur l'ensemble des spots protéiques, dont 32 protéines ont été déterminées comme majoritaires avec la stratégie présentée en page 85.

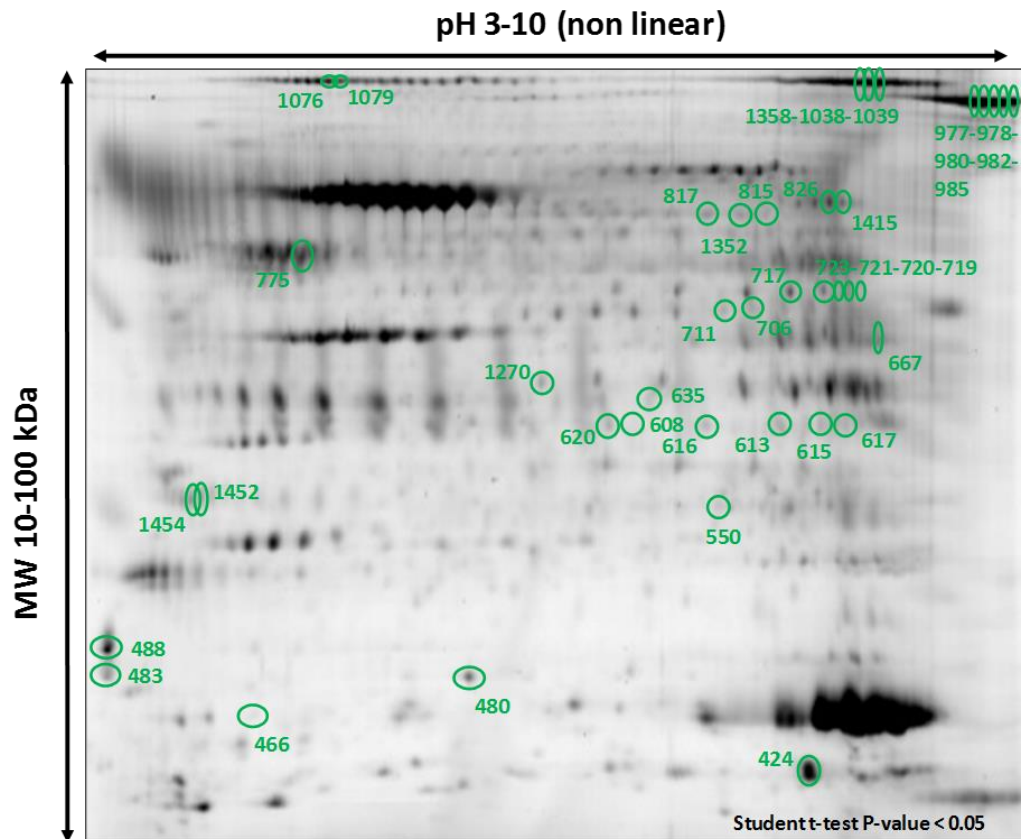


Figure 28 : Spots protéiques différentiels obtenus pour l'analyse 2D-DIGE du tissu adipeux de l'ours brun. Les tests statistiques des valeurs de densitométrie ont permis de mettre en évidence les spots protéiques différentiels T-test,  $p\text{-value} < 0.05$ .

#### ❖ Résultats des deux approches quantitatives pour l'analyse du tissu adipeux

La majorité des protéines (93%) a été identifiée uniquement avec l'une ou l'autre des stratégies, confirmant la complémentarité de cette double approche. 258 protéines différentielles ont été identifiées, dont 18 protéines communes aux deux stratégies (Figure 29).

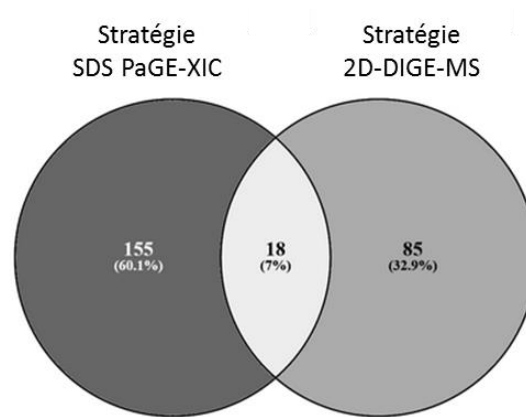


Figure 29 : Taux de recouvrement pour les protéines différentielles identifiées entre l'approche SDS PaGE-XIC et 2D-DIGE-MS

16 des 18 protéines différentielles communes ont été quantifiés avec des facteurs de changement en abondance protéiques (FC) similaires entre les deux approches quantitatives (Table 3), démontrant la robustesse de la stratégie analytique.

Table 3 : Tableau récapitulatif des protéines différentielles communes à la stratégie SDS PaGE-XIC et à la stratégie 2D-DIGE-MS, et des facteurs de changement en abondance protéique (FC). Dans la première colonne sont inscrits les identifiants des protéines d'ours et la dernière colonne affirme (« Oui ») ou réfute (« Non ») la similarité des FC obtenus par les deux stratégies.

|        | SDS PaGE-XIC     | 2D-DIGE-MS       |                      |
|--------|------------------|------------------|----------------------|
|        | FC winter/summer | FC winter/summer | régulation similaire |
| D2H6L9 | 2.377            | 2.915            | Oui                  |
| D2H7B7 | 2.320            | 3.433            | Oui                  |
| D2H814 | 3.019            | 3.667            | Oui                  |
| D2H8Q9 | -1.709           | 2.504            | Non                  |
| D2HHZ6 | 2.326            | 3.340            | Oui                  |
| D2HM80 | 2.116            | 2.915            | Oui                  |
| D2HR59 | 3.737            | 3.327            | Oui                  |
| D2I061 | 1.511            | 3.943            | Oui                  |
| D2I1F1 | 1.420            | 2.296            | Oui                  |
| D2I266 | 1.786            | 6.304            | Oui                  |
| G1LB18 | 1.949            | 1.822            | Oui                  |
| G1LQL3 | -1.422           | 3.943            | Non                  |
| G1LRB0 | 2.257            | 2.406            | Oui                  |
| G1LVM5 | 1.582            | 1.667            | Oui                  |
| G1M424 | 2.599            | 3.069            | Oui                  |
| G1M910 | 1.686            | 2.403            | Oui                  |
| G1MAP8 | 1.890            | 3.433            | Oui                  |
| G1MGY6 | 1.838            | 3.493            | Oui                  |



Pour les protéines dont les FC sont différents entre les deux stratégies (D2H8Q9 et G1LQL3) il a été constaté dans la base de données *neXtProt* que les protéines homologues humaines (PRELP et HNRNPL, respectivement) pouvaient porter des modifications post-traductionnelles (PTM) comme la glycosylation, la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation. Cela pourrait induire des changements de potentiels isoélectriques ou de poids moléculaires de ces protéines, répartissant ces protéines sur différents spots protéiques dont des spots non-différentiels. Ainsi, une partie de ces protéines n'aurait pas été prise en compte dans la quantification par la stratégie 2D-DIGE-MS.

L'extraction des termes *Gene Ontology* pour l'ensemble des protéines différentielles a permis de réaliser un calcul d'enrichissement en annotations fonctionnelles mettant en évidence 16 fonctions biologiques régulées (Figure 30). Nous avons choisi de nous focaliser sur les différences d'abondance de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique (consommation de substrats lipidiques ou de carbohydrates) ou dans la lipolyse.

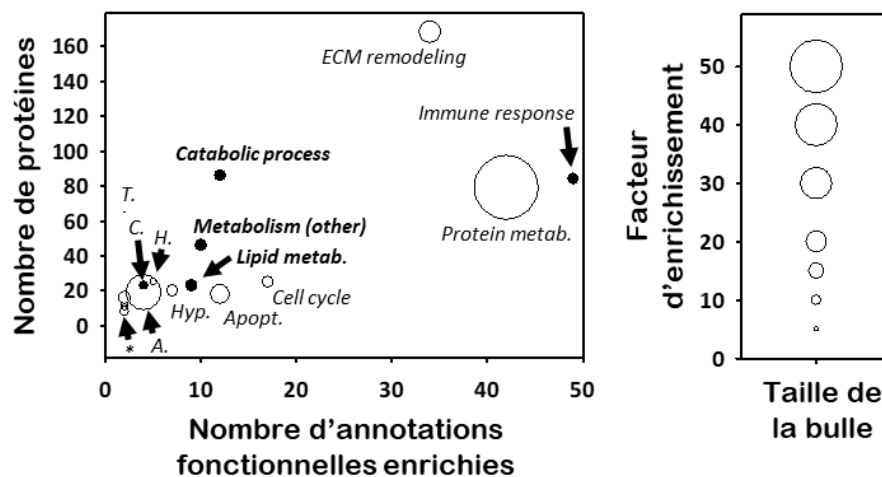


Figure 30: Résultats du calcul d'enrichissement en annotations fonctionnelles sur les protéines différenciellement exprimées dans le tissu adipeux, entre la phase hibernante et la phase active. ECM :

*matrice extracellulaire, Immune response : réponse immunitaire ; Protein metab. : métabolisme protéique ; Catabolic process : processus catabolique ; Lipid metab. : métabolisme lipidique ; Cell cycle : cycle cellulaire ; Apopt. : apoptose ; Hyp. : réponse à l'hypoxie ; C. : métabolisme des carbohydrates ; T. : transport ; H. : hématopoïèse ; \* : métabolisme des nucléotides, réponse au stress oxydant, transcription, métabolisme des acides aminés et régulation de la stabilité des ARNm.*

33 protéines impliquées dans le métabolisme énergétique du tissu adipeux ont été identifiées (Figure 31). Dans le détail, 7 protéines différentielles impliquées dans la glycolyse ont été quantifiées avec les deux stratégies avec des facteurs de changement d'abondance (FC) en accord avec une augmentation de l'expression de ces protéines durant la phase hibernante. Par ailleurs, 3 protéines différentielles impliquées dans la consommation de substrats lipidiques ont été quantifiées avec des abondance plus importantes en phase hibernante. Ces résultats démontrent que les régulations du métabolisme musculaire observées précédemment semblent spécifiques au muscle squelettique de l'ours brun.

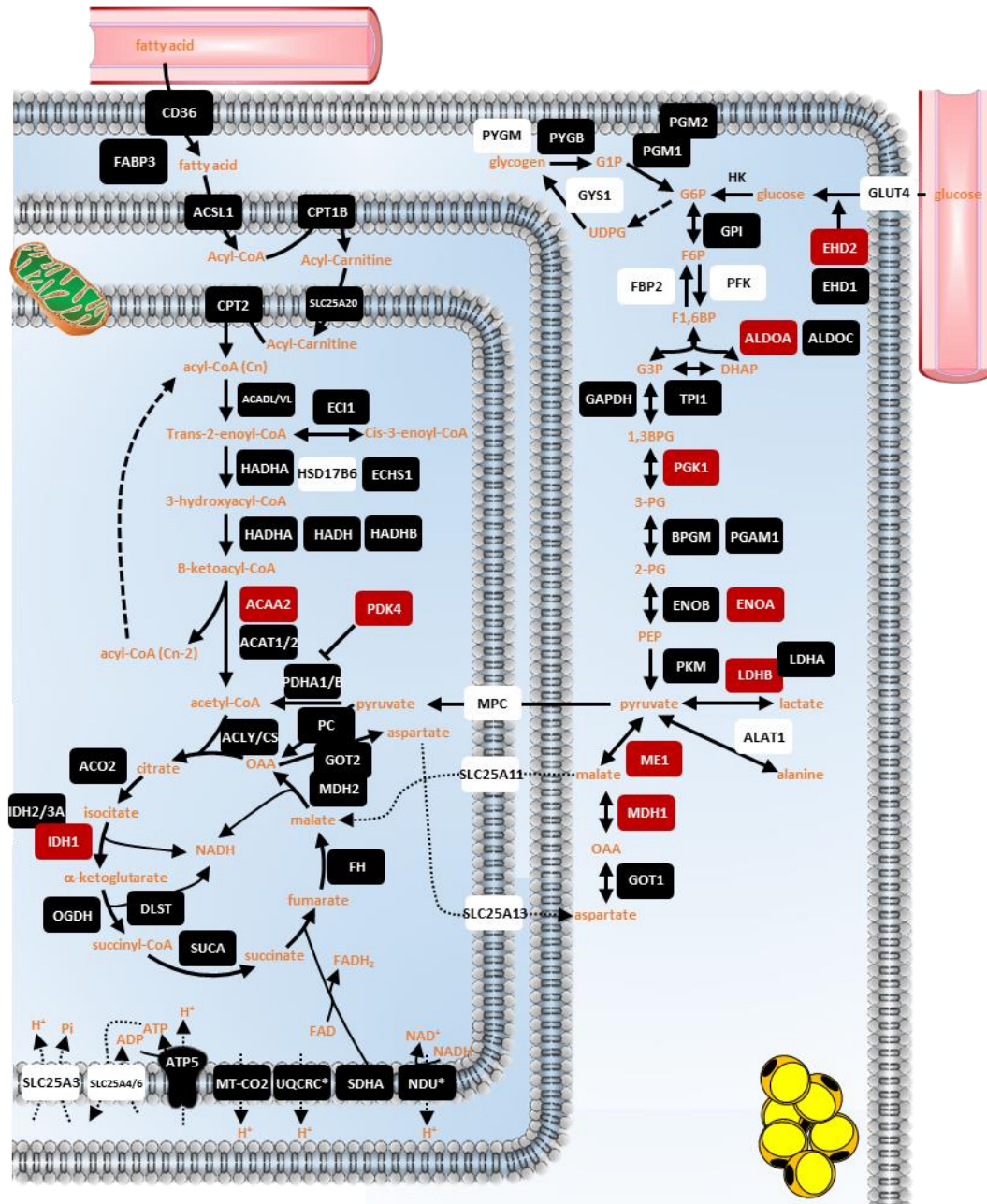


Figure 31 : Régulations des abondances de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique du tissu adipeux, avec la combinaison des deux stratégies analytiques. Les protéines dont l'abondance est augmentée durant la phase hibernante, comparée à la phase active, sont représentées par des encadrés rouge. Les protéines détectées mais dont le changement d'abondance n'était pas significatif sont représentées par des encadrés noir. Enfin, les encadrés blancs représentent des protéines qui n'ont pas été détectées par l'une ou l'autre des stratégies analytiques.

14 protéines impliquées dans la lipolyse ont été identifiées en combinant les résultats obtenus avec la stratégie SDS PaGE-XIC et la stratégie 2D-DIGE-MS. Parmi les protéines

identifiées, 11 protéines différentielles ont été identifiées entre la phase hibernante et la phase active, dont 7 protéines (PLIN1, PRKAR2A, MGL, GNAS1, FABP4, ADIPOQ et GNAI3) avec des facteurs de changement d'abondance (FC) plus importants entre la phase hibernante comparées à la phase active (FC compris entre +2.3 et +5.6) et 4 protéines (APOA1, RBP4, PPP1CA et PPP2R1A) avec des FC moins importants en phase hibernante comparée à la phase active (FC compris entre -1.3 et -1.7) (Figure 32).

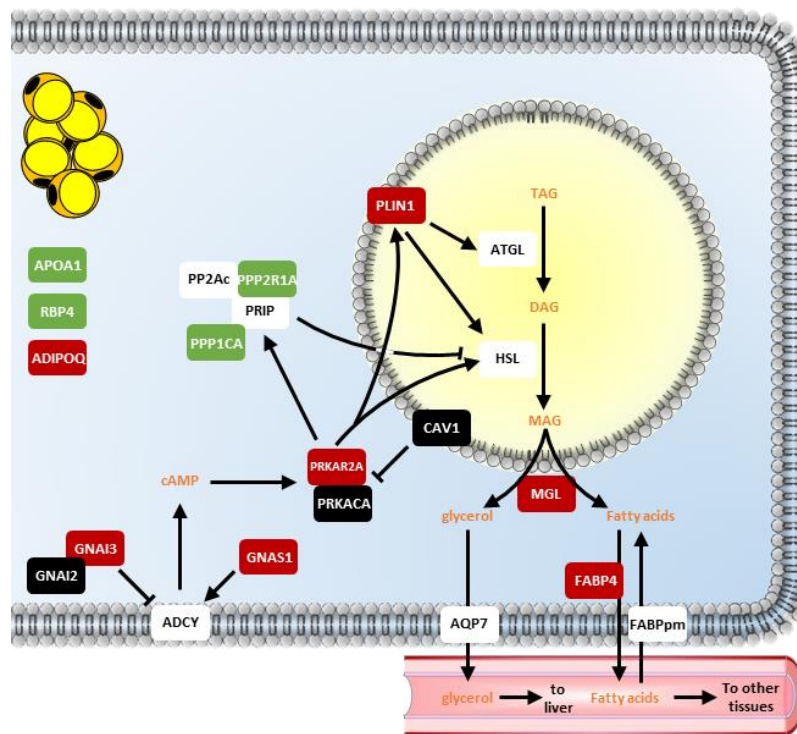


Figure 32 : Régulations des abondances de protéines impliquées dans la lipolyse du tissu adipeux, avec la combinaison des deux stratégies analytiques. Les protéines dont l'abondance est diminuée durant la phase hibernante, comparée à la phase active, sont représentées par des encadrés vert, tandis que les protéines dont l'abondance est augmentée sont représentées par des encadrés rouge. Les protéines détectées mais dont le changement d'abondance n'était pas significatif sont représentées par des encadrés noir. Enfin, les encadrés blancs représentent des protéines qui n'ont pas été détectées par l'une ou l'autre des stratégies analytiques.

Il a été démontré qu'en période d'hibernation, la source énergétique majeure du métabolisme est la consommation de substrats lipidiques pour l'ours noir [178], ce qui suggère

une augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux. Dans nos résultats, nous constatons effectivement une augmentation de l'abondance de protéines impliquées dans la lipolyse du tissu adipeux, durant l'hibernation de l'ours brun suggérant une libération plus importante d'acides gras libres dans le système sanguin. Nous avons réalisé un dosage des acides gras libres sur le sérum d'individus prélevés en phase hibernante et en phase active et montrant une concentration moyenne 4 fois plus élevée dans le sérum d'ours hibernant ( $0.36 \text{ mmol/L} \pm 0.12$ ) que dans le sérum d'ours actif ( $0.09 \text{ mmol/L} \pm 0.07$ ). Ces résultats sont en accord avec une augmentation de la libération d'acides gras libres par le tissu adipeux, *via* la lipolyse.

L'adiponectine (ADIPOQ), une hormone protéique synthétisée dans le tissu adipeux [188], a été retrouvée 2.8 fois plus exprimée dans le tissu adipeux de l'ours brun hibernant que celui de l'ours en période active, par l'approche SDS PaGE-XIC. L'adiponectine est capable d'inhiber la lipolyse dans les adipocytes [189] et d'augmenter l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique (via une augmentation de la sensibilité à l'insuline) [190]. De plus, il semble que l'adiponectine régule le maintien ou la perte de masse musculaire, selon la concentration à laquelle elle est présente [191]. Il serait donc intéressant, de doser la concentration d'adiponectine dans le sérum (i.e. adiponectinémie) de l'ours hibernant et de l'ours actif afin de mieux comprendre dans quelle mesure cette hormone pourrait participer à la régulation du métabolisme et du maintien de la masse musculaire. Pour cela, une méthode de quantification de l'adiponectine par spectrométrie de masse, avec une méthode LC-SRM, sera développée (page 101).

## **Conclusions pour l'analyse du tissu adipeux de l'ours hibernant**

L'analyse par spectrométrie de masse du protéome du tissu adipeux de l'ours brun hibernant et de l'ours brun actif par une double approche quantitative, a permis d'obtenir une couverture du protéome plus importante que par l'emploi d'une seule des deux méthodes quantitatives. De plus, la similarité des régulations d'abondances des protéines communément identifiées et quantifiées entre l'approche SDS PaGE-XIC et l'approche 2D-DIGE-MS démontre la robustesse de notre stratégie analytique. Par ailleurs, les régulations observées dans le tissu adipeux ne reproduisent pas celles mises en évidence pour le muscle squelettique, démontrant que ces dernières sont bien spécifiques. Les résultats obtenus pour le tissu adipeux seront approfondis dans les mois à venir et seront valorisés dans une publication.

## 2. Développement d'une méthode microLC-SRM pour quantifier l'adiponectine dans le sérum d'ours

### Contexte

Lors de la caractérisation du protéome du tissu adipeux de l'ours brun par la double approche quantitative (résultats présentés ci-dessus), il a été mis en évidence que l'abondance de l'adiponectine, une hormone protéique, était plus importante durant l'hibernation comparée à la phase active. L'adiponectine est une hormone produite majoritairement par le tissu adipeux [188] et dont le niveau d'expression est intrinsèquement lié à la masse corporelle d'un individu. En effet, chez l'homme, il a été constaté que la concentration sanguine en adiponectine était moins importante chez des sujets obèses [192]. Or, avant l'hibernation, les ours entrent dans une phase d'hyperphagie entraînant une importante prise de poids [193], puis lors de l'hibernation, leurs masses corporelles diminuent progressivement jusqu'à 40% de perte [194] dont la majeure partie est du tissu adipeux. De plus, la concentration plasmatique d'adiponectine est plus élevée pour des hommes pratiquant un jeûne de longue durée [195]. Par ailleurs, l'adiponectine est impliqué dans le maintien de la température corporelle, comme cela a été démontré chez des souris dont la température corporelle ne pouvait pas être maintenue en inhibant l'expression du gène de l'adiponectine [196]. Cette hormone pourrait également être en partie responsable du maintien de la température corporelle chez l'ours brun hibernant. Enfin, l'adiponectine est une hormone capable de sensibiliser l'organisme à l'insuline endogène [197] et d'augmenter l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique (via une augmentation de la sensibilité à l'insuline) [190]. Il est donc possible que la concentration d'adiponectine dans le sang soit largement régulée par

le cycle saisonnier de l'ours brun, avec une concentration plus importante pendant l'hibernation comparé à la phase active.

Le niveau d'adiponectine circulante a déjà été mesuré en concentration plus importante dans le sérum de grizzly captifs [198] et dans le sérum d'ours noir américain [199] par méthode ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Cependant, par spectrométrie de masse (stratégie SRM), les protéines de faible concentration (comme l'adiponectine) peuvent être quantifiées de manière plus sensible et avec une spécificité supérieure, puisque la quantification de la protéine est réalisée sur plusieurs peptides, contrairement à la méthode ELISA où la quantification est basée sur la détection d'un seul épitope. Enfin, une très bonne corrélation a été observée entre la méthode SRM et des méthodes de quantifications reconnues (comme le dosage ELISA par exemple [200]). Une méthode d'analyse microLC-SRM a donc été développée pour quantifier le niveau d'adiponectine circulante dans le sérum d'ours brun. Dans ce paragraphe, seul le développement de la méthode est présenté tandis que les mesures d'adiponectinémie sur des ours bruns hibernants et actifs seront réalisées dans les mois à venir.

## **Matériels et méthodes : construction de la librairie spectrale, préparation des échantillons et optimisation des paramètres d'acquisition en microLC-SRM**

- **Sélection des peptides protéotypiques de l'adiponectine**

Les peptides sélectionnés étaient protéotypiques, c'est-à-dire que leurs séquences n'ont été identifiées que pour l'adiponectine, sur l'ensemble des protéines de la base de données *UniProt* de l'ours brun. Par ailleurs, leurs séquences n'incluaient ni site de clivage spécifique à la trypsine, ni résidus méthionines ou cystéines. Les mêmes séquences peptidiques ont été



identifiées pour la protéine humaine homologue et en consultant la base de données *PeptideAtlas* [165] il a été constaté que ces peptides étaient facilement détectables, avec un ESS supérieur à 0.33 (*Empirical Suitability Score*). Finalement, 5 peptides protéotypiques de l'adiponectine de l'espèce *Ursus arctos arctos* ont été sélectionnés pour l'analyse microLC-SRM : GDTGETGVTGVEGPR ; GEPGESAYVYR ; IFYNLQNHYDGTGK ; SAFSVGLESR et VTVPNVPIR. Les peptides ont été synthétisés avec un marquage isotopique en C-terminal : les lysines (K) ont été remplacées par des lysines marquées (K\* ; U-13C6, U-15N2) et les arginines (R) ont été remplacées par des arginines marquées (R\* ; U-13C6, U-15N4) (société JPT).

- **Construction de la librairie spectrale à partir des peptides marqués synthétisés**

Des échantillons de référence contenant 5, 15 ou 25 fmol de chaque peptide marqué ont été analysés pour construire la librairie spectrale. Ils ont été analysés sur un système UPLC (NanoAcquity, Waters) couplé à un Q-Exactive Plus (Thermo Scientific), avec débit de 450nl/min, un gradient d'élution de 1 à 35% de solution acétonitrile, 0.1% acide formique ; sur 40 minutes. Les paramètres du spectromètre de masse étaient identiques à ceux décrits en page 131 à l'exception de la résolution MS qui a été augmentée à 140.000 ( $m/z$  200). L'identification des peptides a été réalisée grâce au logiciel Mascot (Matrix Science) contre à une banque de données ne contenant que la séquence de l'adiponectine de l'ours brun issue de la banque de données *UniProt*. Les paramètres de recherche étaient les suivants : un site de clivage manqué au maximum, modification fixe : carbamydométhylation des résidus cystéines, modifications variables : oxydation des résidus méthionine, marquage : 13C(6) 15N(2) (K) et 13C(6) 15N(4) (R), tolérance MS : 5 ppm et tolérance MS/MS : 0.07 Da. Les fichiers obtenus ont été chargés et

analysés grâce au logiciel Skyline (Sciex) et ont constitué la librairie spectrale qui a été utilisée par la suite pour déterminer les transitions à suivre (fragments à analyser pour chaque peptide) en comparant l'ordre relatif des intensités obtenu entre les transitions de chaque peptide marqué synthétisé avec celui obtenu pour les peptides endogènes.

- **Préparation des échantillons de sérum d'ours brun pour l'analyse microLC-SRM**

Les concentrations protéiques d'un sérum d'ours brun hibernant et d'un sérum d'ours brun actif ont été déterminées par dosage colorimétrique BCA (Bio-rad Protein Assay, Bio-Rad). 2mg de protéines sériques ont été conditionnés dans un tampon 8M Urée, 0.1M ammonium bicarbonate. Après l'ajout d'un agent réducteur (DTT, 12mM) et d'un agent alkylant (IAM 40mM), les protéines ont été digérées en solution avec de la trypsine sur la nuit à 37°C (ratio trypsine : protéines de 1 : 100). La digestion a été interrompue par ajout d'acide formique et le produit de digestion (peptides) a été concentré par extraction sur phase solide (*Solid Phase Extraction*, Sep-Pack 100mg). Les peptides ont été élués dans un volume de 600µL d'une solution contenant 60% ACN, 0.1% acide formique. Après évaporation des solvants, les peptides ont été solubilisés avec une solution aqueuse contenant 2% ACN, 0.1% acide formique. Les analyses microLC-SRM ont été réalisées sur 2µL d'échantillon (soit 3µg de peptides sériques). Les peptides ont été chargés sur une colonne d'enrichissement (Zorbax, C18, 1mmx17mm, 5µm ; Waters) à un débit de 50µL/min (100% H<sub>2</sub>O, 0.1% AF) durant 3 minutes. Ensuite les analytes ont été séparés sur une colonne séparative (Zorbax 300, C18, 0.3mm\*150mm, 3.5µm ; Waters), maintenue à 35°C, avec un gradient 2-50% sur 130minutes. Le TSQ Vantage (Thermo Scientific) a opéré en mode positif avec une pression de 1.5 mTorr pour le

gaz de collision (azote) et les résolutions du premier et du troisième quadripôle ont été fixées à 0.7Da.

- **Détermination des temps de rétention des peptides marqués synthétisés par analyse microLC-MS/MS**

Afin de déterminer les temps de rétention de chaque peptide, un échantillon de référence contenant 800fmol de chaque peptide marqué a été analysé sur le système microLC-SRM présenté ci-dessus. Après traitement des données grâce au logiciel Skyline, une fenêtre d'isolation de 10 minutes autour du temps de rétention a été sélectionnée pour chaque peptide.

- **Détermination des transitions à suivre grâce à l'analyse de l'échantillon de référence dans la matrice, sur le système microLC-SRM**

Un échantillon constitué de 3µg de peptides théoriques obtenus à partir des extraits protéiques du sérum d'ours blanc et de 800fmol de peptides marqués a été analysé sur le système microLC-SRM comme décrit ci-dessus. 6 transitions ont été suivies dans une fenêtre de temps de 10 minutes autour des temps de rétention déterminés auparavant. Après traitement des données grâce au logiciel Skyline, 4 transitions ont été conservées par peptides selon les critères suivants : les signaux de ces transitions ne sont pas interférés par d'autres signaux et l'ordre relatif des intensités de ces transitions est similaire à celui obtenu sur la librairie spectrale.

- **Détermination de l'énergie de collision optimale pour chaque transition grâce à l'analyse de l'échantillon de référence dans la matrice, sur le système microLC-SRM**

Grâce au logiciel Skyline, une méthode a été obtenue pour tester 5 énergies de collision : différence de 2V entre deux énergies de collision testées (appelé « pas ») et avec deux « pas » autour de l'énergie de collision optimale déterminée automatiquement par Skyline.

### **Résultats : détection de 4 peptides endogènes de l'adiponectine dans le sérum de l'ours brun**

Grâce aux optimisations mises en place (détermination de la fenêtre d'isolation, sélection des transitions à suivre et optimisation de l'énergie de collision), 4 peptides endogènes de l'adiponectine ont été détectés dans le sérum de l'ours brun hibernant et dans le sérum de l'ours brun actif par microLC-SRM. Pour chaque peptide, 4 transitions ont été suivies et l'ordre relatif de ces transitions a été respecté entre l'échantillon de référence seul ou ajouté à la matrice (i.e. peptides issus de la digestion des protéines sériques) (Figure 33).

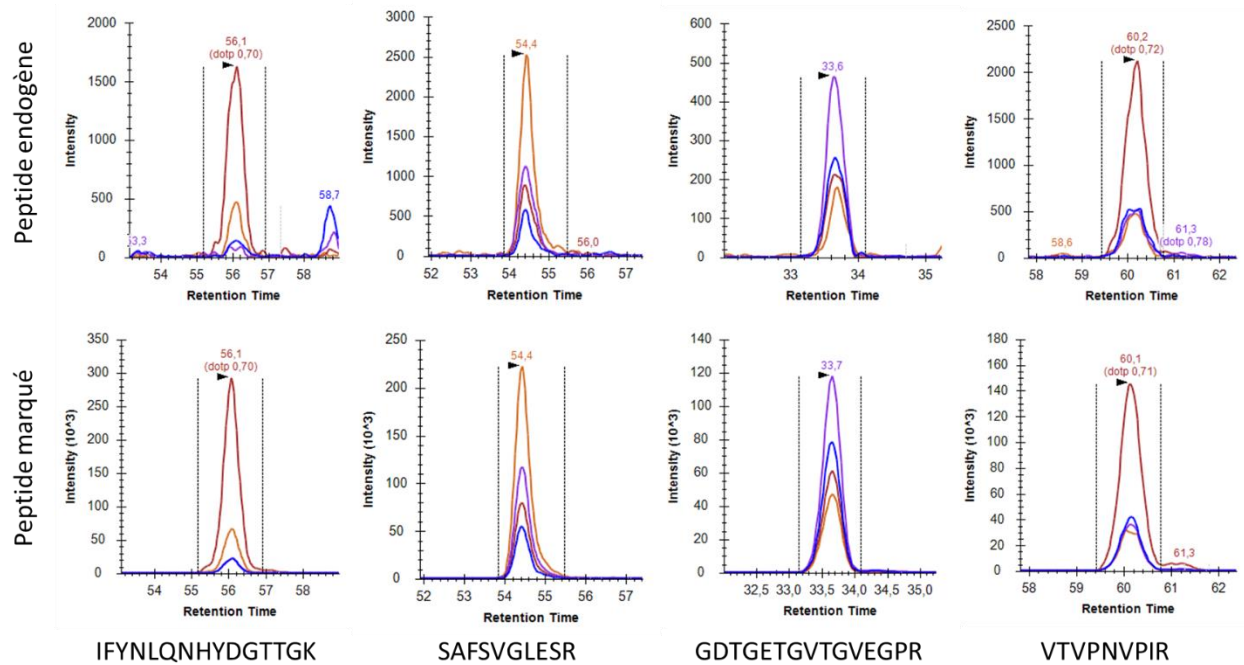


Figure 33 : Détection des 4 peptides de l'adiponectine ( IFYNLQNHYDGTGK ; SAFSVGLESR ; GDTGETGVTVGEPR et VTPNVPIR) endogènes dans le sérum d'ours brun hibernant (panel du haut) ou synthétisés (panel du bas) par microLC-SRM. Pour chaque peptide, 4 transitions ont été suivies (représentées par les différentes courbes de couleur sur chaque fenêtre). L'ordre et les intensités relatives des transitions étaient similaires pour un même peptide endogène et sa forme synthétique marquée.

L'analyse du sérum d'ours hibernant et du sérum d'ours actif a été réalisée avec notre méthode, afin de nous assurer que nous pouvions quantifier l'adiponectine, et ce indépendamment des éventuelles changement de concentration. Or les résultats préliminaires obtenus sont équivalents pour les deux sera, démontrant que cette méthode pourra être appliquée à l'étude d'une cohorte d'échantillons sériques provenant d'ours brun hibernant et actif.

## **Conclusion : la quantification de l'adiponectine pourra être réalisée dans le sérum de l'ours brun par microLC-SRM**

Grâce à la spectrométrie de masse, une méthode microLC-SRM a permis de détecter 4 peptides protéotypiques de l'adiponectine de l'ours brun. Avant d'appliquer cette méthode à l'étude d'une cohorte d'échantillons, il sera nécessaire de déterminer la LOD (*Limit Of Detection*) et la LOQ (*Limit Of Quantification*) de chaque peptide. La LOD détermine la quantité de peptides marqués la plus faible pouvant être détectée par analyse microLC-SRM. La LOQ détermine la quantité la plus faible de chaque peptide pour laquelle l'intensité par analyse microLC-SRM répond de manière linéaire, comparée à des concentrations plus importantes. A l'avenir, cette méthode permettra de quantifier l'adiponectine dans le sérum d'ours hibernant ou le sérum d'ours actif sur une cohorte d'échantillons. Il sera alors possible d'évaluer si la concentration en adiponectine est régulée entre ces deux situations.

### 3. Caractérisation par spectrométrie de masse du cargo protéique des exosomes isolés à partir de sérum d'ours brun

#### Contexte

Les vésicules extracellulaires (EV, *Extracellular Vesicles*) sont des vésicules circulant dans le système sanguin. Le contenu de ces vésicules est appelé cargo et il est constitué d'acides nucléiques, de lipides et de protéines. Depuis plusieurs années, il y a un regain d'intérêt à étudier les EV comme transporteurs de molécules actives, comme dans le cas du cancer du sein où il a été démontré que les EV sécrétées par des cellules métastatiques du cancer du sein contenaient un microARN (miR-200) capable d'être absorbé et d'induire un comportement métastatique sur des cellules en culture [201]. D'autre part, les exosomes (sous-classe des EVs) permettent également de réguler la concentration intracellulaire, comme dans le cas de myotubes traités à la dexaméthasone (facteur d'induction de l'atrophie musculaire) où il a été montré que l'abondance en microARNs (miR-182 et miR-23a) était plus importante dans les exosomes permettant d'en réduire la concentration intracellulaire [202, 203].

Nous avons souhaité caractériser par spectrométrie de masse le cargo protéique d'exosomes isolés à partir de sérum d'ours brun afin d'en déterminer les éventuels rôles sur les adaptations à l'hibernation. Dans les paragraphes suivants sont présentés les résultats préliminaires obtenus pour deux méthodes d'isolement des exosomes sériques à partir d'un même échantillon d'ours brun.

Actuellement il existe deux méthodes d'isolement d'exosomes à partir d'échantillons sériques : par ultracentrifugation (UC) et par SEC (*Size Exclusion Chromatography*). Le principe de

SEC est présenté en page 22. Il existe peu d'études ayant comparé ces deux méthodes d'isolement à partir d'échantillons sériques. L'isolement d'exosomes par SEC permettrait d'obtenir un meilleur rendement que l'isolement d'exosomes par UC, cependant les fractions obtenues pourraient être fortement contaminées par les protéines sériques majoritaires et les lipoprotéines [204, 205]. Nous avons voulu déterminer la méthode d'isolement d'exosomes la plus adaptée, entre l'UC et la SEC, pour une analyse du cargo protéique des exosomes d'ours brun par spectrométrie de masse.

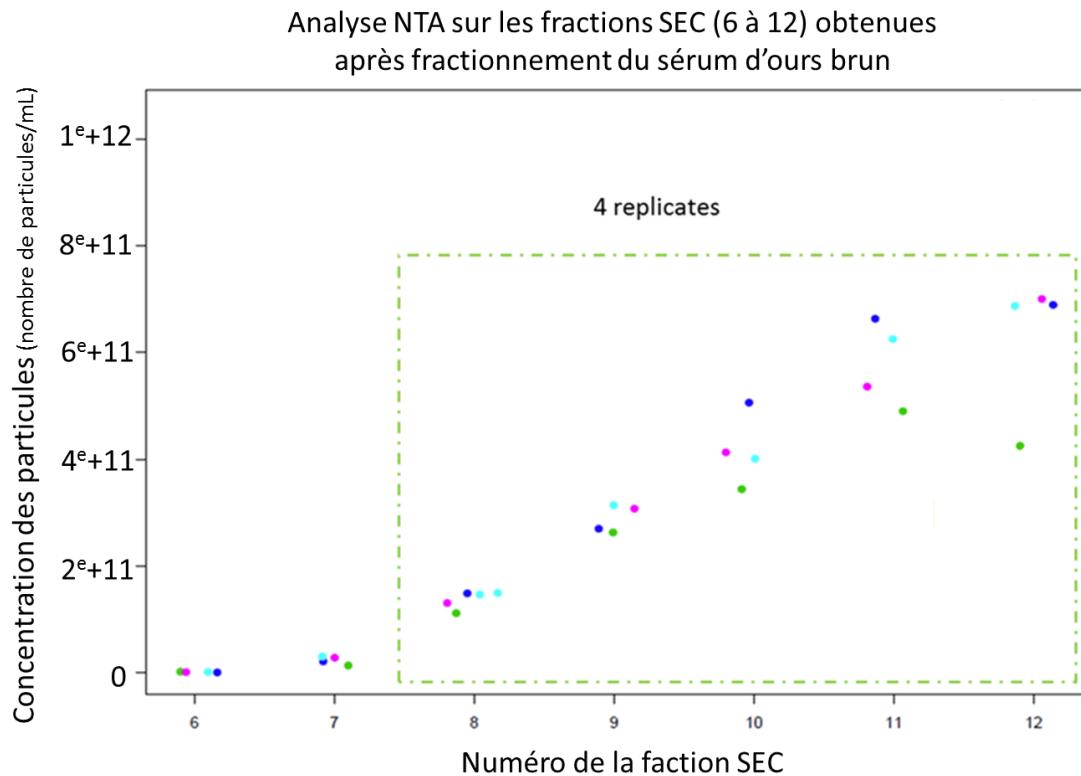
## Matériels et méthodes

- **Description et préparation des échantillons**

⇒ Isolement des exosomes sériques d'ours brun par SEC et analyse des extraits protéiques par spectrométrie de masse

A partir de 0.5mL de sérum d'ours brun, 24 fractions SEC ont été collectées, dans un tampon PBS, par nos collaborateurs. Cette méthode a été réalisée à 4 reprises afin d'obtenir des répliques techniques. Une analyse NTA (*Nanoparticles Tracker Analysis*), a été réalisée sur chacun des répliques de chaque fractions SEC afin de déterminer les fractions susceptibles de contenir les exosomes. Après l'analyse NTA, les fractions 8 à 12 ont été sélectionnées pour l'analyse par spectrométrie de masse car elles semblaient contenir une concentration plus importantes de particules sériques, comparées aux autres fractions SEC (les résultats de l'analyse NTA sur les 24 fractions ne sont pas montrés ici) (Figure 34).





*Figure 34 : Analyse NTA (Nanoparticles Tracker Analysis) des fractions SEC 6 à 12 afin de déterminer les fractions SEC susceptibles de contenir les exosomes isolés à parti du sérum d'ours brun. L'encadré vert représentent les 5 fractions SEC sélectionnées (fractions 8 à 12) pour l'analyse par spectrométrie de masse.*

Après réception des échantillons au laboratoire, un réplica de chacune des 5 fractions SEC (fractions 8 à 12) a été utilisé pour l'analyse par spectrométrie de masse. Un tampon de lyse RIPA (SIGMA [SDS 0,1%, NaCl 150mM, sodium deoxycholate 0,5%, Triton x100 1%, Tris 50mM pH8]) a été ajouté pour déstabiliser les membranes des exosomes et libérer le cargo exosomal. Les cargos ont été isolés des résidus membranaires par centrifugation (5.000g, 12 minutes, 4°C). Les protéines ont été concentrées par précipitation avec 9 volumes d'acétone froid (-20°C) sur la nuit. Le culot protéique a été isolé par centrifugation (5.000g, 12 minutes, 4°C) et solubilisé dans un tampon constitué de 8M urée et de 0.1m ammonium bicarbonate. La concentration protéique de chaque fraction SEC a été déterminée par dosage colorimétrique de type RC-DC (RC-DC Protein

Assay, SIGMA). La totalité de l'extrait protéique d'une fraction a été décomplexifié sur deux bandes protéiques (2mm de hauteur pour chaque bande) par électrophorèse sur un gel SDS PaGE. Après excision des bandes protéiques, un agent réducteur (DTT) et un agent alkylant (IAM) ont été ajoutés avant une digestion trypsique (ratio trypsine : protéines à 1 : 50) sur la nuit, à 37°C. Les peptides issus de la digestion ont été extraits des bandes de gels.

⇒ Isolement des exosomes sériques d'ours brun par ultracentrifugation (UC) et analyse des extraits protéiques par spectrométrie de masse

A partir de 12 mL de sérum d'ours brun, 1 fraction contenant les EVs a été isolée et reprise dans un tampon PBS par nos collaborateurs. Après réception, les protéines ont été extraites et isolées avec la même méthode que celle présentée pour les exosomes isolés par SEC. Les extraits protéiques ont été repris dans un tampon Laemmli (SDS à 2 %, Tris pH 6,8 10mM, EDTA 1mM et glycérol 10%). La concentration protéique a été déterminée par dosage colorimétrique de type RC-DC (RC-DC Protein Assay, SIGMA). 30µg des extraits protéiques ont été décomplexifiés en dix bandes protéiques par électrophorèse sur gel SDS PaGE. Après excision des bandes protéiques, un agent réducteur (DTT) et un agent alkylant (IAM) ont été ajoutés avant une digestion trypsique (ratio trypsine : protéines à 1 : 50) sur la nuit, à 37°C. Les peptides issus de la digestion ont été extraits des bandes de gels.

- **Analyses LC-MS/MS des extraits protéiques d'exosomes sériques d'ours brun**

Pour l'extrait protéique d'exosomes sériques isolés par UC, 300ng théoriques de peptides ont été analysés sur un système UPLC NanoAcquity (Waters) couplé à un Q-Exactive Plus (description

du système en page 131). Les peptides ont été élués de la colonne séparative avec un gradient de 1 à 35% d'acétonitrile sur 40 minutes.

Pour les extraits protéiques de chaque fraction SEC, 200ng théoriques de peptides ont été analysés sur un système UPLC (NanoElute, Bruker Daltonics) couplé à un TimsTOF Pro (Bruker Daltonics). Les peptides ont été concentrés sur une colonne de concentration (nanoEase, C18, 20mm\*180µm, 5µm, 100Å) avec une pression constante de 217.5bars sur une durée de 3 minutes. Les peptides ont ensuite été élués de la colonne séparative Aurora (IonOpticks, C18, 250mm\*75µm, 16µm) maintenue à 50°C, avec un gradient de 2% à 40% d'acétonitrile acidifié (0.1% d'acide formique) sur une durée de 63 minutes, à un débit de 0.4µL/min. Les spectres MS et MS/MS ont été acquis sur une gamme de masse de 100m/z à 1.700m/z.

- **Identification des protéines**

Pour les analyses de l'extrait protéique issu de l'isolement par UC, l'identification des protéines a été réalisée grâce à l'algorithme *Andromeda* implémenté dans *MaxQuant* (version 1.5.8.3), contre une banque de données de séquences protéiques téléchargée à partir de la base de données *UniprotKB* via la suite logicielle MSDA (Taxonomie 9632, Ursidae, 13 Nov. 2017, 36.896 entrées). Les contaminants communs du fichier contaminants.fasta inclus dans MaxQuant ont été ajoutés et les séquences protéiques *decoy* ont été automatiquement générées par le logiciel. Les tolérances pour la première recherche MS et la recherche principale ont été respectivement fixées à 20ppm et 4.5ppm. La tolérance sur la recherche MS/MS a été fixée à 40ppm et le nombre maximal de sites de clivages manqués à 1. La carbamidométhylation des résidus cystéines a été considérée comme modification fixe, et l'oxydation des résidus

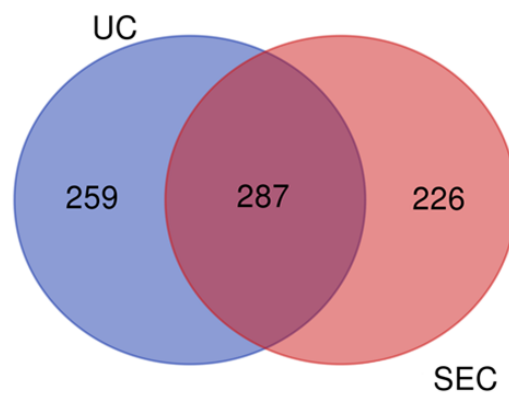
méthionines et l'acétylation de l'extrémité protéique N-ter en modifications variables. Les identifications ont été validées avec une valeur seuil de FDR de 1% pour les peptides (longueur de séquence minimale de 7 acides aminés) et les protéines. L'option de report des identifications MS d'une analyse à l'autre (« *match between runs* ») a été paramétrée avec une fenêtre de temps de rétention de 1.5 minutes après réalignement.

Pour les analyses des extraits protéiques issus de l'isolement par SEC, les données brutes ont été automatiquement converties en *mgf* (*mascot generic files*) par le logiciel *Compass Data Analysis* (version 5.2) implémenté dans le système contrôlant le TimsTOF. Les protéines ont été identifiées grâce au logiciel Mascot (Matrix Science) contre une banque de séquences protéiques créée sur la suite logicielle MSDA à partir de la base de données *UniProtKB* (Taxonomie 9632, Ursidae, 01 Avril 2019, 63.385 entrées) et contenant les séquences protéiques *decoy*. Les séquences de la trypsine et des contaminants usuels ont été ajoutées. Des tolérances de 15 ppm et de 0.05 Da ont été fixées pour les recherches MS et MS/MS, respectivement ; et un site de clivage manqué au maximum. Les modifications fixes et variables considérées ont été les mêmes que ci-dessus. Les identifications ont été validées grâce au logiciel Proline avec un seuil FDR placé à 1% pour les protéines et les peptides (longueur minimale des séquences peptidiques de 7 acides aminés, score minimum de 25).

Les protéines humaines homologues des protéines d'ours brun identifiées ont été déterminées grâce à l'algorithme Fasta v36 implémenté sur notre Galaxy (développement présenté en page 63).

## Identification par spectrométrie de masse des protéines du cargo des exosomes sériques d'ours brun isolés par UC et par SEC

546 et 513 protéines homologues humaines ont été identifiées à partir des exosomes isolés dans le sérum d'ours brun par UC et par SEC, respectivement. Les deux méthodes d'isolement permettent d'identifier un nombre équivalent de protéines exosomales. Cependant, seulement 37% des protéines ont été communément identifiées entre les deux stratégies d'isolement (287 protéines sur un total de 772 protéines uniques) (Figure 35), montrant que différents protéomes sont isolés selon la méthode d'isolement choisie, ce qui ne permet pas de distinguer l'une des méthodes.



*Figure 35 : Recouvrement entre les protéines homologues humaines identifiées à partir des exosomes isolés par UC (bleu) et des exosomes isolés par SEC (rouge).*

Les nombres de protéines identifiées dans chacune des 5 fractions SEC étaient similaires. Par ailleurs, 145 protéines ont été communément identifiées sur l'ensemble des fractions (soit 28%, 145/513) et le nombre de protéines identifiées uniquement dans l'une des 5 fractions était compris entre 3 et 86 protéines, montrant que les protéomes identifiés dans chaque fraction sont légèrement différents.

Après l'isolement des exosomes par SEC du sérum d'ours brun, les fractions ont été analysées par NTA permettant de confirmer la présence d'EVs dans chacune des fractions sélectionnées. Cependant, ce type d'analyse est insuffisant pour différencier les exosomes des autres types de EVs, comme les lipoprotéines qui sont généralement co-isolées avec les exosomes par SEC [204, 205]. Afin de déterminer les fractions au sein desquelles les exosomes et les lipoprotéines ont été isolés, la présence de protéines de la famille tétraspanine et de l'apolipoprotéine B, marqueurs des membranes des exosomes et des lipoprotéines respectivement, ont été recherchées [205], ont été recherchés. Les protéines CD81 et CD9, de la famille des tétraspanines, ont été identifiées dans la fraction 9 seulement, alors que l'apolipoprotéine B a été identifiée dans l'ensemble des fractions, à l'exception de la fraction 8. Ces résultats suggèrent un co-isolement de lipoprotéines dans la majorité des fractions, tandis que les exosomes seraient majoritairement présents dans la fraction 9. Une contamination par des lipoprotéines pourrait expliquer que le protéome identifié après isolement des exosomes par SEC soit si différent du protéome identifié par isolement par UC qui serait alors plus représentatif du cargo exosomal. En effet, il est possible qu'une grande partie des protéines identifiées dans les fractions SEC soit en réalité des lipoprotéines qui n'ont pas été isolées par UC. Par ailleurs, il est important de noter que les marqueurs des exosomes sont des protéines membranaires dont la détection par spectrométrie de masse est souvent difficile sans étape d'isolement ou d'enrichissement des protéines membranaires, ou l'utilisation d'un tampon contenant des agents chaotropes, des fortes concentrations de détergents ou de solvants organiques [206]. Une analyse par microscopie électronique permettra de différencier et de quantifier les différents types d'EV dans les fractions SEC.

**Conclusion : différentes méthodes d'isolement des exosomes permettent d'identifier des protéomes différents**

Grâce à une analyse par spectrométrie de masse, nous avons démontré qu'il existait une différence entre le protéome d'exosomes isolés par SEC et celui d'exosomes isolés par UC. Nos résultats ont également démontré une possible contamination des exosomes isolés par SEC par des lipoprotéines. Tant que cette hypothèse n'est pas vérifiée par microscopie électronique, il n'est pas possible de déterminer la meilleure méthode d'isolement d'exosomes (ayant un bon rendement et étant la plus spécifique) à partir du sérum d'ours brun.

## 4. Identification des protéines du LCR d'ours brun par spectrométrie de masse

### Contexte

Le LCR (Liquide Céphalo-Rachidien) est le liquide dans lequel baigne le cerveau et la moelle épinière (i.e. le système nerveux central, SNC). La concentration protéique du LCR est faible et sa composition protéique est provient à 80% du plasma [207]. Les régulations de composition du LCR sont représentatifs des régulations du systèmes nerveux central et c'est la raison pour laquelle la recherches de biomarqueurs de maladies neurodégénératives par spectrométrie de masse dans le LCR est aujourd'hui largement répandu [150]. De plus, le SNC contrôle l'homéostasie énergétique comme la thermorégulation de l'organisme [208].

Par ailleurs, il a été démontré que lors de l'hibernation, le SNC pouvait jouer un rôle central, notamment *via* la mise en place d'une neuroprotection limitant le nombre de cellules cérébrales mortes après une blessure chez le spermophile hibernant mais pas chez le spermophile actif [209]. Cela nous laisse supposer qu'il pourrait y avoir des régulateurs exprimés au niveau du système nerveux central chez l'ours hibernant, et qui induiraient des changements dans la composition protéique du LCR. Pour cela il sera possible de mettre en place une analyse de protéomique différentielle par spectrométrie de masse d'échantillons de LCR prélevés sur des individus hibernants ou actifs. Ici, nous présentons la stratégie analytique appliquée pour caractériser le protéome du LCR d'ours brun.

### Matériel et méthodes

Nous avons obtenu des échantillons de liquide céphalo-rachidien (LCR), prélevés sur deux ours bruns captifs par les vétérinaires d'un parc animalier. Les protéines ont été concentrées par



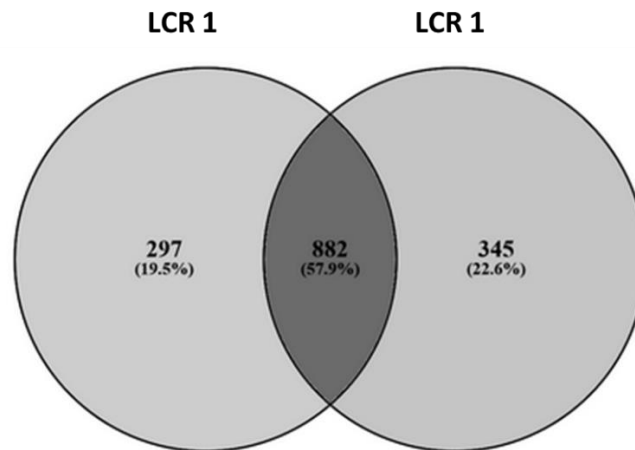
ultrafiltration sur un filtre de seuil de poids moléculaires (*Molecular Weight Cut-Off*) de 5kDa (Millipore) avec une centrifugation à 15.000g à 4°C. Les échantillons ont été centrifugés une première fois durant 30 minutes. Afin d'éliminer les sels restants et de conditionner les protéines dans un tampon compatible avec une décomplexification sur gel SDS PaGE, 450µL d'une solution SDS 2%, Tris 10mM pH 6.8, EDTA 1mM et 10% glycérol, contenant des inhibiteurs de protéases (Thermo Scientific), ont été ajoutés. Les échantillons ont été à nouveau centrifugés (15.000g, température ambiante, 30 minutes) jusqu'à obtenir un volume final de 75µL. Les concentrations protéiques de chaque échantillon ont été déterminé par dosage colorimétrique DC (RC-DC Biorad protein assay). 80µg de protéines ont ensuite été solubilisés dans un tampon Laemmli avant une séparation électrophorétique sur gel SDS PaGE. Au final, 26 bandes protéiques de 2mm ont été excisées pour chaque échantillon. L'alkylation, la réduction, la digestion protéolytique des protéines sur gel et l'extraction des peptides ont été réalisées.

Un volume de 3µL d'extrait peptidique a été analysé selon l'intensité de la banque protéique sur le gel SDS PaGE. Les peptides ont été analysés sur un système chromatographique NanoAcquity (Waters) couplé à un Q-Exactive Plus (Thermo Scientific). Les peptides ont d'abord été chargés sur une colonne d'enrichissement (C18 180µmx20mm, 5µm ; Waters) à un débit de 5µL/min (99% H<sub>2</sub>O, 0.1% AF ; 1% ACN, 0.1% AF) durant 3 minutes. Ensuite les analytes ont été séparés sur une colonne séparative (BEH130 C18 75µm\*250mm, 1.7µm ; Waters), maintenue à 60°C. L'élution des peptides a été réalisée en augmentant graduellement le pourcentage du solvant chromatographique (contenant de l'acétonitrile pur avec 0.1% AF), de 1% à 35% sur une durée de 40 minutes, à un débit constant de 450nL/min. Les paramètres d'acquisition du Q-Exactive Plus étaient identiques à ceux présentés en page 131.

L'identification des protéines a été réalisée grâce au logiciel Mascot (Matrix Science). La suite logicielle MSDA [95] a été utilisée pour générer une banque de données protéiques contenant les séquences des protéines d'ours (taxonomie 9632, Ursidae, Août 2017, 37.013 entrées), à partir de la base de données *UniProtKB*. Les séquences *decoy* ont été automatiquement ajoutées ainsi que la séquence protéique de la trypsine et des contaminants communs. Les paramètres de recherche ont été définis comme suit : un site de clivage manqué au maximum, carbamydométhylation des résidus cystéines en modification fixe, oxydation des résidus méthionine en modification variable, tolérance MS de 5ppm et tolérance MS/MS de 0.07Da. L'ensemble des identifications obtenues a été validé avec le logiciel Proline en fixant un seuil de FDR à 1% au niveau peptidique et protéique, et un *ion score* supérieur à 25. Les protéines homologues humaines des protéines d'ours identifiées ont été déterminées grâce au logiciel Fasta v36 implémenté sur plateforme Galaxy (présenté en page 63).

## Résultats et interprétations

1179 et 1227 protéines homologues humaines ont été identifiées pour le premier et le second échantillon, respectivement. Près de 58 % des protéines homologues humaines ont été communément identifiées entre les deux échantillons (Figure 36).



*Figure 36 : Protéines homologues humaines identifiées après analyse par spectrométrie de masse de deux échantillons de LCR d'ours buns.*

Il est important que noter que ces échantillons provenaient de deux individus, euthanasiés à des périodes différentes et l'un des échantillons (LCR 1) était fortement hémolysé, pouvant expliquer les différences entre les deux listes des protéines identifiées.

En 1992, l'équipe de Kondo et Kondo a découvert 4 protéines dans le plasma de tamias : HP20, HP25, HP27 et HP55. Les trois premières protéines s'associeraient dans le foie pour former le complexe HP20c, avant d'être transporté dans la circulation sanguine où la protéine HP55 s'ajoute au complexe HP20c pour former un nouveau complexe HPc [210]. Ces protéines possèdent des domaines semblables à ceux du collagène, à l'exception de la protéine HP55 qui est homologue à la protéine humaine  $\alpha$  1-antitrypsine. En 2006, la même équipe a démontré que la concentration sanguine des protéines HP20, 25 et 27 était très diminuée durant la phase hibernante, comparé à la phase active, et très augmentée dans le LCR [211]. De plus, l'injection d'anticorps dirigés contre le complexe HP20c dans le LCR des tamias hibernant, induit un réveil des animaux contrairement au groupe contrôle [210]. Nous avons donc recherché les protéines

homologue humaines des protéines HP20, HP25, HP27 et HP55 dont l'abondance était plus importante dans le LCR des tamias hibernants [211]. Ces protéines sont disponibles dans la base de données *TrEmbl* (à l'exception de la protéine HP55) ce qui nous a permis de déterminer les protéines humaines homologues. A noter que la séquence de la protéine HP25 renseignée ne compte que 14 acides aminés ne permettant pas de réaliser un BLAST. Pour les protéines HP20 et HP27, une même protéine homologue humaine a été identifiées (collagène alpha 1) et nous avons considéré la protéine alpha-1-antitrypsine comme homologue humaine de la protéine HP55 (donnée issue de la littérature). Dans nos données, ces deux protéines homologues humaines ont été identifiées pour les deux échantillons de LCR d'ours brun. Nous pouvons donc supposer que notre méthode a permis d'identifier des protéines dont l'abondance est significativement régulée durant la phase hibernante. Dans le cadre d'une analyse de protéomique différentielle entre des échantillons de LCR d'ours bruns hibernants et d'ours bruns actifs, il sera intéressant alors de déterminer les variations d'abondance de ces protéines.

Par la suite, la visualisation des protéines homologues humaines sur les cartes de la base de données *KEGG* (algorithme présenté en page 66) a permis d'identifier des protéines impliquées dans 6 systèmes synaptiques : 5, 8, 9, 11, 15 et 21 protéines ont été identifiées dans le fonctionnement des synapses GABAergiques, sérotoninergiques, glutamatergiques, cholinergiques, dopaminergiques et adrénargiques, respectivement. Ces systèmes synaptiques sont impliqués dans la régulation de fonctions comme la contraction musculaire, l'éveil ou le sommeil, la fréquence cardiaque ou la température corporelle. Dans le cas de l'ours hibernant, étudier ces systèmes synaptiques pourrait permettre de mieux appréhender les régulations mises

en place dans le SNC lors de l'hibernation, qui pourraient être impliqués dans la régulation de la température corporelle ou encore dans la régulation du sommeil.

## **Conclusion**

Nous avons mis en place une méthode de préparation d'échantillon permettant de caractériser le protéome du LCR de l'ours brun. Il nous a été possible d'identifier des protéines homologues humaines de protéines identifiées spécifiquement dans le plasma et le LCR des tamias hibernants, montrant que notre méthode pourrait identifier des marqueurs protéiques de l'hibernation dans le LCR d'ours brun. Par ailleurs, des protéines impliquées dans 6 systèmes synaptiques et régulant l'homéostasie de l'organisme ont été identifiées et pourraient permettre de mieux appréhender les mécanismes régulés au niveau du SNC, lors de l'hibernation de l'ours brun. Cette méthode d'analyse par spectrométrie de masse pourrait être appliquée à une approche de protéomique différentielle quantitative sur des échantillons de LCR d'ours bruns actifs et hibernants.

## 5. Optimisation d'une approche de phosphoprotéomique sur le muscle de l'ours

*Le lancement de ce projet a bénéficié des conseils judicieux de Christine Schaeffer et Justine Schneider du LSMBO, et le protocole initial d'enrichissement en phosphopeptides nous a été transmis par le laboratoire de Proteomique et Spectrométrie de masse des biomolécules de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale de Toulouse.*

### Contexte

Les PTM (*Post-Translational Modifications*) sont largement impliquées dans la régulation des voies de signalisation. Après la production et la maturation des protéines, des enzymes spécialisées sont capables de modifier chimiquement certains résidus de la séquence protéique. La phosphorylation est la PTM considérée comme « l'interrupteur moléculaire » le plus important. Par ailleurs, il a déjà été montré que le niveau de phosphorylation de facteurs de transcription [212] et de protéines [213] étaient liées à la régulation de la masse musculaire et au développement de la sarcopénie (i.e. atrophie musculaire liée à l'âge). Identifier les sites de phosphorylations des protéines, permettraient de mieux appréhender les mécanismes mis en place dans la préservation du muscle squelettique durant l'hibernation de l'ours brun. Nous avons donc choisi de développer une méthode de phosphoprotéomique afin de d'identifier les sites phosphorylations sur les protéines musculaires de l'ours brun.

### Stratégie analytique

Afin d'utiliser une méthode reproductible, efficace pour l'enrichissement des phosphopeptides et facile à réaliser, nous avons optimisé différentes étapes d'un protocole

d'enrichissement en phosphopeptides à partir de peptides tryptiques issus de la digestion d'extraits protéiques de muscle squelettique d'un ours brun (Figure 37).

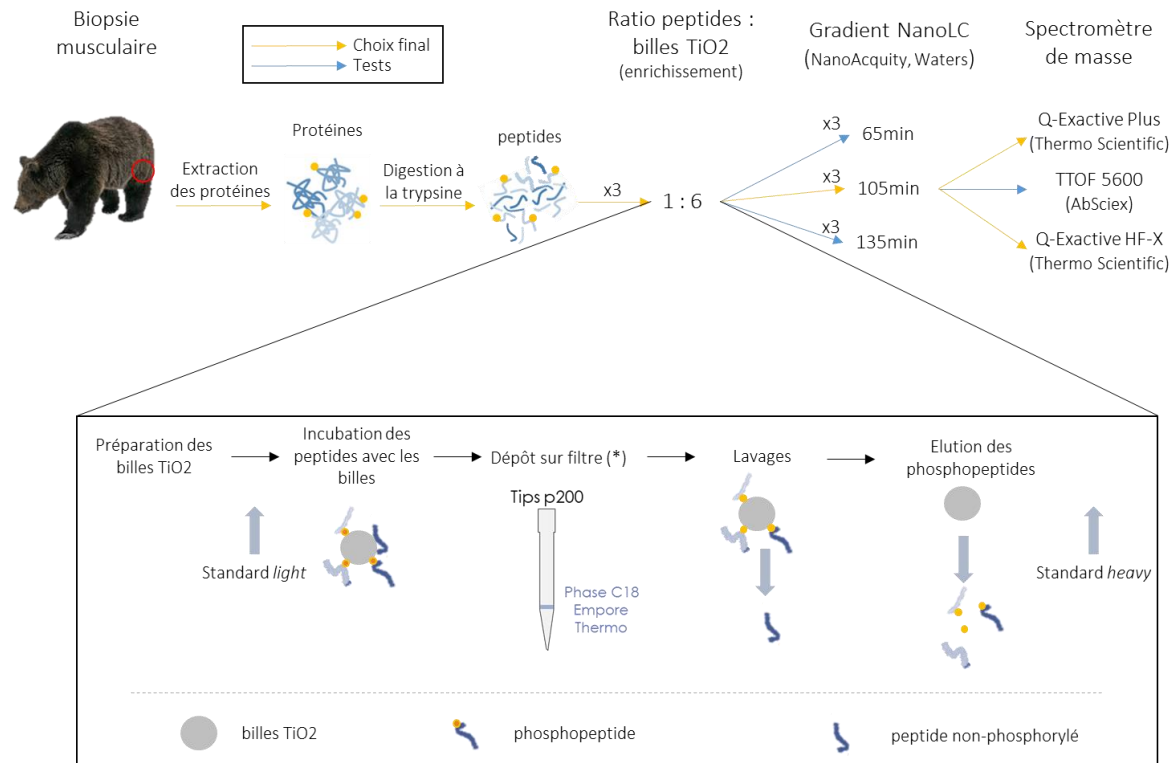


Figure 37 : Schématisation du protocole d'enrichissement en phosphopeptides avec une partie des optimisations réalisées. La stratégie finalement sélectionnée après les tests (flèches bleues) est présentée par les flèches jaunes. \*: l'élution des phosphopeptides fixés sur les billes TiO2 a par la suite était réalisée par centrifugation (page 140).

## Matériels et méthodes

### Extraction des protéines à partir de biopsies musculaires d'ours brun

L'échantillon sélectionné pour les optimisations du protocole de phosphoprotéomique est une biopsie musculaire d'ours brun provenant d'un parc zoologique. Le tissu congelé a été divisé en plusieurs parties qui ont été broyées de manière mécanique, à froid et à sec, avec des billes d'acier (MM400, Retsch). Des cycles de 30 secondes avec une fréquence de 30 Hertz ont été réalisés jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Les protéines ont été extraites en ajoutant

un tampon de lyse de 6M Urée, 0.1M bicarbonate d'ammonium, 2% CHAPS, des inhibiteurs de protéases (*cOmplete Ultra tablets*, Mini, EDTA-free ; Roche) et des inhibiteurs de phosphatases (phosphatase cocktail inhibitor 2 et 3 ; SIGMA). Le volume de tampon de lyse ajouté (en  $\mu\text{L}$ ) correspond à dix fois la masse de tissus broyé (en mg). Après une incubation de 30 minutes à 37°C, les échantillons ont été soniqués à la sonde, sur glace, avec 3 cycles de 10 secondes, avec 10% d'amplitude. Les échantillons ont été centrifugés 5 minutes à 13.000g et le surnageant contenant les protéines a été conservé.

#### **Précipitation et reprise des protéines musculaires**

Les échantillons ont été incubés avec 6 volumes d'acétone froid, à -20°C, pour la nuit. Après une centrifugation à 5000g, durant 5 minutes à 4°C, le surnageant a été éliminé. Les protéines contenues dans le culot, ont été reprises dans un tampon 8M urée, 0.1M ammonium bicarbonate. Il a été supposé que 10% de la masse du tissu broyé correspondait à la quantité de protéines extraites, ce qui a permis d'ajouter un volume de tampon suffisant pour obtenir une concentration protéique finale proche de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Les extraits protéiques ont ensuite été soniqués à 15000g pendant 10 minutes pour culoter les derniers débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines a été conservé et la concentration en protéine a été déterminée par dosage colorimétrique, compatible avec des agents réducteurs et des détergents (RC-DC™ Protein Assay ; Bio-Rad). Les concentrations protéiques obtenues ont été comparées entre les échantillons grâce aux profils électrophorétiques obtenus sur gel SDS PaGE. 30 $\mu\text{g}$  de protéines pour chaque échantillon ont été préparés dans un tampon de type Laemmli avant d'être chauffés 5 minutes à 95°C, sous agitation. La migration électrophorétique a été réalisée en deux étapes : dans un premier temps un voltage constant de 50 volts a été appliqué durant 20 minutes, puis un



voltage constant de 150 volts jusqu'à ce qu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel. Les protéines ont été fixées dans le gel en incubant les gels 15 minutes dans une solution 50% éthanol, 3% acide phosphorique. Les gels ont été colorés sur la nuit, au bleu colloïdal, sur la nuit. Les profils électrophorétiques (i.e. intensité et présence des bandes protéiques) étaient similaires pour l'ensemble des échantillons permettant d'affirmer la justesse du dosage réalisé.

#### **Réduction, alkylation et digestion des protéines en solution**

Le volume d'extrait protéique équivalent à 250 ou 500µg de protéines musculaires a été complété à 200µL avec un tampon 8M urée, 0.1M ammonium bicarbonate. La réduction des protéines a été réalisée en ajoutant du dithiothréitol (DTT) 700mM (30 minutes à 37°C), suivie de l'alkylation des protéines avec de l'iodoacétamide (IAM) 700mM (1 heure, à l'obscurité, à température ambiante). 1.5mL d'ammonium bicarbonate 0.1M a été ajouté pour atteindre une concentration finale de 1M urée. La trypsine dissoute dans de l'ammonium bicarbonate 25mM a été ajoutée au mélange protéique avec un ratio protéines : trypsine égal à 1:50. Une incubation à 37°C pour la nuit a été réalisée. La digestion a été interrompue par acidification du mélange protéique avec 5µL d'acide formique (AF). Les peptides tryptiques ont été extraits sur un système SPE (*Solid Phase Extraction*) contenant 100mg de phase stationnaire C18 (*Sep-Pack C18 cartridges*, 1cc, 100mg ; Waters). Les cartouches SPE ont été conditionnées avant d'y déposer l'échantillon. Après deux lavages, les peptides ont été élués avec 600µL d'une solution aqueuse contenant 60% d'acétonitrile (ACN), 0.1% d'acide formique (AF). Enfin le solvant a été complètement évaporé et les peptides ont été repris dans un tampon d'équilibration (80% ACN, 5% acide trifluoroacétique (TFA), 1M acide glycolique) pour avoir une concentration peptidique théorique de 1µg/µL. Les phosphopeptides standards *lights* (i.e. phosphopeptides synthétisés

avec un marquage avec des isotopes légers) ont été ajoutés à une proportion de 1.6 fmol de peptides standard pour 1µg de peptides tryptiques.

#### **Conditionnement des billes de dioxyde de titane**

Le tampon d'équilibration (80% ACN, 5% TFA, 1M acide glycolique) a été ajouté, aux billes de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>), à un volume suffisant pour obtenir une concentration de 1µg/µL de billes TiO<sub>2</sub>. Après une incubation de 30 minutes sous agitation, le mélange de billes a été centrifugé (1 minute, 1.600g) et le surnageant a été éliminé.

#### **Enrichissement en phosphopeptides**

Les peptides tryptiques ont été incubés avec les billes de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) conditionnées (ratio billes TiO<sub>2</sub> : peptides de 1 :6) durant 20 minutes, sous agitation. Après centrifugation, le surnageant n'a pas été conservé tandis que les billes TiO<sub>2</sub> ont été reprises dans un tampon de lavage (60% ACN, 1% TFA). Un système de filtration composé d'une membrane C18 (*Empore C18*, Thermo) insérée dans un cône de pipette a été constitué pour chaque échantillon.

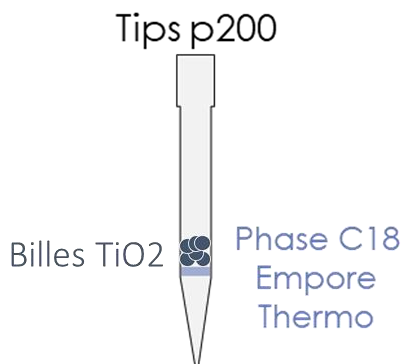


Figure 38 : Schématisation du système d'élution des phosphopeptides sur un cône de pipette dans lequel est insérée une membrane C18. Les billes TiO2 sont retenues sur la membrane tandis que les peptides et les solvants sont élués.

Après conditionnement, les mélanges peptides/billes TiO2 ont été déposés sur ces filtres (schématisation en Figure 38) et une pression a été appliquée avec une seringue jusqu'à ce que la solution soit totalement éliminée. Un premier tampon d'élution (5% hydroxyde d'ammonium [NH4OH]) a été ajouté aux billes et élué après 5 minutes d'incubation. Une seconde élution avec le premier tampon d'élution a été réalisée. De la même manière, les phosphopeptides ont été élués avec un second tampon d'élution (25% ACN, 10% NH4OH). Les éluats ont été rassemblés et les phosphopeptides standard *heavy* (i.e. phosphopeptides synthétisés avec un marquage avec des isotopes lourds) ont été ajoutés en même quantité que les phosphopeptides standards *light*. La comparaison des intensités obtenues pour les peptides standard entre la forme *heavy* et la forme *light* permettront d'évaluer l'efficacité de l'enrichissement : si l'intensité de la forme *heavy* est proche de l'intensité de la forme *light*, alors l'enrichissement est jugée efficace. Les solvants ont été évaporés et les peptides ont été repris avec une solution aqueuse contenant 2% ACN, 0.1% AF.

### **Séparation par chromatographie liquide**

Les peptides ont d'abord été chargés sur une colonne d'enrichissement (C18 180µm x 20mm, 5µm ; Waters) à un débit de 5µL/min (99% H<sub>2</sub>O, 0.1% AF ; 1% ACN, 0.1% AF) durant 3 minutes. Ensuite les analytes ont été séparés sur une colonne séparative (BEH130 C18 75µm\*250mm, 1.7µm ; Waters), maintenue à 60°C. Trois gradients chromatographiques ont été testés : augmentation graduelle de la proportion de solution B (100% acétonitrile, 0.1% AF), de 1% à 32%, sur une durée de 65, 105 ou 135 minutes. Par la suite, le pourcentage de solution B a été rapidement augmenté jusqu'à 90%, en 6 minutes, afin de nettoyer le système chromatographique. Enfin, le système a été rééquilibré en diminuant le pourcentage de la solution B à 1% sur une durée de 19 minutes. Le débit appliqué a été de 450nL/min pour les systèmes UPLC (NanoAcquity, Waters) couplés au TTOF 5600 ou au Q-Exactive Plus, et a été de 400nL/min sur le couplage avec le Q-Exactive HF-X.

### **Paramètres d'acquisition : TTOF 5600, Q-Exactive Plus et Q-Exactive HF-X**

Les acquisitions par spectrométrie de masse ont été réalisées en mode positif, et les spectres MS/MS ont été obtenus pour les 10 peptides les plus intenses (DDA TOP 10).

Table 4 : Paramètres d'acquisition mis en place pour l'analyse des phosphopeptides sur le Q-Exactive Plus et le Q-Exactive HF-X (Thermo Scientific) et sur le TTOF5600 (AbSciex)

|       |                             | Q-Exactive Plus<br>(Thermo Scientific) | Q-Exactive HF-X<br>(Thermo Scientific) | TTOF5600<br>(AbSciex) |
|-------|-----------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|
| MS    | Résolution                  | 70.000<br>(200 m/z)                    | 120.000<br>(200 m/z)                   | ≈ 30.000<br>(722 m/z) |
|       | Gamme de masse (m/z)        | 300 - 1.800                            | 375 - 1.500                            | 400 - 1.250           |
|       | AGC (nb ions)               | 3E+06                                  | 3E+06                                  |                       |
|       | Maximum injection time (ms) | 50                                     | 60                                     |                       |
|       | TOP N                       | 10                                     | 10                                     | 50                    |
|       | NCE (eV)                    | 27                                     | 27                                     | 10                    |
| MS/MS | Résolution                  | 17.500<br>(200 m/z)                    | 15.000<br>(200 m/z)                    | ≈ 17.000<br>(892 m/z) |
|       | AGC (nb ions)               | 1E+05                                  | 1E+05                                  |                       |
|       | Maximum injection time (ms) | 100                                    | 60                                     |                       |

### Identification des protéines

Les protéines ont été identifiées grâce au logiciel Mascot (Matrix Science) contre une banque de séquences protéiques créée sur la suite logicielle MSDA à partir de la base de données *UniProtKB* (Taxonomie 9632, Ursidae, 31 Mars 2018, 37.293 entrées) et contenant les séquences protéiques *decoy*. Les séquences de la trypsine et des contaminants usuels ont été ajoutées. Les tolérances ont été fixées à 5, 5 et 10 ppm pour les recherches MS sur les analyses obtenues sur le Q-Exactive Plus, le Q-Exactive HF-X et le TTOF5600, respectivement. Les tolérances ont été fixées à 0.03, 0.05 et 0.05 Da pour les recherches MS sur les analyses obtenues sur le Q-Exactive Plus, le Q-Exactive HF-X et le TTOF5600, respectivement. Un site de clivage manqué au maximum a été autorisé. La carbamydométhylation des résidus cystéines a été déterminée comme modification fixe. Les modifications variables considérées ont été les suivantes : acétylation des N-termini des protéines, phosphorylation des résidus sérine, tyrosine et thréonine, oxidation des résidus méthionines et les marquages isotopiques des peptides standards ( $^{13}\text{C}(6)^{15}\text{N}(4)$ ) et

$^{13}\text{C}(6)^{15}\text{N}(2)$ ). Les identifications ont été validées grâce au logiciel Proline avec un seuil FDR placé à 1% pour les protéines et à 0.5% pour les peptides (longueur minimale des séquences peptidiques de 7 acides aminés).

## **Résultats des tests d'optimisation du protocole de phosphoprotéomique appliqué à l'enrichissement de peptides phosphorylés du muscle squelettique de l'ours brun**

### **Test 1 – Reproductibilité et efficacité de la méthode d'enrichissements**

L'enrichissement réalisé manuellement peut induire des difficultés de reproductibilité. Nous avons donc évalué la reproductibilité de trois enrichissements en phosphopeptides, à partir d'un même échantillon, réalisés en parallèle sur 250µg de peptides tryptiques et analysés sur un système UPLC (NanoAcquity, Waters) couplé à un TTOF 5600 (AbSciex) avec un gradient de 65, 105 et 135 minutes.

Les phosphopeptides identifiés entre les trois enrichissements pour chacun des gradients chromatographiques testés ont été comparés (Figure 39). Il est important de noter que cette comparaison se base sur la séquence peptidique, indépendamment du ou des sites de phosphorylation(s) identifié(s). Autrement dit, si une séquence peptidique a été identifiée deux fois mais avec des localisations ou un nombre de sites de phosphorylation différents, la séquence peptidique ne sera prise en compte qu'une seule fois pour cette comparaison.

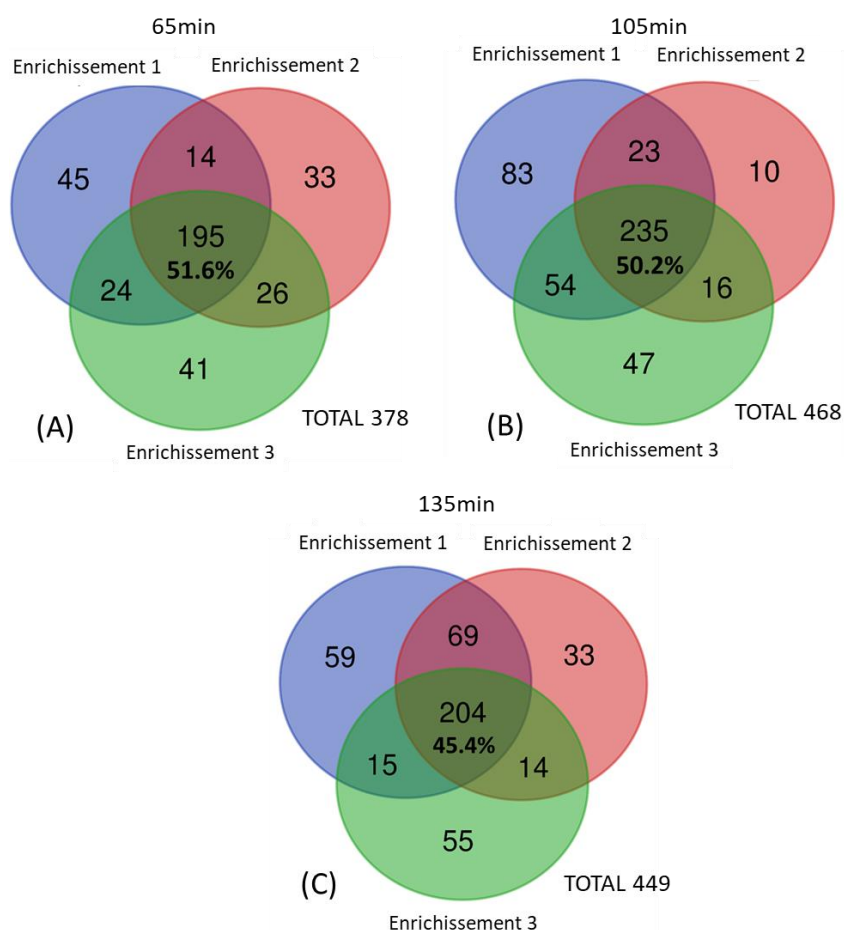


Figure 39 : Recouvrement des séquences des phosphopeptides identifiés pour un gradient de 65 minutes (A), de 105 minutes (B) ou de 135 minutes (C), avec trois enrichissements en phosphopeptides réalisés en parallèle sur 250µg de peptides.

51.6, 50.2 et 45.4% des séquences des phosphopeptides ont été communément identifiés entre les trois enrichissements pour le gradient chromatographique de 65, 105 et 135 minutes, respectivement. Ce qui démontre que les phosphopeptides identifiés sont en grande partie les mêmes entre les trois enrichissements et que notre méthode manuelle d'enrichissement en phosphopeptides est assez reproductible.

Pour poursuivre, les proportions d'acides aminés identifiés avec des phosphorylations ont été comparées pour les phosphopeptides dont les sites de phosphorylations ont été identifiés

avec *PTM score* supérieur à 0.75 (ce score représente la probabilité que la phosphorylation soit effectivement présent sur le résidu identifié – voir page 40). Sur l'ensemble des résidus phosphorylés identifiés, 79%, 19% et 2% des phosphorylations étaient portées par des résidus sérines, thréonines et tyrosines, respectivement (Figure 40).

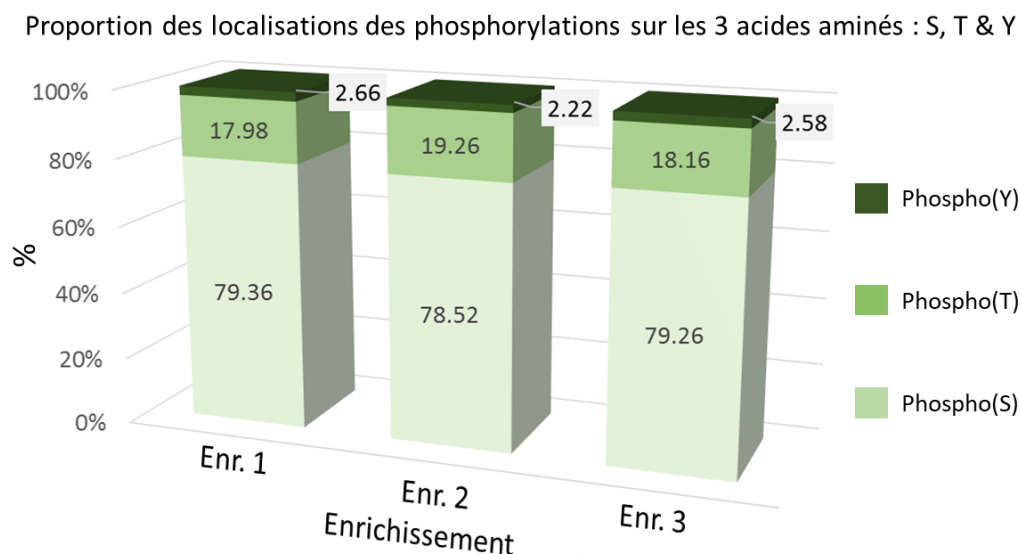


Figure 40 : Proportion phosphotyrosines (phospho(Y) ; vert foncé) ; de phosphothréonines (phospho(T) ; vert medium) et de phosphosérines (phospho(S) ; vert clair), identifiés avec un *PTM score* > 0.75, après enrichissement de 250µg de peptides, avec un ratio 1:6.

En comparaison, les proportions étaient de 86.4%, 11.8% et 1.8% de phosphosérines, phosphothréonines et phosphotyrosines identifiées à partir d'extraits peptidiques de cellules HeLa enrichis en phosphopeptides en combinant SCX (principe décrit en page 18) et MOAC sur billes TiO<sub>2</sub> [214]. De ce fait, les proportions obtenues avec notre méthode sont cohérentes avec ce qu'il peut être attendu et permettent d'affirmer que notre méthode d'enrichissement en phosphopeptides est satisfaisante de ce point de vue. Par ailleurs, il est important de noter que des résultats similaires ont été observés pour les 3 enrichissements réalisés en parallèle,



démontrant une nouvelle fois la reproductibilité de notre méthode d'enrichissement en phosphopeptides.

L'enrichissement de type MOAC avec des billes TiO<sub>2</sub> favorise l'enrichissement de peptides monophosphorylés, alors que les peptides portant plusieurs phosphorylations sont plus difficilement conservés. Dans nos données, les proportions de phosphopeptides identifiés (*PTM score* >0.75) avec une, deux ou trois phosphorylations ont été respectivement de 83%, 13% et 2%, et ce de manière reproductible pour les gradients de 65, 105 et 135 minutes. Notre méthode d'enrichissement semble donc permettre un enrichissement des phosphopeptides monophosphorylés comme attendu, ce qui a permis de définitivement valider notre protocole d'enrichissement en phosphopeptides.

#### **Test 2 – Choix du gradient NanoLC : 65, 105 ou 135 minutes d'élution**

Le gradient chromatographique permet la décomplexification d'un mélange peptidique complexe et un plus grand nombre de peptides et de protéines peuvent alors être identifiés. Nous avons donc évalué l'efficacité de trois gradients chromatographiques à identifier le plus grand nombre de phosphoprotéines et de phosphopeptides. Pour chaque gradient le pourcentage d'acétonitrile acidifié (0.1% acide formique) a été augmenté de 1% à 32% sur une durée de 65, 105 ou 135 minutes. L'analyse par spectrométrie de masse (Q-Exactive Plus, Thermo Scientific) a été réalisée à partir de 1/5<sup>ème</sup> d'un échantillon obtenu après un enrichissement en phosphopeptides sur 250µg de protéines musculaires digérées à la trypsine. Les résultats obtenus ici sont la combinaison de 3 enrichissements réalisés en parallèle.

Après traitement des analyses LC-MS/MS, l'évaluation des différents gradients a été réalisée en comparant les nombres de peptides et phosphopeptides identifiés (Figure 41) :

- Le nombre de peptides identifiés avec et/ou sans phosphorylation(s). 1233, 1576, 1567 peptides ont été identifiés avec le gradient de 65, 105 et 135 minutes, respectivement. Les gradients de 105 et 135 minutes ont permis d'identifier un plus grand nombre de peptides, comparé au gradient de 65 minutes.
- Le nombre de phosphopeptides identifiés portant au moins un groupement phosphate. 721, 973 et 901 phosphopeptides ont été identifiés avec le gradient de 65, 105 et 135 minutes, respectivement. Une nouvelle fois, les gradients de 105 et 135 minutes ont permis d'identifier un plus grand nombre de phosphopeptides, comparé au gradient de 65 minutes.
- Le nombre de phosphopeptides identifiés avec des sites de localisation validés (i.e. les phosphopeptides dont les phosphorylations étaient localisées avec un *PTM score* supérieur à 0.75 (soit 75% de probabilité de bonne localisation des sites de phosphorylations)). 393, 486, 482 phosphopeptides ont été respectivement validés avec le gradient de 65, 105 et 135 minutes. Comme précédemment, le gradient de 65 minutes n'a pas permis d'obtenir des résultats équivalents à ceux obtenus avec les gradients de 105 minutes et de 135 minutes.

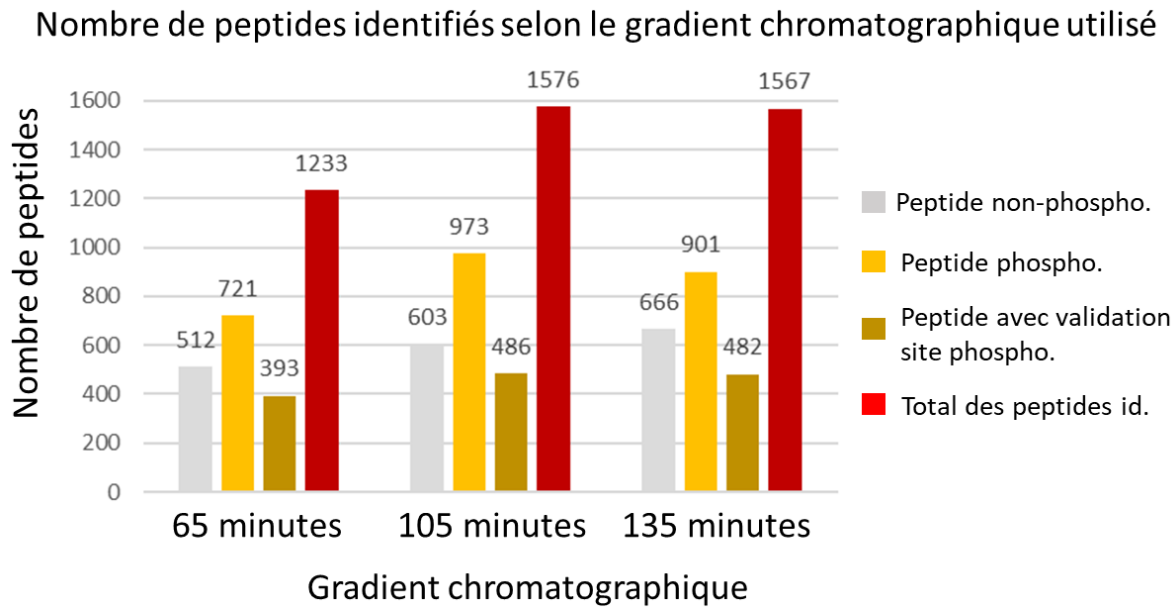


Figure 41 : Récapitulatif des peptides identifiés avec un gradient de 65, 105 ou 135 minutes. 4 catégories de peptides sont représentées : peptides identifiés sans phosphorylation (gris), peptides identifiés avec au moins une phosphorylation (phosphopeptides - jaune), phosphopeptides avec validation PTM score > 0.75 (ocre), ensemble des peptides identifiés (peptides phosphorylés ou non - rouge).

Sur l'ensemble de ces résultats, le gradient de 65 minutes n'a pas permis d'égaliser le nombre de phosphopeptides d'identifiés par l'utilisation du gradient de 105 et 135 minutes. Les gradients de 105 minutes et 135 minutes, permettent d'identifier des nombres équivalents de peptides et phosphopeptides, ne permettant pas de distinguer des bénéfices à l'utilisation de l'un des deux gradients.

Les nombres de protéines et phosphoprotéines identifiées avec l'utilisation des gradients de 65, 105 et 135 minutes ont également été comparés (Figure 42) :

- Le nombre total de protéines et phosphoprotéines identifiées. 256, 294 et 288 (phospho)protéines ont été respectivement identifiées avec les gradients de 65, 105 et 135 minutes. Un plus grand nombre de protéines a été identifié avec l'utilisation des gradients de 105 et 135 minutes, comparés au gradient de 65 minutes.

- Le nombre de protéines identifiées avec et sans phosphorylation : cela inclut les protéines identifiées dans une forme non-phosphorylée ET dans une forme phosphorylée. 66, 84 et 78 protéines ont été identifiées respectivement avec les gradients de 65, 105 et 135 minutes respectivement. Le gradient de 105 minutes a permis d'identifier un plus grand nombre de ces protéines, comparé au gradient de 65 minutes et au gradient de 135 minutes.
- Le nombre de protéines identifiées seulement sous forme phosphorylée (avec au moins une phosphorylation). 112, 124 et 116 phosphoprotéines ont été identifiées respectivement avec les gradients 65, 105 et 135 minutes. Des nombres équivalents de phosphoprotéines ont été identifiées avec l'utilisation des 3 gradients.

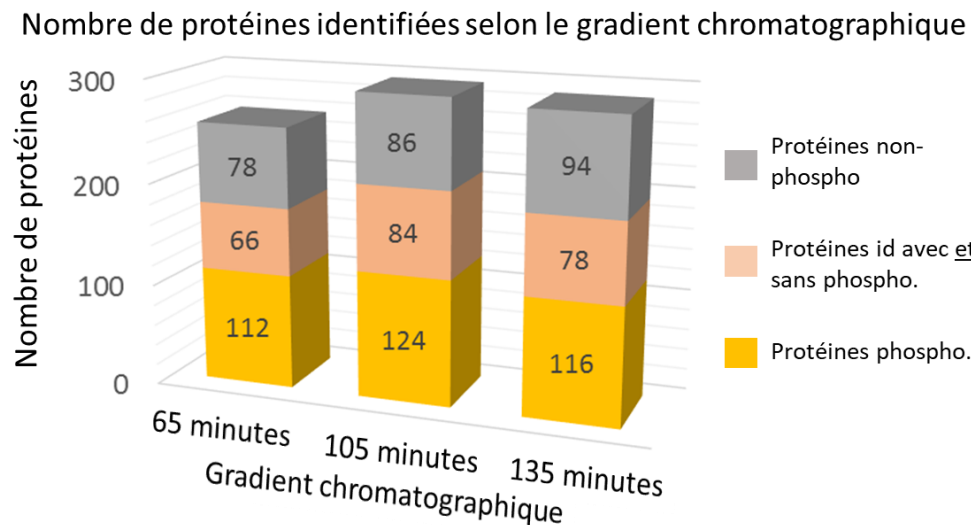


Figure 42 : Récapitulatif des identifications protéiques obtenues avec un gradient de 65, 105 ou 135 minutes. 3 catégories de protéines sont représentées : protéines identifiées sans phosphorylation (gris), protéines identifiées avec et sans phosphorylation (rose), protéines identifiées avec au moins une phosphorylation (jaune).

Les résultats obtenus au niveau peptidique et protéique ont démontré que le gradient de 65 minutes ne permettait pas d'obtenir un nombre d'identifications semblables à ceux obtenus avec

l'utilisation des gradients de 105 et 135 minutes. Ce gradient ne sera donc pas conservé pour la suite des analyses. Par ailleurs, augmenter la durée du gradient de 105 à 135 minutes ne semble pas permettre d'augmenter les nombres de (phospho)protéines et de (phospho)peptides identifiés. Le nombre de peptides identifiés est directement lié à la capacité séparative du système chromatographique. Or, il a déjà été démontré qu'à un débit donné, la capacité séparative était améliorée, jusqu'à une certaine limite, en augmentant la durée du gradient. Par exemple, à un débit de 0.4 mL/min (proche du débit utilisé ici qui était de 0.45mL/min), la capacité séparative maximale est atteinte avec une durée de gradient de 120 minutes [61]. Nos résultats sont donc en accord avec ces données puisqu'augmenter la durée de gradient de n'a effectivement pas permis d'augmenter le nombre d'identifications : cela pourrait être dû au fait que la capacité séparative maximale avait déjà été atteinte avec le gradient de 105 minutes et ne pouvait donc pas être améliorée en augmentant la durée du gradient à 135 minutes. De ce fait, le gradient de 105 minutes sera sélectionné pour la suite des analyses.

### **Test 3 – Choix de la méthode d'élution des phosphopeptides**

Jusqu'à présent, les peptides ont été élués des billes de dioxyde de titane en filtrant le mélange billes/peptides directement sur une membrane C18 (méthode « F » pour filtration). Par cette méthode, la quantité de billes TiO<sub>2</sub> déposée sur le filtre produit une contrepression importante sur le piston de la seringue et il devient alors très difficile pour l'utilisateur d'appliquer une force contraire à cette contrepression pour éluer les phosphopeptides à travers le filtre. Une nouvelle méthode d'élution a donc été évaluée, plus simple d'utilisation, où les peptides, initialement fixés sur les billes TiO<sub>2</sub>, sont isolés par centrifugation (méthode « C » pour centrifugation). Avec la centrifugation, les billes TiO<sub>2</sub> sont rassemblées dans le culot, tandis que

les phosphopeptides libérés des billes restent dans le surnageant. Après avoir réalisé toutes les étapes d'élution, l'ensemble des surnageants est filtré à la seringue sur la membrane C18, permettant d'éliminer d'éventuelles billes TiO2 encore présentes (Figure 43).

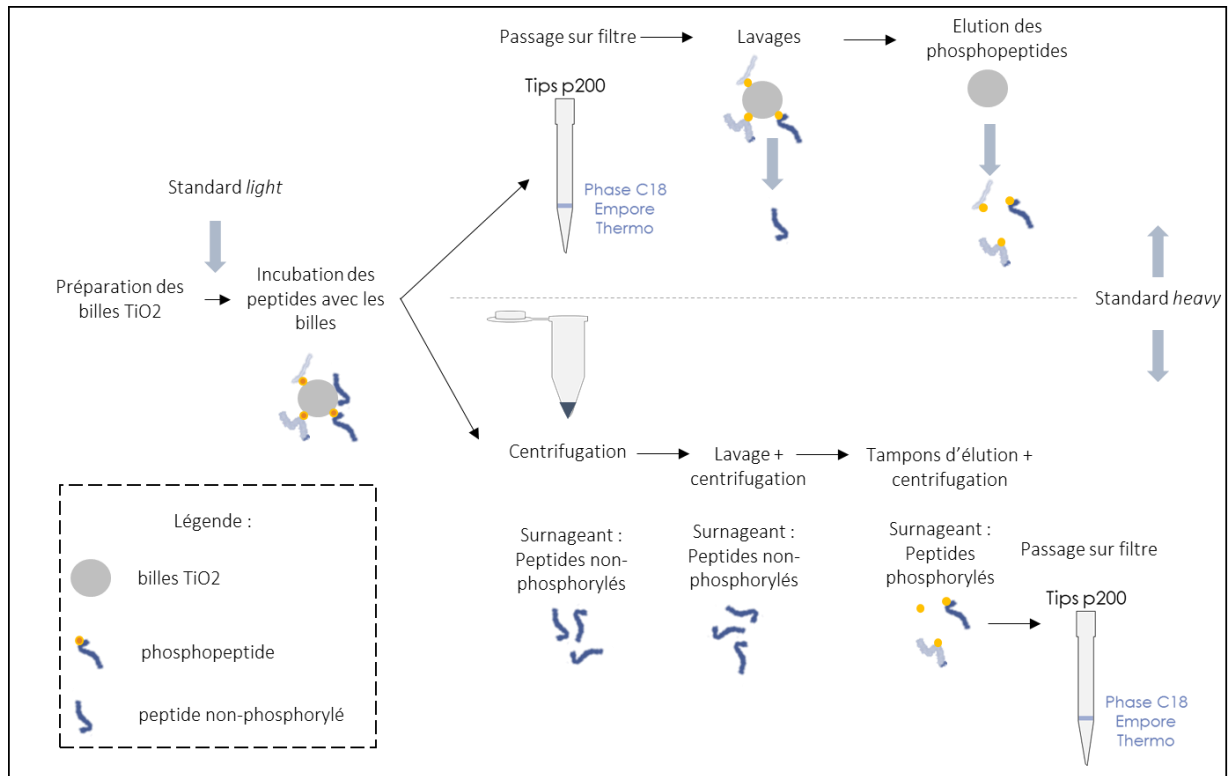


Figure 43 : Schématisation des étapes d'enrichissement selon 2 méthodes : élution par passage direct sur filtre (haut) ou élution par centrifugation, avant filtration sur filtre (bas).

Afin de comparer les deux méthodes d'élution, les enrichissements ont été réalisés sur 500µg de peptides tryptiques. La totalité des fractions enrichies en phosphopeptides a été analysée sur le système NanoLC - Q-Exactive Plus, avec un gradient de 105 minutes. Les enrichissements ont été réalisés en duplicat afin d'évaluer la reproductibilité d'enrichissement pour les deux méthodes.

Les nombres de peptides, phosphopeptides et phosphopeptides avec *PTM score* > 0.75 identifiés entre les duplicats, et les méthodes d'élution des phosphopeptides, étaient similaires (Figure 44A). Dans le détail :

- Nombre de peptides identifiés : 2149, 1942 avec la méthode « F » et 1972, 1947 avec la méthode « C »
- Nombre de phosphopeptides identifiés : 1144, 1098 avec la méthode « F » et 911, 926 avec la méthode « C »
- Nombre de phosphopeptides identifiés avec un *PTM score* > 0.75 : 719, 699 avec la méthode « F » et 582, 587 avec la méthode « C ».

Avec la méthode « C », en moyenne, 18.1% de phosphopeptides et 17.5% de phosphopeptides avec un *PTM score* < 0.75 ont été identifiés en moins, en comparaison avec l'utilisation de la méthode « F ». La méthode « C » permet donc d'identifier un moins grand nombre de phosphopeptides mais étant donné la possibilité de réaliser une préparation à haut débit avec la méthode « C » et le niveau de perte limité (par rapport à la méthode « F »), cette méthode pourra être utilisée par la suite.

De plus, les nombres totaux de protéines identifiées (phosphoprotéines et protéines non-phosphorylées) étaient équivalents entre les duplicats d'une même méthode (464 et 444 protéines identifiées pour les duplicats de la méthode « F », et 408 et 453 protéines identifiées pour les duplicats de la méthode « C »), et de la même manière pour les phosphoprotéines identifiées (332 et 331 phosphoprotéines identifiées pour les duplicats de la méthode « F » et 281 et 287 phosphoprotéines identifiées pour les duplicats de la méthode « C ») (Figure 44B). Cela

démontre que l'utilisation de la méthode « C » semble aussi reproductible que la méthode « F », bien que le nombre d'identifications protéiques obtenues soit légèrement inférieur. Par ailleurs, 70% des protéines et 63% des phosphoprotéines sont communément identifiées avec l'utilisation des deux méthodes d'élution des phosphopeptides (résultats non présentés).

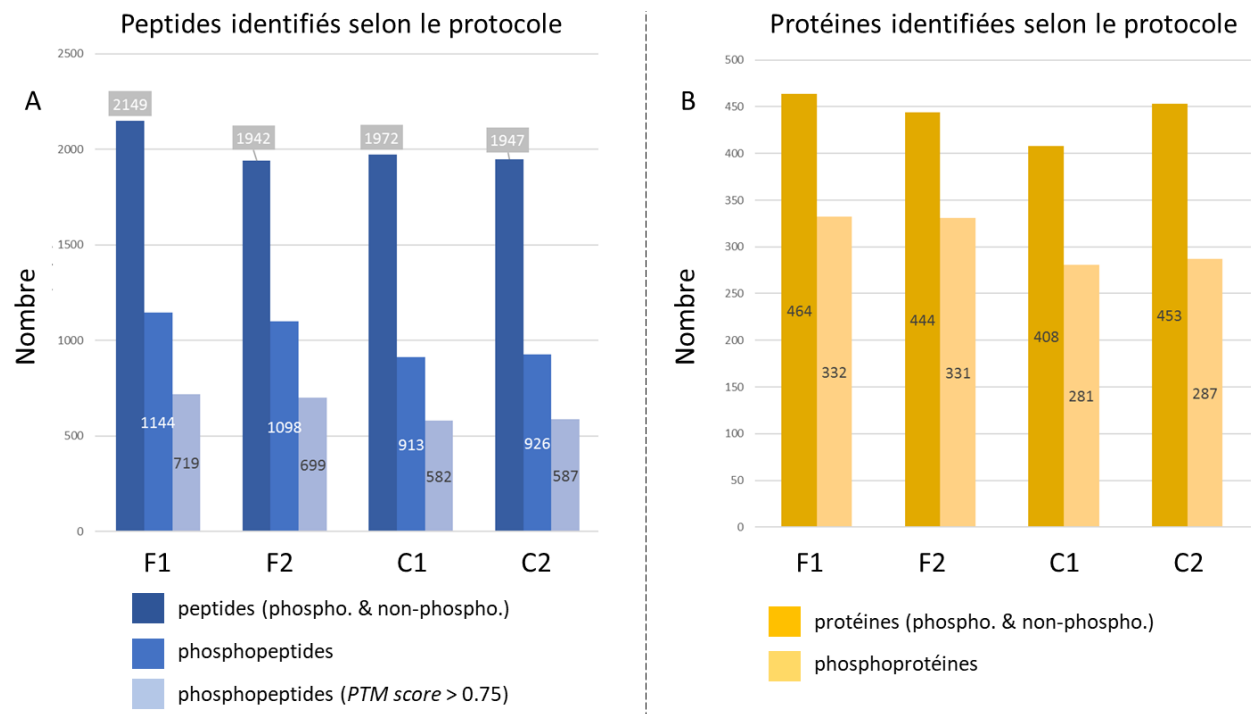


Figure 44 : Identifications au niveau peptidique (ensemble des peptides, peptides phosphorylés et phosphopeptides avec un PTM score >0.75 – panel de gauche) et au niveau protéique (ensemble des protéines et phosphoprotéines – panel de droite), après élution des phosphopeptides sur filtre (F1 et F2) ou par centrifugation (C1 et C2).

Les résultats d'identifications au niveau peptidique et au niveau protéique avec l'utilisation de la méthode « C » sont légèrement inférieurs à ceux obtenus avec l'utilisation de la méthode « F ». Cela pourrait être dû au fait qu'une partie des phosphopeptides ait été retenue au milieu des billes TiO<sub>2</sub> et n'aient donc pas été récupérés dans le surnageant. Cependant, l'objectif de l'ensemble de ces optimisations est de réaliser une analyse différentielle du phosphoprotéome musculaire d'ours bruns hibernants vs actifs sur un grand nombre d'échantillons. Etant donné que



les résultats de l'utilisation de la méthode « C » ne sont que légèrement inférieurs à ceux obtenus avec l'utilisation de la méthode « F » et étant donné la facilité d'appliquer de la méthode « C » c'est cette dernière qui sera conservée pour la suite des analyses. Par la suite il sera également intéressant de comparer les résultats obtenus avec notre méthode d'enrichissement manuelle, avec un enrichissement en phosphopeptides réalisé de manière automatisée comme la plateforme *Bravo AssayMAP* (Agilent) présente depuis peu au laboratoire. Cette plateforme permet de réaliser, de manière automatisée, un enrichissement en phosphopeptides. Il a déjà été démontré que ce système permettait de réaliser des enrichissements en phosphopeptides, issus de la digestion d'extrait protéique de cellules cancéreuses humaines, avec une bonne sélectivité : 90% de peptides identifiés étaient des phosphopeptides [215]. Par ailleurs, ce résultat a été constaté sur des triplicats démontrant une méthode d'enrichissement automatique robuste [215]. De ce fait, utiliser cette plateforme pour l'enrichissement en phosphopeptides à parti d'échantillons d'ours brun pourrait permettre d'assurer une excellente reproductibilité et donc de pouvoir, par la suite, réaliser une analyse de phosphoprotéomique quantitative.

#### **Test 4 – Augmentation du temps d'incubation pour l'élution**

L'une des étapes clefs de l'étape d'enrichissement en phosphopeptides est l'élution des phosphopeptides fixés sur les billes  $\text{TiO}_2$ . Dans les protocoles précédemment présentés, les mélanges peptides/billes ont été incubés avec le tampon d'élution pour une durée de 5 minutes. Nous avons voulu évaluer si augmenter le temps d'incubation à 15 minutes permettait d'identifier un plus grand nombre de phosphopeptides. Pour cela, un enrichissement en phosphopeptides a été réalisé sur 250 $\mu\text{g}$  de peptides et 1/5 de la fraction enrichie a été analysé sur le système chromatographique UPLC (NanoAcquity, Waters) couplé à un Q-Exactive HFX (Thermo Scientific),

avec un gradient de 105 minutes. Avec une incubation de 15 minutes, les nombres de phosphopeptides identifiés ont été augmentés de 5% pour les phosphopeptides identifiés et de 14% pour les phosphopeptides identifiés avec un PTM score > 0.75, comparé à une incubation de 5 minutes (résultats non présentés). Augmenter le temps d'incubation de 5 à 15 minutes permet d'augmenter légèrement le nombre de phosphopeptides et de phosphopeptides avec *PTM score* > 0.75. Par la suite, un temps d'incubation sera augmenté à 15 minutes pour les prochaines analyses.

### **Conclusions : optimisation d'un protocole de phosphoprotéomique pour l'analyse du phosphoprotéome du muscle squelettique de l'ours brun par LC-MS/MS**

Dans le but de comparer le phosphoprotéome du muscle squelettique des ours bruns hibernants et des ours bruns actifs, différentes étapes du protocole de phosphoprotéomique, de l'enrichissement en phosphopeptides à l'analyse LC-MS/MS, ont été optimisées. Grâce aux optimisations mises en place, nous avons établi un protocole d'enrichissement en phosphopeptides avec des billes TiO<sub>2</sub> à partir d'extraits protéiques musculaires d'ours brun digérés à la trypsine. Ce protocole s'est révélé reproductible et facilement applicable à la préparation de plusieurs échantillons avec les paramètres suivants :

- ✓ L'enrichissement sera réalisé avec un ratio peptides : billes TiO<sub>2</sub> de 1 : 6 avec une incubation de 15 minutes pour l'élution des phosphopeptides.
- ✓ Les phosphopeptides seront élués des billes grâce à une centrifugation qui les isolera dans le surnageant.
- ✓ La durée du gradient chromatographique utilisé sera de 105 minutes.

A l'avenir, cette méthode sera appliquée à l'étude du phosphoprotéome musculaire de l'ours brun avec des échantillons provenant d'ours brun hibernants et d'ours bruns actifs afin de mettre en évidence des changements du phosphoprotéome entre ces deux conditions.



FRONTIERS IN ZOOLOGY

## Publication 1

Titre : “Metabolic reprogramming involving glycolysis in the hibernating brown bear skeletal muscle”

Auteurs : **Blandine Chazarin**, Anna Ziemianin, Stephanie Chanon, Marine Plumel, Isabelle Chery, Christine Durand, Alina Evans, Jon M. Arnemo, Andreas Zedrosser, Jon E. Swenson, Guillemette Gauquelin-Koch, Kenneth B. Storey, Chantal Simon, Stephane Blanc, Etienne Lefai, and Fabrice Bertile

DOI : 10.1186/s12983-019-0312-2

Publié en : Mai 2019

RESEARCH

Open Access

# Metabolic reprogramming involving glycolysis in the hibernating brown bear skeletal muscle



Blandine Chazarin<sup>1,10</sup>, Kenneth B. Storey<sup>2</sup>, Anna Ziemianin<sup>1,10</sup>, Stéphanie Chanon<sup>3</sup>, Marine Plumel<sup>1</sup>, Isabelle Chery<sup>1</sup>, Christine Durand<sup>3</sup>, Alina L. Evans<sup>4</sup>, Jon M. Arnemo<sup>4,5</sup>, Andreas Zedrosser<sup>6,7</sup>, Jon E. Swenson<sup>8,9</sup>, Guillemette Gauquelin-Koch<sup>10</sup>, Chantal Simon<sup>3</sup>, Stéphane Blanc<sup>1</sup>, Etienne Lefai<sup>3,11</sup> and Fabrice Bertile<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** In mammals, the hibernating state is characterized by biochemical adjustments, which include metabolic rate depression and a shift in the primary fuel oxidized from carbohydrates to lipids. A number of studies of hibernating species report an upregulation of the levels and/or activity of lipid oxidizing enzymes in muscles during torpor, with a concomitant downregulation for glycolytic enzymes. However, other studies provide contrasting data about the regulation of fuel utilization in skeletal muscles during hibernation. Bears hibernate with only moderate hypothermia but with a drop in metabolic rate down to ~ 25% of basal metabolism. To gain insights into how fuel metabolism is regulated in hibernating bear skeletal muscles, we examined the vastus lateralis proteome and other changes elicited in brown bears during hibernation.

**Results:** We show that bear muscle metabolic reorganization is in line with a suppression of ATP turnover. Regulation of muscle enzyme expression and activity, as well as of circulating metabolite profiles, highlighted a preference for lipid substrates during hibernation, although the data suggested that muscular lipid oxidation levels decreased due to metabolic rate depression. Our data also supported maintenance of muscle glycolysis that could be fuelled from liver gluconeogenesis and mobilization of muscle glycogen stores. During hibernation, our data also suggest that carbohydrate metabolism in bear muscle, as well as protein sparing, could be controlled, in part, by actions of n-3 polyunsaturated fatty acids like docosahexaenoic acid.

**Conclusions:** Our work shows that molecular mechanisms in hibernating bear skeletal muscle, which appear consistent with a hypometabolic state, likely contribute to energy and protein savings. Maintenance of glycolysis could help to sustain muscle functionality for situations such as an unexpected exit from hibernation that would require a rapid increase in ATP production for muscle contraction. The molecular data we report here for skeletal muscles of bears hibernating at near normal body temperature represent a signature of muscle preservation despite atrophying conditions.

**Keywords:** Hibernation, Brown bears, Skeletal muscle, Omics, Enzymology, Glycolysis, Lipid oxidation, Metabolism shift

\* Correspondence: [fbertile@unistra.fr](mailto:fbertile@unistra.fr)

<sup>1</sup>Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France  
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Background

Hibernation has evolved in a variety of mammalian species as an adaptive strategy to survive harsh winter environmental conditions, including seasonal cold ambient temperatures and food shortages [1, 2]. Hibernation/torpor expression implies trade-offs – on one hand physiological costs such as reduced memory retention, reduced immunocompetence and accumulation of sleep debt, and on the other hand, the major benefit of substantial fuel/energy conservation [3]. To save energy during the prolonged period of winter fasting, hibernators rely essentially on decreased metabolic rates over extended periods of deep torpor characterized by physical inactivity, reductions of heart and breathing rates and decreased body temperature [1]. Within this framework, the hibernation of bears represents an extreme phenotype that can last for up to 6-7 months [4] during which inactive animals do not eat, drink, urinate, defecate, or exhibit arousal episodes [5, 6]. Many aspects of bear physiology remain to be elucidated, including how their metabolism is regulated to enable them to endure such prolonged hibernation periods.

An average reduction in metabolic rate to 4.4% of normal basal rates and a decrease in body temperature down to about 6°C have been calculated from the data available for 50-80 species of mammals that hibernate [2]. Relationships between reduced metabolic rate during hibernation and the body size and body temperature of hibernators have been nicely discussed elsewhere [7–9]. Metabolic rate and body temperature are clearly linked, but the dramatic reduction of metabolic rate has also been attributed to an active inhibition of many metabolic activities in a number of species [7–9]. However, the relative contributions of passive thermal effects (the so-called Arrhenius effect) versus active enzyme inhibition to metabolic suppression may differ among hibernators. Unlike the small mammal hibernators, such as rodents and bats of less than 10 kg [2], hibernating bears (family Ursidae; 80-100 kg [2]), maintain high body temperatures (32-35°C), and the 75% decrease in bear metabolic rate that has been recorded is essentially achieved via active metabolic inhibition, independent of body temperature [5, 10, 11]. During hibernation, bears rely solely on body fuel reserves. Fat storage is increased prior to hibernation; e.g. Swedish brown bears (*Ursus arctos*) achieve this by notably overeating carbohydrate-rich berries [12]. Energy requirements are then met mainly through mobilization and oxidation of lipid fuels, bears losing 22-25% of body mass over the hibernating season [5, 13] with only a moderate loss of muscle protein [14, 15]. Accordingly, respiratory quotient (RQ) values as low as 0.62 to 0.73 have been recorded during denning [16]. However, the molecular mechanisms that

are involved in organ/tissue metabolic adjustments have not yet been fully elucidated.

Skeletal muscle has a relatively low resting metabolic rate [17], but because it can account for as much as 40% of total body mass in humans [18], muscle is a major determinant of resting energy expenditure [19]. In addition, it has been reported that biochemical characteristics of skeletal muscle (i.e. in terms of enzymatic activities) are an important determinant of human whole-body metabolic rate and substrate oxidation [20]. Therefore, it could be proposed for hibernators that, as for the whole body, the metabolic fuel preference of skeletal muscle during hibernation is also lipids, whereas glucose oxidation is reduced. However, contrasting data exist about the regulation of fuel metabolism during hibernation, not only between small and large hibernators, but also between different studies of the same small mammal species. Whereas no coordinated transcriptional changes for genes involved in lipid catabolism has been recorded for the muscle of American black bears (*Ursus americanus*) [21], an increase in fatty acid oxidation during hibernation is supported by the upregulation of genes and proteins related to fatty acid catabolism in the muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels (*Ictidomys tridecemlineatus*) [22–25] and arctic ground squirrels (*Urocitellus parryi*) [26], as well as the muscle of Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*) [27]. Concerning glucose metabolism, most of the available data support a decrease in muscle glycolysis during hibernation. Indeed, the recent application of transcriptomics technology has highlighted a coordinated under-expression of genes involved in glycolysis in skeletal muscles of both ground squirrels (*I. tridecemlineatus*, *U. parryi*) as well as *U. thibetanus* during hibernation [25–28]. In addition, it has been reported that protein and/or activity levels of hexokinase in muscle of Richardson's ground squirrels (*Urocitellus richardsonii*) [29] and of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in jerboa (*Jaculus orientalis*) [30] are reduced during hibernation. Consistently, proteomics analysis has shown diminished levels of glycolytic-related proteins in the muscle of winter thirteen-lined ground squirrels [22, 23]. Moreover, the kinetic characteristics of phosphofructokinase and fructose-1,6-bisphosphate aldolase at low temperatures could also be involved in suppressing glycolysis during hibernation, as suggested for the golden-mantled ground squirrel (*Callospermophilus lateralis*) [31, 32]. Finally, the link between muscle glycolysis and the tricarboxylic acid cycle appears to be disrupted during hibernation; for example, the mRNA and protein levels of PDK isozyme 4 (PDK4), which is known to inhibit pyruvate dehydrogenase (PDH) [33], are increased during hibernation in skeletal muscles of *I. tridecemlineatus* [34]. Conversely, other studies of this same species have



reported results that may indicate maintenance of muscle glycolysis during hibernation. For example, carbohydrate-responsive element binding protein (ChREBP), a transcription factor activated by glucose metabolites, is more active in muscles of torpid squirrels [35]. Moreover, some kinetic features of muscle pyruvate kinase [36], the limited PDH regulation via phosphorylation [37], and the post-translational phosphorylation state of phosphoglucosomutase (PGM1) [23] may also favour muscle glycolysis during hibernation.

The aim of the present study was to apply quantitative proteomics and biochemistry to brown bear skeletal muscle to test the hypothesis that changes in enzyme abundance and activity correspond to the expected decrease in metabolic rate and to determine if they could help to identify muscle fuel preferences (i.e. oxidation of lipid versus carbohydrate substrates). The results show that changes in enzyme activities do indeed appear to be relevant targets to gain insights into the biochemical mechanisms involved in metabolism suppression during hibernation. The metabolic reprogramming in muscles of hibernating brown bears does involve glycolysis

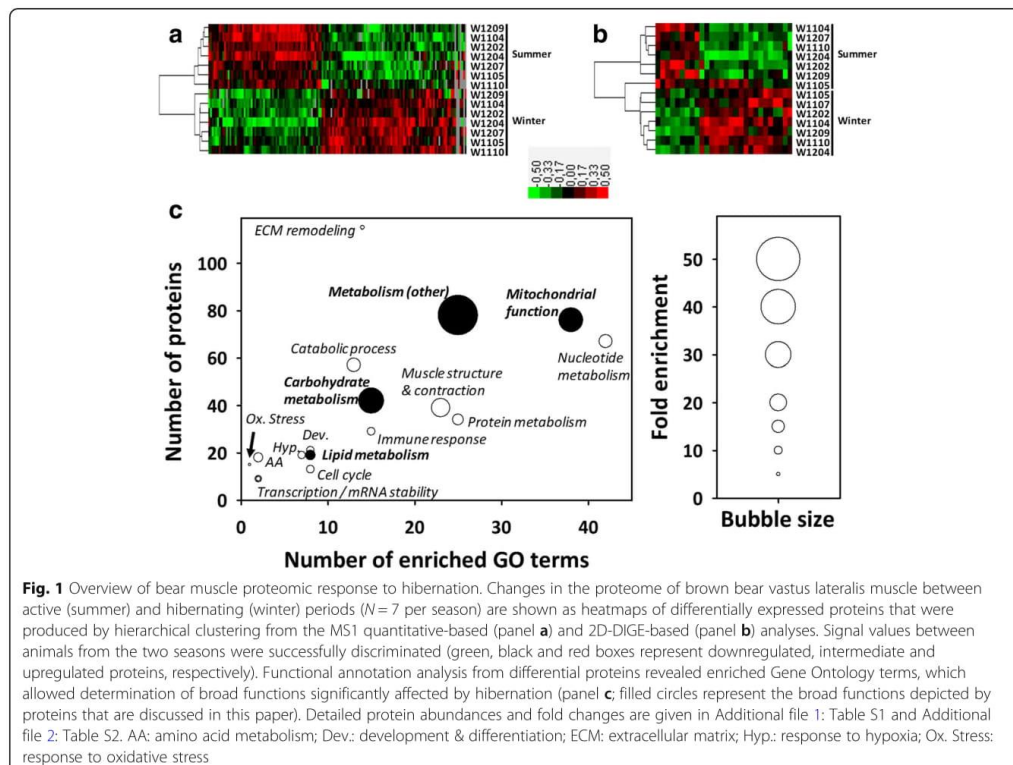
although lipids remain the preferred fuels but with their rate of oxidation being reduced due to metabolic rate depression. Such regulations favour energy savings and the maintenance of muscle proteins in bears hibernating at a core body temperature that remains close to that of the summer-active period.

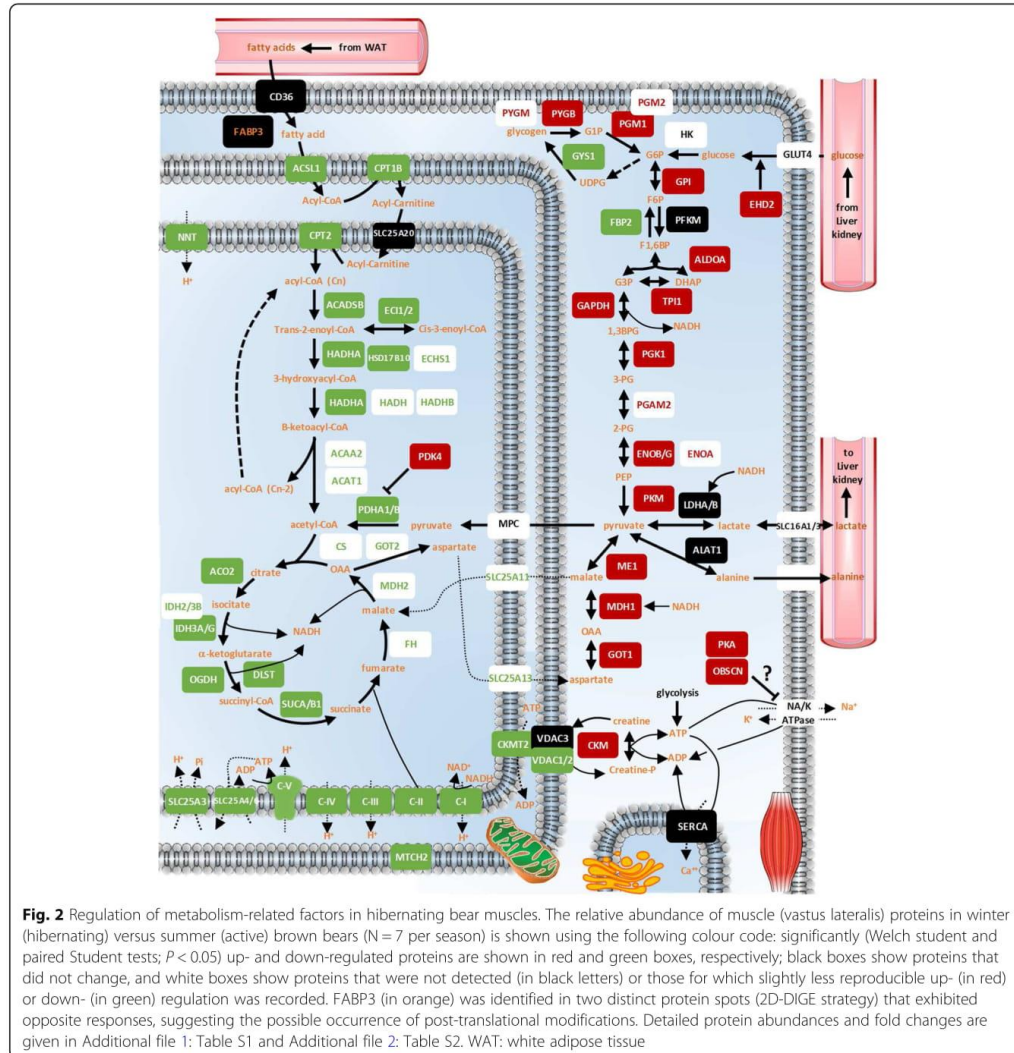
## Results

### Bear muscle proteome is dramatically changed during hibernation

From label-free quantitative proteomics data (XIC), statistical analysis highlighted significant seasonal effects in the abundance of 146 muscle proteins, 67 of them being decreased and 79 increased in hibernating versus active bears (Fig. 1a, see also Additional file 1: Table S1).

Using two-dimensional difference in-gel electrophoresis (2D-DIGE), gel image analysis highlighted 28 protein spots (Additional file 3: Figure S1) exhibiting differential ( $p < 0.05$ ) intensity in hibernating versus active bears (Additional file 2: Table S2). More precisely, the intensity of nine of these protein spots was lower in hibernating than active bears, whereas the reverse was





observed for the remaining 19 spots (Fig. 1b). Mass spectrometry allowed 62 different proteins to be identified in these 28 protein spots, including 47 proteins that were considered as ‘major proteins’ (i.e. more abundant in given spots; see Methods section) and thus purportedly responsible for the changes in protein spot intensities (Additional file 2: Table S2).

Importantly, the overlap of quantitative data between the two proteomics approaches was highly consistent, as all of the eight commonly identified proteins exhibited

very similar seasonal effects (Additional file 2: Table S2). From a merged list of differentially-expressed proteins coming from the two proteomics approaches, functional annotation analysis revealed that differences between hibernating and active bears involved mostly proteins known to play roles in muscle metabolism in a broad sense and in structural remodelling (Fig. 1c). Based on these data, we decided to focus our attention and extend the analysis for a more in-depth examination of muscle fuel metabolism.



### Bear muscle proteomics highlights the regulation of fuel metabolism during hibernation

We achieved a nearly comprehensive detection of the muscle proteins involved in lipid oxidation, glycolysis, and major ATP production (mitochondrial respiratory chain) and consumption (e.g. ion pumping  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases) processes. The data supporting the changes described below are presented in Fig. 2 and Additional file 1: Table S1 and Additional file 2: Table S2.

Regarding muscle lipid metabolism, the expression levels of only two proteins remained essentially unchanged in winter versus summer bears, namely fatty acid translocase (CD36) and mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein (SLC25A20). Fatty acid binding protein 3 (FABP3) was detected in two different protein spots on 2D-DIGE gels, one exhibiting significantly lower (1.3 times) and the other higher (1.2 times) intensity in hibernating versus active bears. All other proteins involved in fatty acid beta-oxidation were found at significantly lower levels during hibernation, including long chain fatty acid-CoA ligase 1 (ACSL1; 2.2 times), carnitine O-palmitoyltransferases 1 (CPT1B; 3.4 times) and 2 (CPT2; 1.2 times), short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase (ACADSB; 1.5 times), enoyl-CoA delta isomerases 1 (ECI1; 1.5 times) and 2 (ECI2; not detectable in winter), trifunctional enzyme subunit alpha (HADHA; 1.3 times) and beta (HADHB; 1.4 times), 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 (HSD17B10; 1.6 times), enoyl-CoA hydratase (ECHS1; 1.5 times), hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH; 1.4 times), 3-ketoacyl-CoA thiolase (ACAA2; 1.5 times), and acetyl-CoA acetyltransferase (ACAT1; 1.6 times).

Similarly, all the proteins of the tricarboxylic acid cycle were downregulated in hibernating bear muscle, including citrate synthase (CS; 1.5 times), aconitate hydratase (ACO2; 1.5 times), isocitrate dehydrogenase (IDH2; 1.4 times) and isocitrate dehydrogenase subunits alpha, (IDH3A; 1.8 times), beta (IDH3B; 1.7 times) and gamma (IDH3G; 2 times), 2-oxoglutarate dehydrogenase (OGDH; 1.4 times), succinyl-CoA ligase subunits alpha and beta (SUCA and SUCB1; 1.5 times), fumarate hydratase (FH; 1.5 times), and malate dehydrogenase (MDH2; 1.4 times).

Mitochondrial membrane respiratory chain protein complexes I to V are each composed of multiple different subunits that were similarly downregulated in hibernating bear muscles, including several subunits of NADH dehydrogenase (NDUFA9, NDUFA10, NDUFB9, NDUFB10, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2; 1.4–2.1 times; as well as MT-ND5 not detectable in winter), succinate dehydrogenase (SDHA and SDHB; 1.3–1.4 times), cytochrome c reductase (UQCRC2, CYC1 and UQCRCF1; 1.3–1.5 times), cytochrome c oxidase (COX2 and COX5A; 1.4–2.7

times), and ATP synthase (ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, ATP5F1, ATP5H and ATP5O; 1.2–2.7 times). Six other NADH dehydrogenase subunits, one other subunit of cytochrome c reductase, and two other ATP synthase subunits were detected and also showed a reduced trend in muscle of hibernating bears, although differences were not statistically significant. Levels of other proteins closely related to the mitochondrial respiratory chain and/or membrane potential were also reduced in winter bears, including phosphate carrier protein (SLC25A3; 1.9 times), ADP/ATP translocases 1 and 3 (SLC25A4 or ANT1 and SLC25A6 or ANT3; 1.4–1.7 times), NAD(P) transhydrogenase (NNT; 2 times), and mitochondrial carrier homolog 2 (MTCH2; 1.6 times). Finally, the abundance of mitochondrial creatine kinase was decreased during hibernation (CKMT2; 1.5 times), as well as that of voltage-dependent anion-selective channel proteins 1 and 2 (VDAC1 and VDAC2; 1.5 times), whereas voltage-dependent anion-selective channel protein 3 (VDAC3) remained unchanged.

Glycogen metabolism proteins were regulated during hibernation, with decreased levels of glycogen synthase (GYS1; 1.3 times) but increased levels of glycogen phosphorylase (PYGM and PYGB; 1.2–1.8 times) and phosphoglucomutase-1 and -2 (PGM1 and PGM2; 1.3–1.4 times). Concerning glycolysis, only levels of ATP-dependent 6-phosphofructokinase (PFKM) remained stable between winter and summer bears. The levels of all other proteins were found to increase during hibernation, including those of EH domain-containing protein 2 (EHD2; 1.6 times), glucose-6-phosphate isomerase (GPI; 1.4 times), fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA; 1.3 times), triosephosphate isomerase (TPI1; 1.2 times), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1.2 times;  $P = 0.052$ ), phosphoglycerate kinase 1 (PGK1; 1.2 times), phosphoglycerate kinase 2 (PGAM2; 1.4 times), alpha-, beta- and gamma-enolase (ENOA, ENOB and ENOG; 1.3–1.4 times), and pyruvate kinase (PKM; 1.3 times). One protein of gluconeogenesis was detected, namely fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2 (FBP2), with decreased levels (1.2 times) in skeletal muscle of hibernating animals.

Examining the different pathways of pyruvate metabolism, we observed decreased levels of pyruvate dehydrogenase E1 component subunits alpha and beta (PDHA1 and PDHB; 1.4 times) in winter versus summer bears, whereas increased levels were recorded for pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4 (PDK4; not detectable during summer) and malic enzyme (ME1; 2 times). The levels of lactate dehydrogenase A and B chains (LDHA and LDHB) and of alanine aminotransferase 1 (ALAT1) were not significantly different between seasons. In addition, we observed upregulation of cytosolic malate dehydrogenase (MDH1; 1.3 times) and aspartate

aminotransferase (GOT1; 1.3 times) and downregulation of mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (SLC25A11; 1.6 times), calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2 (SLC25A13; 1.4 times), and mitochondrial aspartate aminotransferase (GOT1; 1.3 times) in hibernating bears.

The levels of cytosolic creatine kinase were increased during winter (CKM; 1.2 times). Of the main ion pumps of muscle cells,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase was not detected, but the levels of obscurin were increased during hibernation (OBSCN; 1.7 times), as were those of cAMP-dependent protein kinase A (PKA) subunits (PRKAR1A and PRKAR2A; 2.1–2.6 times, and PRKACA; 1.3 times with  $P = 0.06$ ). The levels of three isoforms of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA1–3) remained stable between winter and summer bears.

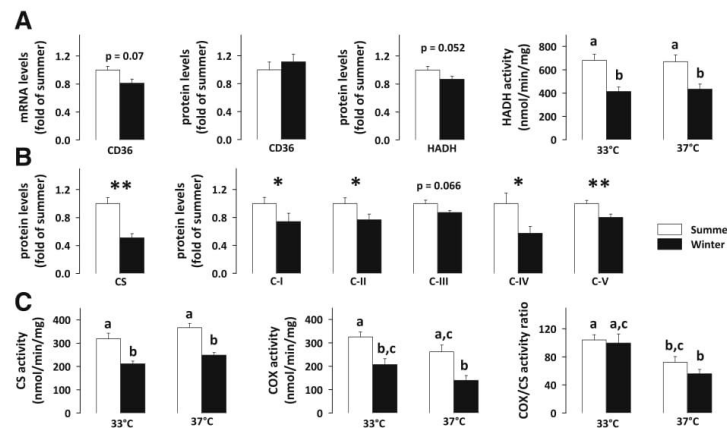
#### Bear muscle proteome changes were validated by quantitative RT-qPCR, western-blot and enzyme activity assays

Regarding lipid metabolism, the levels of fatty acid translocase (CD36) remained unchanged between winter and summer bears, both at the mRNA and protein levels (Fig. 3A and Additional file 4: Figure S2). The decrease in hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH) protein levels during winter was not statistically significant. However, HADH enzymatic activity was significantly reduced in

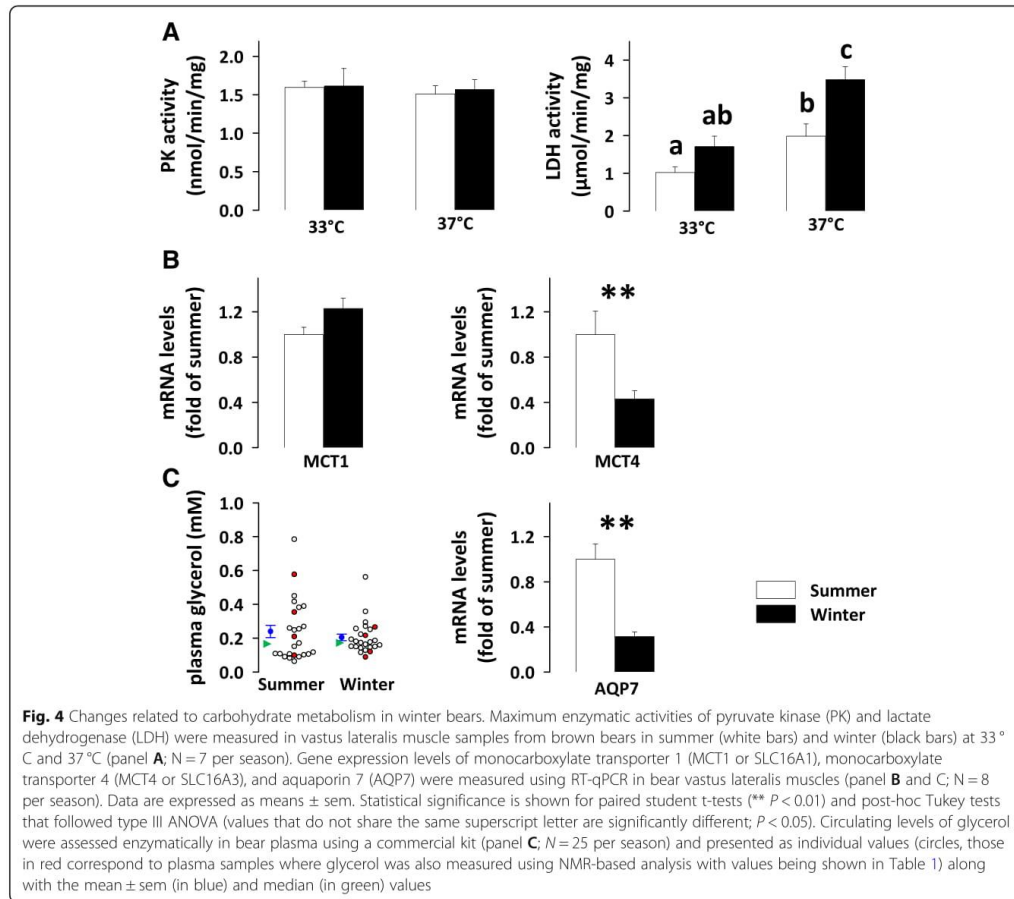
hibernating bears, with a similar 1.5–1.7-fold magnitude, regardless of whether the temperature at which reaction was carried out was 33 °C or 37 °C, to mimic the mean body temperature of bears during winter and summer, respectively.

Concerning the tricarboxylic acid cycle and mitochondrial respiratory chain, significantly decreased protein levels of citrate synthase (CS; 2 times) and subunits of mitochondrial complexes I, II, IV and V (1.3–1.7 times) were observed in the skeletal muscle of hibernating bears (Fig. 3B and Additional file 4: Figure S2). Consistently, enzymatic activity levels of CS and cytochrome c oxidase (COX, complex IV) were also reduced significantly by 1.5–1.9 times during winter, when performing the reaction at either 33 °C and 37 °C (Fig. 3C). As a consequence, the COX/CS activity ratio was not different between winter and summer. When activity assays were performed at 37 °C, the COX/CS activity ratio was nevertheless significantly lower than when activity assays were performed at 33 °C (1.4 times for summer samples and 1.8 times for winter samples).

Concerning glycolysis, pyruvate kinase activity in bear muscle remained stable across seasons, when measured at either 33 °C or 37 °C (Fig. 4A). Enzymatic activity levels of lactate dehydrogenase (LDH), which catalyses pyruvate conversion to lactate, were found to be increased in hibernating bears, not significantly when the reaction was performed at 33 °C but with a significant 1.8-fold change at



**Fig. 3** Repression of lipid metabolism and mitochondrial oxidative phosphorylation in winter bear muscles. Protein or mRNA expression levels of fatty acid translocase (CD36), mitochondrial hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase (HADH), citrate synthase (CS) and subunits of the five oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes (C-I to C-V) were measured using RT-qPCR and/or Western-blot analysis in vastus lateralis muscle samples from brown bears in summer (white bars) and winter (black bars) (panels A and B;  $N = 8$ –12 per season). Corresponding blots are shown in Additional file 4: Figure S2. Maximum enzymatic activities (panels A and C) for HADH, CS and cytochrome c oxidase (COX) were measured at 33 °C and 37 °C ( $N = 7$  per season). Data are expressed as means  $\pm$  sem. Statistical significance is shown for paired student t-tests (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ) or post-hoc Tukey tests that followed type III ANOVA (values that do not share the same superscript letter are significantly different;  $P < 0.05$ )



**Fig. 4** Changes related to carbohydrate metabolism in winter bears. Maximum enzymatic activities of pyruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured in vastus lateralis muscle samples from brown bears in summer (white bars) and winter (black bars) at 33 °C and 37 °C (panel A; N = 7 per season). Gene expression levels of monocarboxylate transporter 1 (MCT1 or SLC16A1), monocarboxylate transporter 4 (MCT4 or SLC16A3), and aquaporin 7 (AQP7) were measured using RT-qPCR in bear vastus lateralis muscles (panel B and C; N = 8 per season). Data are expressed as means  $\pm$  sem. Statistical significance is shown for paired student t-tests (\*\*  $P < 0.01$ ) and post-hoc Tukey tests that followed type III ANOVA (values that do not share the same superscript letter are significantly different;  $P < 0.05$ ). Circulating levels of glycerol were assessed enzymatically in bear plasma using a commercial kit (panel C; N = 25 per season) and presented as individual values (circles, those in red correspond to plasma samples where glycerol was also measured using NMR-based analysis with values being shown in Table 1) along with the mean  $\pm$  sem (in blue) and median (in green) values

37 °C (Fig. 4A). Gene expression levels of membrane lactate transporters (Fig. 4B) were either unchanged between seasons (monocarboxylate transporter 1, MCT1 or SLC16A1) or significantly decreased during winter (monocarboxylate transporter 4, MCT4 or SLC16A3; 2.3 times). Finally, we also observed a decreased gene expression of aquaporin 7 (AQP7; 3.2 times) in hibernating bear muscle, although in the aquaporin family, this isoform actually has a major role as a glycerol transporter (Fig. 4C).

#### Bear plasma metabolite profiles are changed during hibernation

Plasma metabolite measurements assayed via enzymatic kits and those derived from nuclear magnetic resonance (NMR) analysis were in good agreement for glucose and lactate levels (Table 1). Thus, glycaemia tended to be higher in winter compared to summer, but the difference

did not reach significance. Oppositely, lactate levels were significantly reduced in hibernating bear plasma (1.4–2 times). Free fatty acid levels were increased during hibernation (2.7 times) (Table 1). Concerning glycerol levels, the significant decrease (1.3 times) in winter, measured using NMR-based analysis, was also found using the enzymatic kit when considering exactly the same samples (see Table 1 and the red dots in Fig. 4C). Because the values were markedly variable among individuals, especially in summer, we extended the measurement of glycerol levels to 25 bears and still observed no significant seasonal effect (Table 1 and Fig. 4C). We also observed significantly higher circulating levels of triacylglycerols (1.3 times), 3-hydroxybutyrate (1.7 times), betaine (1.4 times), and creatinine (1.5 times) in hibernating bears. No significant change was recorded for plasma levels of pyruvate, glycine/sarcosine, and myo-inositol.



**Table 1** Brown bear plasma metabolite profiles

|                                                            | Summer       | Winter       | p-value       | N/season |          |
|------------------------------------------------------------|--------------|--------------|---------------|----------|----------|
| Plasma metabolite assays using enzymatic methods (kits)    |              |              |               |          |          |
| Glucose (mM)                                               | 4.10 ± 0.83  | 5.90 ± 0.41  | 0.0913        | 6        | –        |
| Free fatty acids (mM)                                      | 0.14 ± 0.02  | 0.38 ± 0.03  | <b>0.0003</b> | 7        | –        |
| Lactate (mM)                                               | 8.59 ± 1.31  | 4.28 ± 0.95  | <b>0.0125</b> | 7        | –        |
| Glycerol (mM)                                              | 0.24 ± 0.04  | 0.20 ± 0.02  | 0.3944        | 25       | –        |
| Triacylglycerols (mM)                                      | 2.85 ± 0.20  | 3.60 ± 0.31  | <b>0.0124</b> | 6        | –        |
| Plasma NMR-based analysis                                  |              |              |               |          | mean VIP |
| Glucose (au)                                               | 1.00 ± 0.07  | 1.21 ± 0.05  | 0.0598        | 7        | 1.73     |
| Unidentified fatty acid (au)                               | 1.00 ± 0.15  | 1.25 ± 0.15  | 0.3659        | 7        | 2.19     |
| Lactate (au)                                               | 1.00 ± 0.09  | 0.72 ± 0.08  | 0.0672        | 7        | 1.70     |
| Glycerol (au)                                              | 1.00 ± 0.04  | 0.78 ± 0.03  | <b>0.0059</b> | 7        | 1.05     |
| 3-hydroxybutyrate (au)                                     | 1.00 ± 0.06  | 1.65 ± 0.10  | <b>0.0007</b> | 7        | 1.86     |
| Pyruvate (au)                                              | 1.00 ± 0.10  | 1.22 ± 0.10  | 0.2561        | 7        | 1.21     |
| Glycine/sarcosine (au)                                     | 1.00 ± 0.06  | 0.82 ± 0.04  | 0.0606        | 7        | 1.02     |
| Glutamine (au)                                             | 1.00 ± 0.06  | 1.19 ± 0.09  | 0.1768        | 7        | 1.02     |
| Myo-inositol (au)                                          | 1.00 ± 0.20  | 1.40 ± 0.24  | 0.2155        | 7        | 2.47     |
| Betaine (au)                                               | 1.00 ± 0.08  | 1.37 ± 0.13  | <b>0.0244</b> | 7        | 1.90     |
| Creatinine (au)                                            | 1.00 ± 0.06  | 1.51 ± 0.15  | <b>0.0126</b> | 7        | 1.38     |
| Plasma liquid chromatography-based analysis of amino acids |              |              |               |          |          |
| Alanine (μM)                                               | 597.8 ± 55.1 | 441.1 ± 31.7 | <b>0.0234</b> | 8        | –        |
| Glutamine (μM)                                             | 479.4 ± 54.0 | 631.1 ± 31.3 | <b>0.0356</b> | 8        | –        |

Data are the means ± SEM of indicated individual determinations in hibernating (winter; February) versus active (summer; June) brown bears (*Ursus arctos*). Significant differences between summer and winter (*p*-values < 0.05), are highlighted in bold

Concerning plasma amino acids (Table 1), although the 1.2-fold increase in glutamine levels measured using NMR-based analysis was not significant, specific measurements using liquid chromatography-based assay indicated a significant 1.3-fold increase in glutamine levels during the hibernation period. On the contrary, the levels of plasma alanine were significantly decreased (1.4 times) in hibernating bears.

#### Bear muscle glycogen content and serum fatty acid concentrations are changed during hibernation

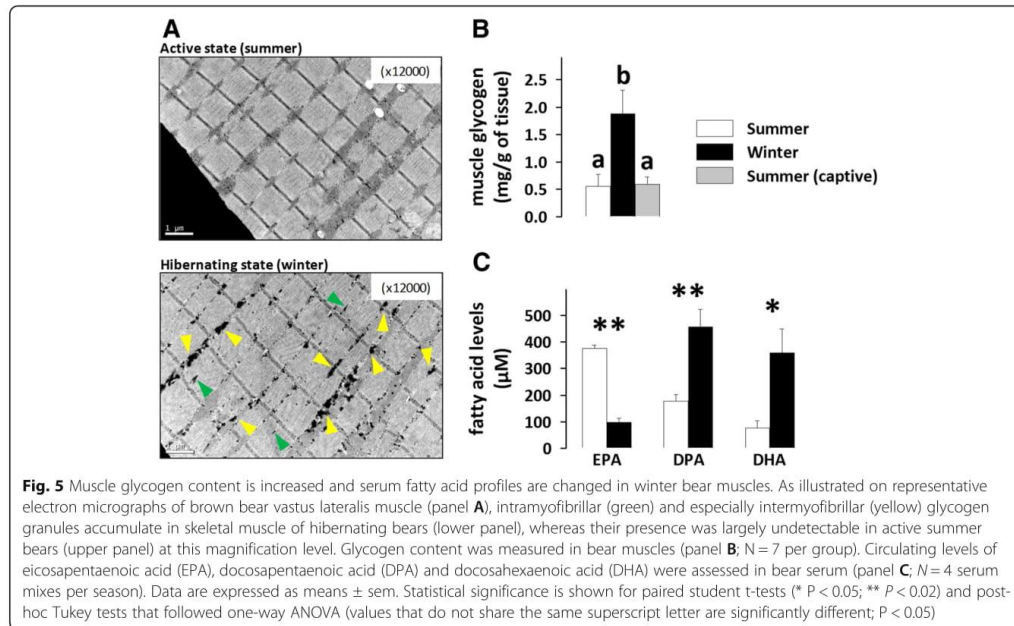
Strikingly, the skeletal muscle glycogen content observed on electron micrographs was higher in hibernating than active bears (Fig. 5A). Assaying muscle glycogen content confirmed this observation, with a significant ~3 times higher level of glycogen in muscle of hibernating bears compared to summer active animals (Fig. 5B). Because muscle glycogen rapidly becomes the most important substrate source to sustain rapid muscle movement during physical exercise [38] and summer bears ran for several minutes during helicopter darting, we hypothesized that this could have caused a lower level of glycogen in their muscle. However, the similar values we measured in summer captive animals, which did not run prior to sampling, invalidated this hypothesis and indicated that

the short run of wild summer bears was not sufficient to provoke significant muscle glycogen depletion.

Lipidomics analysis of polyunsaturated fatty acids (PUFA) highlighted significantly reduced levels of eicosapentaenoic acid (20:5n-3; EPA; 3.8 times) and increased levels of docosapentaenoic acid (22:5 n-3; DPA; 2.6 times) and docosahexaenoic acid (22:6 n-3; DHA; 4.7 times) in the serum of hibernating versus active bears (Fig. 5C).

#### Discussion

Hibernation is a physiological fasting state where physical inactivity, metabolic rate depression, and a decrease in core body temperature allow for effective fuel and energy savings sufficient to sustain survival over the winter months. In such a metabolic context, energy supply appears to come primarily from lipid substrate oxidation, whereas glucose oxidation is reduced. However, contrasting data exist about the utilization of lipid versus carbohydrate fuels in the muscle of hibernators (see above in the Introduction section). Our data show that expression and activity levels of lipid oxidizing enzymes were lower in hibernating brown bears, whereas the expression levels of muscle glycolysis enzymes were



higher during hibernation (see Fig. 2 and Additional file 1: Table S1 and Additional file 2: Table S2).

#### ATP production and consumption are tuned down in hibernating bear skeletal muscle

As an energy-saving adaptive strategy, hibernation is characterized by low metabolic rates [2]. As a consequence, metabolic fuel consumption and ATP turnover should be decreased throughout the body of hibernators, and in their muscles in particular.

The general decrease in protein abundance of subunits of the five complexes of the mitochondrial respiratory chain, measured here in muscles of hibernating brown bears (Figs. 2 and 3), extends transcriptomics data previously reported in hibernating American black bears (*Ursus americanus*) [28]. These regulations could lead to a reduced capacity for ATP production in skeletal muscles of hibernating bears, which could be linked to the reduced energy demand during the hibernation period.

Since the functional coupling between oxidative phosphorylation and the mitochondrial creatine kinase system has been previously reported [39], it was not surprising to see the generally reduced expression levels of CKMT2, as well as of associated proteins like the porins VDAC1 and 2 and ADP/ATP translocases (SLC25A4 and 6). Interestingly, mitochondrial cytochrome c oxidase (COX, complex IV) activity was lower in muscles

of hibernating versus active bears, independent of assay temperature (Fig. 3). This decreased activity of COX could be related to the decreased amount of muscle COX protein during hibernation. These results further support an overall reduction in muscle ATP synthesis capacity in hibernating bears.

A decrease in abundance of all proteins of the tricarboxylic acid cycle along with a reduction in citrate synthase (CS) activity levels was also seen in bear skeletal muscle in the winter, likely reflecting a lower mitochondrial content. From samples collected in a given period (i.e. summer or winter), the assay temperature did not affect CS nor COX activity levels, which were quantified as maximal velocity (Vmax). These results are in line with the fact that the COX to CS activity ratio was not different between seasons, independent of assay temperature, and suggest that the intrinsic maximal oxidative capacity of winter mitochondria does not differ from that of summer mitochondria. This is consistent with previous results showing either a modest reduction in the respiration rates of mitochondria isolated from skeletal muscle of thirteen-lined ground squirrels during torpor compared with interbout euthermia [40] or no change in mitochondria from muscles of hibernating versus summer-active arctic ground squirrels [41]. We observed higher COX/CS values in bears when assays were performed at 33 °C than 37 °C. At winter body temperature, this could enable skeletal muscles to rapidly increase their ATP output

whenever muscle work is required, e.g. if the integrity of the hibernaculum is no longer maintained in the middle of winter and the bear must find a more safe and suitable den. Altogether, these results indicate that suppression of bear muscle mitochondrial respiration during hibernation likely results in a decreased mitochondrial content and suppressed electron supply to the respiratory chain.

Ion pumping through the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases is a major ATP-consuming process in mammal cells [42]. In muscles of golden-mantled ground squirrels, reduced levels of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase activity during hibernation were reported to possibly be due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase A (PKA) [43]. We did not detect subunits of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase in either summer-active or in hibernating bear muscles. However, we observed increased levels of PKA during the winter that could potentially be involved in repressing activity of bear muscle  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, and other enzymes that are sensitive to PKA regulation, during hibernation (Fig. 2). In addition, obscurin (OBSCN) has been shown to interact with  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase [44], and, although its ability to phosphorylate  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase has not been demonstrated in vitro, its increased levels in muscle of hibernating bears make it a possible candidate for modulating ion pump activity. Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) has also been shown to be repressed, both in activity and protein levels in skeletal muscle of the long-tailed ground squirrel (*Urocyon undulatus*) during winter [45]. We found that the abundance of the three SERCA isoforms did not change in the muscle of hibernating bears, but we cannot exclude the possibility that SERCA activity could be modulated during hibernation such as by endogenous protein effectors like sarcolipin, by post-translational modifications, or in relation with the lipid composition of the sarcoplasmic reticulum membrane [46, 47].

Reactions of membrane ion pumping systems that imply ATP consumption are generally connected to those catalysed by enzymes producing ATP, e.g. creatine kinase [39]. We observed that cytosolic creatine kinase (CKM) was only slightly more abundant in skeletal muscle of hibernating bears and that mitochondrial CKMT2 levels were reduced. Whether this could modulate creatine/phosphocreatine metabolism remains to be determined. Connected to the metabolism of creatine is that of creatinine [48], and increased plasma creatinine reflects its diminished renal clearance in hibernating brown bears.

Protein synthesis is also an important process that consumes ATP [42]. We know that protein synthesis rates are dramatically decreased in muscles of hibernating bears [14], thus favouring energy sparing. Because betaine has positive effects on lean muscle mass [49], its increased levels in the plasma of hibernating bears may

possibly contribute to reducing muscle protein loss (i.e. minimizing atrophy).

Altogether, our data suggest that ATP production and consumption are turned down in skeletal muscle of hibernating bears, which would help to reduce metabolic rate, while maintaining metabolic balance. To go further, future studies should assess and compare skeletal muscle mitochondrial respiration in hibernating versus summer active bears and examine muscle fiber and mitochondrial responses to various energy substrates in more detail.

#### Lipid oxidation is reduced, but preferred, in hibernating bear skeletal muscle

It is commonly recognized that lipids are the main energy fuel during hibernation. In this situation, triacylglycerols from fat stores are hydrolysed and fatty acids are released into the blood flow. Accordingly, we found that the amounts of total free fatty acids and those of 3-hydroxybutyrate were both elevated in the plasma of hibernating bears, a result consistent with previous studies [50]. This increased availability of circulating lipid fuels offers fat-burning tissues, like skeletal muscle, the possibility to enhance lipid uptake and oxidation, thereby sparing the much more limited reserves of glycogen and glucose.

The transport of circulating fatty acids into muscle cells is facilitated by fatty acid translocase (CD36). Our findings, that the levels of muscle CD36 mRNA and protein remained stable in the bears between summer and winter (Figs. 2 and 3), would suggest that fatty acid entry into muscle cells is not affected by hibernation, although we cannot be conclusive on that point. Once in the cells, fatty acids traffic towards the mitochondria via transport by fatty acid binding proteins (FABP), especially FABP3 in muscle. In the muscle of ground squirrels, upregulation of FABP3 has been reported at both transcript [24, 25] and protein [23] levels during hibernation. Here we identified bear FABP3 in two different protein spots on 2D-DIGE gels, which exhibited a different regulation. This suggests a post-translational regulation of bear FABP3 during hibernation; however we were not able to determine the nature of the post-translational modification at play. To our knowledge, it is not known whether post-translational modifications of FABP3 alter its functions. In particular, we do not know whether such regulation could be linked to its role in fatty acid trafficking and/or possible role in stimulating glucose uptake [51] (see below).

Increased expression of several beta-oxidation enzymes has been reported in the skeletal muscle tissue of hibernating ground squirrels at both the mRNA [25] and protein [22, 23] levels. In black bears, muscle data were available only for the mRNA level and showed either no change [21] or an increase [27] in expression of fatty acid catabolism-related genes during hibernation.



Opposite to these results, we found that abundance of all proteins of the beta-oxidation pathway was decreased in the muscle of brown bears during the hibernation period, except SLC25A20, which remained unchanged (Figs. 2 and 3). The decreased activity of hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH) that we recorded in muscles of hibernating bears further supports a slowing of the beta-oxidation pathway. Such a globally coordinated downregulation of fatty acid catabolizing capacity accords well with lowered TCA and respiratory chain rates proposed above for hibernating bear muscle. The discrepancy with changes in mRNA levels in black bear muscles may reflect a drop in translational regulation, rather than an increase in transcription rates, in line with globally lower protein synthesis rates in hibernating bear muscles [14]. By contrast, the upregulated expression of beta-oxidation factors in the muscle of hibernating ground squirrels [22, 23] could be a mechanism that helps to sustain a certain level of activity despite very low body temperatures (often near 0 °C) while in hibernation.

Although we argue above for a diminished capacity for oxidation of fatty acids, we do not question the bear's reliance on lipids as the main fuel source for muscle ATP generation during hibernation. Indeed, as is the case for hibernating thirteen-lined ground squirrels [34], a disruption of carbohydrate use for fuelling the TCA cycle also appears to occur in hibernating bears, as corroborated by the upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDK4) and concomitant downregulation of pyruvate dehydrogenase (PDHA1 and B).

#### **Glycolysis appears to be maintained in hibernating bear skeletal muscle**

During hibernation in animals such as ground squirrels, contrasting data have been reported concerning muscle oxidation of glycolytic intermediates. A number of studies have reported data supporting a decrease in glycolysis rate with downregulation of several glycolytic enzymes, at the mRNA [25, 26, 28], protein [22, 23] or activity [29] levels. Others studies have reported, on the contrary, that the post-translational regulation of PDH and PGM1 would favour glycolysis maintenance during hibernation in thirteen-lined ground squirrels [23, 37]. In previous studies of hibernating bears, only results at the mRNA level were available, which showed reduced expression of several glycolytic genes [27, 28]. Our results (Figs. 2 and 4) show a global increase in the abundance of all glycolytic enzymes in the skeletal muscle of hibernating brown bears, except for GLUT4 and hexokinase (that were not detected) and ATP-dependent 6-phosphofructokinase (PFKM; unchanged). Such adjustments would be in line with a possible increase in the capacity of hibernating bear muscle for glycolysis, or

at least its maintenance, if we also consider the unmodified activity of pyruvate kinase (PKM) that we observed between seasons. Taking into account the above-mentioned block in the mitochondrial conversion of pyruvate to acetyl-CoA, it could be hypothesized that glycolysis is oriented more toward lactate production in hibernating brown bear skeletal muscles. Interestingly, previous data have shown that anaerobic glycolysis is increased in cardiac muscle of ground squirrels during hibernation [52]. Absolute values for LDH activity are lower when the assay is performed at 33 °C versus 37 °C. However, the activity of LDH measured at 37 °C in summer muscles was not significantly different from that of winter muscles measured at 33 °C. This may reflect a certain maintenance of LDH activity, which could help maintain the capacity for anaerobic glycolysis during hibernation. In skeletal muscles, lactate transport across the plasma membrane is essentially done via monocarboxylate transporters 1 and 4 (SLC16A1 and SLC16A3). Decreased gene expression of SLC16A3 may be another clue that anaerobic glycolysis is regulated in hibernating bear muscles. Comparing lactate levels in skeletal muscles of winter and summer bears in future studies will help to better understand the glycolytic flux during hibernation.

Hence, our results suggest that glycolytic capacity is retained in muscle, which could allow a rapid muscle response if the bear is disturbed and arouses.

#### **What are the possible sources of glucose during hibernation in bears?**

If glycolytic capacity is retained in skeletal muscle of hibernating bears, an adequate availability of glycolytic substrates should be ensured during hibernation. Accordingly, plasma glucose levels tended to be increased during hibernation in our study and statistical significance has even been reached in previous studies [50]. During hibernation, glucose can be derived from mobilization of glycogen stores and from gluconeogenesis that occurs mainly in the liver. The main substrates for liver gluconeogenesis are glycerol, lactate, and alanine. Although glycerol is released by white adipose cells due to lipolysis and although muscle lactate formation is hypothesized to increase (see above), we found that plasma levels of glycerol remained unchanged during hibernation (Table 1 and Fig. 4) and, as previously reported [53], circulating lactate levels were lower in hibernating brown bears (Table 1). These results, together with the upregulation of liver gluconeogenesis-related genes seen previously in hibernating bears [54], strongly suggest that the uptake of glycerol and lactate by liver cells for fuelling the gluconeogenic pathway is sufficient to not only mask any increased release by peripheral tissues, but also to even be responsible for decreased

circulating lactate levels. Alternatively, it could be that lactate levels were higher in summer-active bears, with the possible superimposed effect of the short run when the helicopter approached, as suggested in a previous study [53]. Concerning alanine, its decreased plasma levels in hibernating bears (Fig. 2) could be a combination of its uptake by the liver and a lower formation rate, due to decreased protein turnover [14]. In this regard, we also observed that alanine aminotransferase 1 (ALAT1) levels were reduced in bear muscles during winter, suggesting that alanine formation is affected during hibernation. Finally, liver gluconeogenesis could also be fuelled by amino acids produced from a certain degree of protein degradation, although atrophy remains limited. Gluconeogenesis can also be achieved by the kidneys, especially from lactate and glutamine as the main substrates [55]. Increased glutamine plasma levels in hibernating bears could, at least in part, be due to its lesser utilization by the kidney. This would agree with a reduction of kidney activity during hibernation [56]. This might also be related to bear urea nitrogen recycling during hibernation [57] since glutamine is the major amino acid in the blood that provides inter-organ transport of nitrogen (and ammonia).

The regulation of muscle enzymes of glycogen metabolism that we observed here suggests that muscle glycogen stores are dynamically regulated in hibernating animals. We actually found higher glycogen levels in the muscles of brown bears during hibernation than in summer (Fig. 5), similar to a recent report on American black bears [58], whereas only a non-significant trend toward such a seasonal change was observed in hibernating ground squirrels [59]. Although we cannot determine exactly when glycogen deposits are made into muscle, this could provide an easy source of glucose for muscle glycolysis during hibernation.

Beneficial effects on health are generally triggered by n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) and we suggest they could be extended to the hibernation state. Indeed, docosahexaenoic acid (DHA) has been reported to elevate glycogen stores [60] and enhance the expression of glucose uptake-related genes [61] in laboratory mouse muscles. DHA also appears to prevent fasting-induced muscle atrophy [60] and fight against sarcopenia [62], induce muscle protein synthesis [63] and prevent palmitate-induced proteolysis [64]. In an earlier study, we found no difference in levels of eicosapentaenoic acid (EPA) in skeletal muscle tissue of hibernating bears, but its plasma levels were decreased [65]. We extend these results here by showing the rise in circulating concentrations of docosapentaenoic acid (DPA) and DHA in

hibernating compared to active brown bears (Fig. 5). Hence, the rise in DHA levels could mediate, at least in part, several of the bear muscle responses to hibernation that we have reported and discussed in this study.

## Conclusions

The objective of this study was to examine how energy and fuel metabolism are regulated in the skeletal muscle of hibernating brown bears. Through quantification of proteins involved in energy and fuel metabolism and using assays of enzyme activities, we found that bear muscle metabolism is dominated by reduced ATP turnover, with lipids being the preferred fuels, but their rate of oxidation being reduced during hibernation due to and/or contributing to metabolic rate depression. Concomitantly, glycolysis appears to be maintained and it could be fuelled from liver gluconeogenesis and the mobilization of large muscle glycogen stores, although we cannot conclude definitely on that point. Such metabolic regulations no doubt favour energy savings while maintaining hibernating bear muscle proteins, which may enable bears to react quickly in the case of unexpected disruption or early arousal from hibernation. A potential role of n-3 PUFAs could be hypothesized. To go further in understanding muscle metabolism during bear hibernation, mitochondria are the next target to explore using, e.g., high-resolution respirometry and evaluation of the response to various substrates.

## Methods

### Bear sample collection

Samples were collected from 37 free-ranging brown bears (*Ursus arctos*; 26 females and 11 males) from Dalarna and Gävleborg counties, Sweden, from 2011 to 2018. The animals were two (23 bears) or three (14 bears) years old. In a given year, the bears were captured during hibernation (February) and recaptured during their active period (June). The mean body mass of hibernating ( $45.9 \pm 2.7$  kg) versus summer active ( $42.9 \pm 2.2$  kg) bears was not significantly different (paired t-test,  $p = 0.06$ ). Bear immobilization was performed as previously described [53, 66]. Blood samples were collected from the jugular vein within 20 min after darting, either in tubes containing a clotting activator (Vacurette® Z serum Sep Clot Activator, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria) or in tubes with spray-coated K<sub>2</sub>EDTA (BD Vacutainer®, FisherScientific, Illkirch, France). Tubes were centrifuged (3000 g, 20 min) within 1 h after sampling and the serum or plasma was immediately frozen on dry ice until storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Biopsies of the vastus lateralis muscle were collected at the same time and immediately frozen on dry ice until storage at



– 80 °C. The study was approved by the Swedish Ethical Committee on Animal Experiment (applications #C212/9, #C47/9, #C7/12, #C268/12, and #C18/15), the Swedish Environmental Protection Agency (NV-0758-14), and the Swedish Board of Agriculture (31-11,102/12). All procedures complied with Swedish laws and regulations.

Additionally, we obtained samples of skeletal muscle tissue (vastus lateralis) from two euthanized captive brown bears stored and provided by the Norwegian Veterinary Institute, and from 5 brown bears euthanized at Orsa Predator Park, Sweden (permit N° Dnr5.8.18-06068/2017). Upon euthanization, these seven bears were active, i.e. not hibernating, and are referred to as ‘summer captive’ animals in this study.

#### Sample pre-processing for proteomics-based analyses

Frozen muscle bear biopsies ( $N = 7$  per season) were pulverized using a laboratory ball mill (Mikrodismembrator; Sartorius). The resulting powders were used for running complementary proteomics approaches.

#### Mass spectrometry-based quantitative analysis of bear muscle proteome

Ground muscle powders were suspended in a buffer composed of 8 M urea, 2 M thiourea, 4% Chaps, 1% dithiothreitol, 0.05% TLCK and 0.02 to 2 mM protease inhibitors. These were then sonicated (10 s, 135 watts) on ice, followed by addition of nine volumes of cold acetone; samples were then kept at – 20 °C overnight. Precipitated proteins were pelleted by centrifugation (10 min, 4 °C, 14000 g), and after discarding supernatants, the pellets were vacuum-dried (Speedvac, ThermoFisher Scientific; Rockford, IL, USA) and then dissolved in a buffer composed of 8 M urea, 2 M thiourea, 4% Chaps, 0.05% TLCK and 0.02–2 mM protease inhibitors in 30 mM Tris (pH 8.8). Protein concentration in protein extracts was measured using the Bradford protocol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). At this stage, one sample pool, comprising equal amounts of all muscle protein extracts, was generated for quality assessment of LC-MS/MS.

Aliquots of 10 µg of bear proteins (individual samples and sample pool) were precipitated with acetone (9 volumes) during 2 h at – 20 °C. After centrifugation (10 min, 15,000 g), protein pellets were solubilized in sample buffer (50 mM Tris pH 6.8, 1 mM EDTA, 5% β-mercaptoethanol, 2.5% SDS, 10% glycerol and 0.1% Bromophenol blue), and incubated at 95 °C for 5 min. Electrophoresis was performed using polyacrylamide gels. Sample preparation was performed in duplicate for each bear muscle extract. After colloidal Coomassie blue staining (G250, Fluka, Buchs, Switzerland), five protein bands (2 mm each) were excised from the gels. Proteins were in-gel reduced and alkylated using an automatic

pipetting device (MassPrep, Waters) and digested overnight with trypsin (Promega, Madison, WI, USA) at an enzyme-to-protein-ratio of 1:100. Peptides were extracted in 60% acetonitrile/0.1% formic acid in water for 1 h, at 450 rpm on an orbital shaker. Organic solvent was finally removed in a Speedvac and samples were adjusted to 30 µl with 1% acetonitrile containing 0.1% formic acid.

Tryptic peptides (3 µL aliquots) were analysed on a UPLC-system (nanoAcquity, Waters, Milford, MA, USA) coupled to a quadrupole-TOF hybrid mass spectrometer (maXis 4G; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Injection of individual samples was performed in duplicate. The instrument was controlled by Bruker compass Hystar (v3.2) and OtofControl (Rev3.2). The solvent system consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). Each sample was first concentrated/desalted on a trap column (Symmetry C18, 180 µm × 20 mm, 5 µm; Waters) at 1% B at a flow rate of 5 µl/min for 3 min. Afterwards, peptides were eluted from the separation column (BEH130 C18, 75 µm × 250 mm, 1.7 µm; Waters) maintained at 60 °C using a 60 min gradient from 8 to 35% B at a flow rate of 450 nl/min. The mass spectrometer was operated in positive mode, with automatic switching between MS and MS/MS scans. The source temperature was set to 160 °C with a spray voltage of – 4.5 kV and dry gas flow rate of 5 l/min. External mass calibration of the ToF (MaXis 4G) was achieved before each set of analyses using Tuning Mix (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) in the mass range of 322–2722 m/z, and mass correction was achieved by recalibration of acquired spectra to the applied lock mass using hexakis (2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)phosphazine ( $[M + H]^+$  922.0098 m/z). The MS acquisition time was set to 0.4 s, and MS/MS acquisition time to a range from 0.05 s (intensity > 250,000) to 1.25 s (intensity < 5000), and ions were excluded after acquisition of one MS/MS spectrum with release of exclusion after 0.2 min. Up to 10 most intense multiply charged precursors per MS scan were isolated, using an isolation window adapted to the isolated m/z (2–5 m/z), then fragmented using energy collisional dissociation. The sample pool (quality control) was repeatedly analyzed throughout the whole duration of these experiments to enable verification of the stability of the nanoLC-MS/MS system and reproducibility of the quantitative measurements.

MS raw data were processed using MaxQuant (v1.5.3.30) [67]. Peak lists were searched using the decoy mode (revert) of the Andromeda search engine implemented in MaxQuant against a protein database created using the MSDA software suite [68]. The database contained bear protein sequences (UniprotKb; Taxonomy ID: 9632; downloaded in September 2017) to which

sequences of common contaminants (e.g. trypsin and keratins) were automatically added via MSData and MaxQuant. Regarding search parameters, MS tolerance was set to 0.07 Da for the first search and 0.006 Da for the main search. MS/MS tolerance was set to 40 ppm. A maximum number of two missed cleavages was accepted, and carbamidomethylation of cysteine residues was set as fixed modification, while acetylation of protein N-termini and oxidation of methionine residues were set as variable modifications. False discovery rates (FDR) were set to 1% for both peptide spectrum matches (minimum length of 7 amino acids) and proteins. The final list of identified proteins did not consider common contaminants, which were removed. Regarding quantification, data normalization and estimation of protein abundance was performed using the MaxLFQ (label free quantification) option implemented in MaxQuant [67]. MaxLFQ quantification was applied using a minimal ratio count of two. Both unmodified and modified (acetylation of protein N-termini and oxidation of methionine residues) peptides were considered for quantification. All other MaxQuant parameters were set as default. After having checked the reproducibility of technical replicates, their median value was calculated for each individual sample. Then, only proteins with at least five of seven values per season (i.e. accepting a maximum of 2 missing values) were retained for further analysis, as well as “present/absent” cases (i.e. 0 values in the samples from one of the two seasons). A total of 725 bear muscle proteins were identified robustly, of which 538 fulfilled the above-mentioned criteria (Additional file 1: Table S1). To retain only the proteins with a highly reproducible quantification, we compared replicate injections and then replicate preparations of individual samples and 383 proteins were found to comply with such stringency.

Regarding quality controls, we considered only peptides detected in at least eight of the ten repeated injections of the sample mixes. The mean coefficient of variation (CV) of retention times of the peptides of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, chosen as a common housekeeping protein, was 3.3%. In addition, the median coefficient of variation for LFQ values from all proteins across repeated injections of sample mixes was 25%. These different values indicate good stability of the nanoLC-MS/MS system over the whole duration of the analyses, and also good reproducibility of protein abundance determination.

#### Gel-based quantitative analysis of bear muscle proteome

Ground muscle powders were dissolved in a denaturing solution (urea 7 M, thiourea 2 M, Chaps 4%, DTT 1%, protease inhibitors 0.02 to 2 mM, TLCK 0.0005%) and protein extraction was performed by incubation one

hour at room temperature followed by sonication on ice (10 s., 135 W). Proteins were then acetone-precipitated overnight at  $-20^{\circ}\text{C}$  using nine volumes of cold acetone and pelleted by centrifugation (15 min, 14,000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ ). After vacuum-drying using a Speedvac ThermoFisher Scientific; Rockford, IL, USA), proteins were dissolved in a solution composed of 7 M urea, 2 M thiourea, 30 mM Tris (pH 8.5) and 4% Chaps. The pH was then adjusted to 8.5, and homogenization was completed by sonication on ice (10 s, 135 watts). After removing cell debris by centrifugation and collection of the supernatant, soluble protein concentrations were determined using the Bradford protocol (Bio-Rad). For each sample, protein profiles were checked on 12% SDS-PAGE acrylamide gels (10  $\mu\text{g}$  loaded; 50 V for 60 min and then 100 V to complete migration) using Coomassie brilliant blue (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA) staining. The similarity of protein profiles between all samples was then verified prior to quantitative DIGE analysis.

Protein samples were labelled using a CyDye DIGE Fluor Minimal Dye Labeling Kit (GE HealthCare, Uppsala, Sweden). CyDyes were first reconstituted in anhydrous N,N-dimethylformamide, then 400 pmol of Cy3 and Cy5 were used to randomly label 50  $\mu\text{g}$  of protein samples from the different groups, and Cy2 (1.2 nmol/150  $\mu\text{g}$  proteins) was used to label a mixture of all the samples (25  $\mu\text{g}$  each) that was used as an internal standard. After incubation in the dark for 30 min on ice, protein labelling was quenched by addition of 10 mM of lysine stop solution and incubation in the dark for 10 min on ice.

Prior to 2D gel electrophoresis, the multiplexing of samples from hibernating and active bears was randomized to avoid any bias. Briefly, 50  $\mu\text{g}$  of Cy2, Cy3 and Cy5-labelled protein samples were mixed and diluted with 7 M urea, 2 M thiourea, 2% Chaps, 2% DTT, 2% ampholytes (GE Healthcare), protease inhibitors and a trace of bromophenol blue. Proteins were then loaded onto 24 cm pH 3-10 non-linear immobilized pH gradient strips (IPG Ready strip, Biorad, Hercules, CA, USA), and left in the dark for passive rehydration over 1 h. Active rehydration was then performed in the dark over 15 h at 50 V using a Protean IEF cell (Biorad). Isoelectric focusing was performed using voltage gradient steps (from 0 to 200 V over 1 h, from 200 to 1000 V over 4 h, from 1000 to 5000 V over 16 h, then 5000 V for 7 h; total of 90000Vh). Focused proteins were then reduced by incubation (15 min) of IPG strips in a solution composed of 1% DTT, 6 M urea, 50 mM Tris pH 8.8, 30% glycerol and 2% SDS. Proteins were alkylated by incubation (15 min) in a solution composed of 2.5% iodoacetamide, 6 M urea, 50 mM Tris pH 8.8, 30% glycerol and 2% SDS. Electrophoresis was carried out using 12.5% polyacrylamide gels (2DGel DALT NF; Serva Electrophoresis



GmbH, Heidelberg, Germany) and a HPE FlatTop Tower (Gel Company, CA, USA). Electrophoresis began with application of 7 mA per gel for 30 min followed by 13 mA per gel for 30 min, then 20 mA per gel for 10 min, 40 mA per gel for 4 h and, finally, 45 mA per gel for 40 min.

Following 2D gel electrophoresis, gels were washed with water and gel images were acquired using an Ettan DIGE Imager (GE Healthcare) at 100  $\mu$ m resolution. Gel images were analysed using the Progenesis SameSpots software (v4.5; Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). After automatic alignment, the quality of spot matching was checked and, when necessary, improved by application of minor manual corrections. After background subtraction and normalization of Cy3 and Cy5 spot volumes to that of corresponding Cy2 spots, the spots highlighted as differential by statistical analysis were excised. Three to four matched spots were put together, and proteins were in-gel reduced and alkylated using a Massprep Station (Waters, MicroMass, Manchester, UK) as previously reported [69]. For in-gel digestion of proteins, 25  $\mu$ L of a 12.5 ng/L trypsin (Promega) solution in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  were added to gel pieces before incubation for 12 h at 37°C. The resulting peptides were extracted using 30  $\mu$ L of a 60% acetonitrile (Carlo Erba, Val de Reuil, France) solution containing formic acid (0.1%). Acetonitrile was removed by vacuum drying using a Speedvac.

Tryptic peptides were analyzed on a UPLC-system (nanoAcquity, Waters) coupled to a quadrupole-TOF hybrid mass spectrometer (maXis 4G; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), exactly as reported above for label-free (XIC) MS-based analyses, except from the elution gradient ( $t = 0$  min 1% B,  $t = 9$  min 35% B,  $t = 10$  min, 90% B) and the fact that isolation and fragmentation was performed here for the 6 most intense multiply charged ions, with exclusion being set to 1 min.

MS/MS data were analysed using the Mascot™ search engine (v2.5.1, Matrix Science, London, UK) installed on a local server. Spectra were searched against a target-decoy version of the same bear protein database that was used for label-free (XIC) MS1-based analyses (see above), to which sequences of common contaminants (e.g. trypsin and keratins) were automatically added using the MSDA software suite [68]. Mascot search parameters included a mass tolerance of 10 ppm in MS and 0.05 Da for MS/MS modes, a maximum of one trypsin missed cleavage allowed, carbamidomethylation of cysteine residues set as fixed modification, and oxidation of methionine residues and acetylation of protein N-termini set as variable modifications. Stringent filtering criteria were applied using Proline software (v2.5.1; <http://proline.profiroteomics.fr/>) to obtain high-confidence identifications (FDR < 1% at both

protein set and PSM level; and a minimal PSM score of 25). Single-peptide-based protein identifications, as well as the identification of common contaminants such as keratin and trypsin, were not considered.

Among the different proteins that were identified in a given spot, only the major (more abundant) ones were considered to be responsible for variations of spot intensities. The determination of major proteins was performed following a “peptide counting” strategy: the higher the number of peptides assigned to a given protein, the more abundant this protein is. We took into account the fact that tryptic sites are followed or not by a proline residue, the possible missed cleavages and the adequate size of peptides for detection by mass spectrometry (i.e., based on our data, peptides of 7 to 32 amino acids). The theoretical number of detectable tryptic peptides was similar for major and minor proteins in a given gel spot, as their ratio was of  $1.0 \pm 0.1$ . However, major proteins were identified with an experimental number of peptides  $4.1 \pm 1.6$  times higher than minor ones.

#### Quantitative RT-PCR analyses in bear muscle

Total RNA was isolated from bear muscle ( $N = 8$  per season) using TRIzol reagent (Invitrogen, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions. First-strand cDNAs were synthesized from 1  $\mu$ g of total RNA using PrimeScript RT kit (Ozyme, Saint Quentin en Yveline, France) with a mixture of random hexamers and oligo(dT) primers and treated with 60 units of RNaseH (Ozyme). Real-time PCR assays were performed with Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Courtaboeuf, France). Different primers were used for fatty acid translocase (CD36; forward: 5'-CAGACAGTTTTGGATCTTTG-3'; reverse: 5'-CTGGGTTACATTTTCCTTGG-3'), aquaporin 7 (AQP-7; forward: 5'-AGATGGTGCGAGAGTTCCTG-3'; reverse: 5'-TGACTCCGAAGCCAAAACC-3'), monocarboxylate transporter 1 (MCT1 or SLC16A1; forward: 5'-GTTGGTGGCTGCTTGTCAGG-3'; reverse: 5'-TTCAAGTTGAAGGCAAGCCC-3') and monocarboxylate transporter 4 (MCT4 or SLC16A3; forward: 5'-AGCTCATGCGTGAGTTTGGG-3'; reverse: 5'-CCAAAGCGGTTACGCACAC-3'). The results were normalized to mRNA levels of TATA box binding protein (TBP; forward: 5'-AGACCATTCACCTTCGTGCC-3'; reverse: 5'-CCTGTGCACACCATTTTCCC-3') used as a reference gene in each sample.

#### Western-blot analyses in bear muscle

Proteins were extracted from bear muscle ( $N = 12$  per season) using ice-cold lysis buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, glycerol 5%, NP 40 1%, EDTA 5 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, NaF 20 mM and DTT 1 mM) supplemented with protease inhibitor cocktail

(Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Homogenization was performed using a Precellys homogenizer (Bertin Instruments, Montigny-le Bretonneux, France) with three shaking cycles of 30 s at 6800 rpm followed by 5 min at 4 °C. After centrifugation (15 min, 12,000 g), protein concentration in the supernatant was determined by Bradford quantification.

Western blotting was performed as previously described [70]. After loading 20 µg of total protein into each well of SDS-PAGE gels, electrophoresis and electroblotting to PVDF membrane were carried out. Membranes were blocked with 4% BSA (Bovine Serum Albumin, Euromedex, Souffelweyersheim, France) and then probed with primary antibodies purchased from Abcam (rabbit anti-CD36: #ab133625; mouse cocktail anti-OXPHOS [oxidative phosphorylation]: #ab110413; both used at 1/1000), and Santa Cruz Biotechnology (rabbit anti-HADH: #sc292196; goat anti-citrate synthase: #sc242444; both used at 1/1000). Corresponding secondary HRP antibodies from BioRad (goat anti-rabbit IgG (H + L)-HRP conjugate: #1721019; goat anti-mouse IgG (H + L)-HRP conjugate: #1721011; rabbit anti-goat IgG (H + L)-HRP conjugate: #1721034; all used at 1/10000) were used for chemiluminescence visualization (Chemidoc; Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

#### Glycogen content and enzyme activity measurements in bear muscle

Glycogen content, pyruvate kinase (PK), and lactate dehydrogenase (LDH) activities were quantified in bear muscle ( $N = 7$  per season) using commercial kits (#MAK016, #MAK072 and #MAK066, respectively) from Sigma Aldrich. Assays were performed according to manufacturer's instructions, using 20, 3 and 0.3 µg of total protein, respectively.

Citrate synthase (CS) and cytochrome c oxidase (COX) activities were measured as described previously [71], using 10 µg of total protein.  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD) activity was measured in the same homogenates using 10 µg of protein. The reaction was performed in 1 ml of reaction buffer containing HEPES 20 mM, EGTA 1 mM, KCN 1 mM, and NADH 0.15 mM, pH = 7.4 at 25 °C. Assays were started by the addition of 0.1 mM acetoacetyl-CoA and the oxidation of NADH was measured at 340 nm.

#### Metabolite assays and amino acid measurements in bear plasma

Levels of metabolites and amino acids were assessed in bear plasma ( $N = 6-8$  per season, except from glycerol assays performed in  $N = 25$  per season). Plasma free fatty acids and lactate were determined enzymatically using kits from Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, UK), and glycerol, glucose, and triacylglycerol levels were assessed

using kits from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA), Sigma Diagnostics (St. Louis, MO, USA) and Biolabo SAS (Maizy, France), respectively.

After deproteinization of 250 µL of plasma with sulfosalicylic acid (Sigma Diagnostics), circulating amino acid concentrations were determined by ion-exchange chromatography followed by a postcolumn derivatization with ninhydrin (Hitachi L8900, ScienceTec, Villebon-sur-Yvette, France).

#### NMR-based analysis of bear plasma metabolome

For  $^1\text{H}$  NMR profiling, 100 µL of each plasma sample ( $N = 7$  per season) was first evaporated using a vacuum concentrator (SpeedVac, ThermoFisher Scientific) and further dissolved in 100 µL of  $\text{D}_2\text{O}$  (99.96% minimum; Eurisotop) and 100 µL of 300 mM phosphate buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7.06; Fluka). The final analytical sample (200 µL) contained 10% phosphate buffer (30 mM) and TSP- $\text{d}_4$  (3-(trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3- tetra- $\text{d}_4$  acid sodium salt 0.5 mM, 98% deuterated; Sigma-Aldrich) in  $\text{D}_2\text{O}$  was filled in Shigem 5 mm symmetrical NMR microtube assembly (Sigma-Aldrich).

For 2D NMR identification, all the previous samples were pooled, then evaporated and further dissolved in 600 µL  $\text{D}_2\text{O}$  before filling a 5 mm NMR tube (Norell, Eurisotop).  $\text{D}_2\text{O}$  was used for shimming and locking, whereas TSP- $\text{d}_4$  constituted a reference for chemical shifts (0 ppm) for  $^1\text{H}$  NMR.

One-dimensional  $^1\text{H}$  NMR experiments (i.e. profiles) were conducted on a Bruker Avance 500 MHz equipped with a 5-mm inverse-triple tuned (TXI)  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  with z-gradient coil probe (Bruker Biospin Wissenbourg, France). For each profile, two standard monodimensional sequences were acquired. The nuclear overhauser effect spectroscopy sequence (noesygppr1d with water presaturation and gradients) and the Carr-Purecell-Meiboom-Gill sequence (cpmgpr1d with water presaturation) were used with low power irradiation of the water resonance during the recycle delay of 4 s and the mixing time of 10 ms. For the cpmgpr1d sequence the echo time was fixed to 70 ms. For all the spectra, 512 scans were collected with a 90° impulsion time of 9.75 µs, an acquisition time of 3.3 s, a spectral window of 10,000 Hz and 64 K data points zero-filled to 128 K before Fourier transformation with 0.3 Hz line broadening. Spectra were treated with Topspin version 3.1. All NMR spectra were recorded at 300 K. For the identification of metabolites in the pooled sample, we used the NMR spectrometer at the TGIR NMR Facility (TGIR-RMN-THC Fr3050 CNRS- Gif/Yvette, France), a Bruker Avance III 950 MHz equipped with a 5 mm TCI ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$ ) cryoprobe with z-gradient coil probe (Bruker Biospin). For 1D  $^1\text{H}$ -Spectra, a standard one dimensional spectroscopy sequence (noesygppr1d) was



used with low power irradiation of the water resonance during the recycle delay of 4 s and a mixing time of 10 ms. For each spectrum, eight scans were collected with a 90° impulsion time of 7.7 μs, an acquisition time of 3.3 s, a spectral window of 10,000 Hz and 64 K data points zero-filled to 128 K before Fourier transformation with 0.3 Hz line broadening. All 2D homonuclear (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H JRES) and heteronuclear (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC and HMQC) experiments were performed with quadrature phase detection in dimensions, using state-TPPI or QF detection mode in the indirect one. For each 512 increments in the indirect dimension, 2 K data points were collected and 32 or 64 transients were accumulated in the direct dimension. A <sup>13</sup>C decoupling (GARP) was performed during acquisition time for heteronuclear experiments. A π/2 shifted square sine-bell function was applied in the both dimensions before Fourier transformation. Spectra were treated with Topspin version 3.5pl5. All NMR spectra were recorded at 300 K.

We divided 1D <sup>1</sup>H-NMR spectra into 10,000 regions (buckets) of 0.001 ppm wide. After reduction over the chemical range of -0.5 to 10 ppm and considering an exclusion area around the residual water signal (4.6 to 5.1 ppm), bucketing was performed using the AMIX software (Bruker GmbH). The signal intensity in each bucket was integrated using the sum intensities mode and spectra were scaled to total intensity. From Noesy and CPMG spectra, the buckets with a VIP score above 1, as revealed by PLS discriminant analysis (PLS-DA), were analyzed deeply (1d and 2d NMR) in order to identify the related metabolites. Identification of the metabolites (VIP buckets) based on the 1D and 2D NMR spectra was done using metabolite databases HMDB [72], BMRB [73] and relevant publications [74–77].

#### Imaging of bear muscle fibers using electron microscopy

Freshly collected muscle biopsies were fixed immediately with 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), then washed using PBS and post-fixed in 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>; Sigma Aldrich). After dehydration in ethanol, followed by incubation in propylene oxide (VWR, Radnor, PA, USA), samples were embedded in Epon (Electron Microscopy Sciences) and kept at 60 °C overnight for polymerization. Ultrathin sections were cut with a Reichert Ultracut S ultramicrotome, stained with uranyl acetate and lead citrate (Merck, Darmstadt, Germany), and examined with a transmission electron microscope (JEOL 1011). Digital images were obtained using GATAN CCD Orius 1000 camera with Digital Micrograph software.

#### Lipidomics analysis of bear serum

We prepared eight different mixes from individual bear sera collected during four successive years (2012–2015),

i.e. one per season per year. Serum mixes consisted of equivalent volumes of 2–7 individual samples collected in a given season and year. Total lipids from bear serum mixes (*N* = 4 per season) were extracted and analyzed, as previously described [78]. Briefly, a double extraction was carried out using ethanol/chloroform (1:2, v/v) after internal standard addition. The organic phases were dried under nitrogen, and samples were treated with toluene-methanol (1:1, v/v) and boron trifluoride in methanol (14%). Lipid transmethylation was then carried out at 100 °C for 90 min in screw-capped tubes. After the addition of 1.5 mL of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 10% water, fatty acid methyl esters were extracted using 2 mL of isooctane and analyzed by gas chromatography (HP6890 instrument equipped with a fused silica capillary BPX70 SGE column; 60 × 0.25 mm). The vector gas was hydrogen. Temperatures of the Ross injector and flame ionization detector were set to 230 °C and 250 °C, respectively.

#### Statistical analysis

Multiple bears were analyzed as biological replicates. Statistical analysis was performed using the R software environment v3.0.2 [79]. Shapiro-Wilk, Bartlett, Welch two sample and paired student t-tests, one-way ANOVA and Tukey tests used the FactoMineR package. Type III ANOVA used several R packages, including lmerTest, lme4, lsmeans, and multcomp. It should be noted that adjustment of *p*-values for multiple testing was done using either the Benjamin-Hochberg (t-tests) or the Bonferroni (ANOVA and Tukey tests) method.

For label-free (XIC) MS1-based analyses, the reproducibility of MaxLFQ values among technical replicates was first checked using one-way ANOVA (*p* > 0.05). For both proteomics approaches, we used the Shapiro-Wilk test (*p*-value > 0.01) to check the normal distribution of MaxLFQ values (XIC) and of normalized spot volumes (2D-DIGE). Homoscedasticity was then tested using the Bartlett test (*p*-value > 0.01). Changes in the abundance of proteins between hibernating and summer-active bears were assessed using Welch two sample t-tests for both proteomics approaches or paired student t-tests only for the 2D-DIGE approach, significance being set to *p*-values < 0.05. Paired student t-tests were not applicable to XIC-derived data because of missing values.

For quantitative RT-PCR and western-blot analyses, as well as metabolites measured using kits, and for amino acid and fatty acid levels, we compared winter and summer seasons using paired student t-tests, with significance being set to *p*-values < 0.05.

For glycogen levels, we used one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey tests to compare values in free-living and captive bears. Significance was set to *p*-values < 0.05 for both ANOVA and Tukey tests.

For enzyme activity measurements, a comparison of seasonal effects at different temperatures used a general linear-mixed effects model (Type III ANOVA with *p*-values for F-tests based on Satterthwaite method and post-hoc Tukey tests for multiple pairwise comparisons); significance was set to *p*-values < 0.05.

Statistical analysis of NMR-derived data was performed using SIMCA 13.0 software. Data matrices were filtrated using the Wilcoxon signed-rank test. A total of 96 buckets from NOESY spectra and 103 from CPMG spectra remained for further multivariate analyses. PCA did not reveal any outliers, and PLS-DA (according to the seasons; Pareto scaling) showed one principal component ( $Q^2_{cum} = 0.797$ ) for NOESY data and one ( $Q^2_{cum} = 0.766$ ) for CPMG data. Validations were made through “900 random permutations” and “observed vs. predicted”. PLS-DA showed VIP scores (i.e. importance into the model) for all buckets. On NOESY data, 11 buckets had a VIP score above 1.5 and 23 buckets above 1. On CPMG data, 11 buckets had a VIP score above 1.5 and 25 buckets above 1. Those buckets were analyzed deeply (1d and 2d NMR) in order to identify the related metabolites. Comparison of the relative abundance of identified metabolites in winter versus summer was performed using paired student *t*-tests, considering significance with *p*-values < 0.05.

#### Bioinformatics analysis of proteomics data

Hierarchical clustering of proteomics data was performed using Cluster v3.0 software [80]. Parameters were set as follows: median centering and normalization of genes for adjusting data and centroid linkage clustering for both genes and arrays. Dendrograms were generated and viewed using the Treeview v1.6.6 program [81].

From the list of identified bear proteins, and in order to benefit from the more complete annotation of the human proteome, Swissprot identifiers of human protein homologues were retrieved using BLAST searches (FASTA program v36; downloaded from [http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta\\_www2/fasta\\_down.shtml](http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml)). Only the best hits were retained, with a minimal sequence similarity of 78% for differential proteins, and their adequacy was checked manually for all proteins. Enrichment and functional annotation analysis of proteomics data was performed using the desktop version of DAVID (Ease v2.1) and an updated version of Gene Ontology (GO) databases (October 2017). Enriched GO terms were filtered by only considering those with an Ease score lower than 0.1, a Benjamini *p*-value lower than 0.01, and a fold enrichment higher than 2. Enriched GO terms were grouped together into broad functional categories, which were then considered as enriched broad functions.

#### Additional files

**Additional file 1: Table S1.** List of vastus lateralis proteins analysed in hibernating (winter) and active (summer) brown bears (*Ursus arctos*) using a MS-based strategy. (XLSX 4373 kb)

**Additional file 2: Table S2.** List of vastus lateralis proteins identified in 2D gel spots, and exhibiting a differential abundance between hibernating (winter) and active (summer) brown bears (*Ursus arctos*). (XLSX 53 kb)

**Additional file 3: Figure S1.** Representative 2D gel image of muscle tissue proteins in bears. (PDF 183 kb)

**Additional file 4: Figure S2.** Representative blots of muscle tissue proteins in brown bears. (PDF 384 kb)

#### Abbreviations

2D-DIGE: Two-dimensional differential in-gel electrophoresis; BLAST: Basic local alignment search tool; DHA: Docosahexaenoic acid; DPA: Docosapentaenoic acid; DTT: Dithiothreitol; EPA: Eicosapentaenoic acid; GO: Gene ontology; IPG: Immobilized pH gradient; MS: Mass spectrometry; MS/MS: Tandem mass spectrometry; MSDA: Mass spectrometry data analysis; NMR: Nuclear magnetic resonance; OXPHOS: Oxidative phosphorylation; PCR: Polymerase chain reaction; PUFA: Polyunsaturated fatty acids; RQ: Respiratory quotient; TOF: Time-of-flight; UPLC: Ultra performance liquid chromatography; XIC: Extracted ion chromatogram

#### Acknowledgments

The authors wish to thank the field capture team (S Brunberg, D Ahlqvist, A Friebe, H Nordin, H Blomgren, S Persson), the Orsa Predator park team and veterinarians K Madslien, J Debenham and T Lien, as well as people involved in amino acid measurements (N Hafnaoui, D Rémond, C Buffière), lipidomics analyses (P Daira), electron microscopy (A Schmitt), bioinformatics analysis (P Guterl), and NMR-based analyses (PFEM team; MetaboHUB). This is scientific paper no. 272 from the SBBRP.

#### Funding

This work was supported by the French Space Agency (CNES), CNRS and Strasbourg University (H2E project; MyoBears project of the PEPS ExoMod program), French Proteomic Infrastructure (ProFI; ANR-10-INSB-08-03, and MetaHUB (French infrastructure in metabolomics & fluxomics; ANR-11-INBS-0010). BC and AZI were supported by grants from the CNES and CNRS, and SC by a grant from the National Swiss Fund. KBS is funded by grants from NSERC Canada. The long-term funding of Scandinavian Brown Bear Research Project (SBBRP) has come primarily from the Swedish Environmental Protection Agency, the Norwegian Environment Agency, the Austrian Science Fund, and the Swedish Association for Hunting and Wildlife Management. Financial support from the TGIR-RMN-THC Fr3050 CNRS is also gratefully acknowledged.

#### Availability of data and materials

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [82] partner repository with the dataset identifiers PXD004908 (MS-based strategy) and PXD011687 (Gel-based strategy).

#### Authors' contributions

SB, EL, and FB conceived the study; BC, AZI, SC, MP, IC, CD, ALE, JMA, EL, and FB performed the experiments; FB analyzed the data; EL and FB wrote the original draft; KBS, AZE, JES, GG-K, CS, SB, EL, and FB reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Ethics approval

The study was approved by the Swedish Ethical Committee on Animal Experiment (applications #C212/9, #C47/9, #C7/12, #C268/12, and #C18/15), the Swedish Environmental Protection Agency (NV-0758-14), and the Swedish Board of Agriculture (31-11,102/12). All procedures complied with Swedish laws and regulations. Additionally, the samples obtained from captive bears had been collected after the animals had been euthanized, and were kindly provided by the



Norwegian Veterinary Institute, and the Orsa Predator Park in Sweden (permit N° Dnr5.8.18-06068/2017).

#### Competing interests

The authors declare no competing interests.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Author details

<sup>1</sup>Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France. <sup>2</sup>Department of Biology, Carleton University, Ottawa, ON K1S 5B6, Canada. <sup>3</sup>CarMen Laboratory, INSERM 1060, INRA 1397, University of Lyon, F-69600 Oullins, France. <sup>4</sup>Department of Forestry and Wildlife Management, Inland Norway University of Applied Sciences, Campus Evenstad, NO-2480 Koppang, Norway. <sup>5</sup>Department of Wildlife, Fish, and Environmental Studies, Swedish University of Agricultural Sciences, SE-901 83 Umeå, Sweden. <sup>6</sup>Department of Environmental and Health Studies, University College of Southeast Norway, N-3800 Bø, Telemark, Norway. <sup>7</sup>Institute of Wildlife Biology and Game Management, University of Natural Resources and Life Sciences, A-1180 Vienna, Austria. <sup>8</sup>Faculty of Environmental Sciences and Natural Resource Management, Norwegian University of Life Sciences, NO-1432 Ås, Norway. <sup>9</sup>Norwegian Institute for Nature Research, NO-7485 Trondheim, Norway. <sup>10</sup>Centre National d'Études Spatiales, CNES, F-75001 Paris, France. <sup>11</sup>Université d'Auvergne, INRA, UNH UMR1019, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France.

Received: 28 January 2019 Accepted: 8 April 2019

Published online: 06 May 2019

#### References

- Carey HV, Andrews MT, Martin SL. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev.* 2003;83:1153–81.
- Ruf T, Geiser F. Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2015;90:891–926.
- Humphries MM, Thomas DW, Kramer DL. The role of energy availability in mammalian hibernation: a cost-benefit approach. *Physiol Biochem Zool.* 2003;76:165–79.
- Manchi S, Swenson JE. Denning behaviour of Scandinavian brown bears *Ursus arctos*. *Wildl Biol.* 2005;11:123–32.
- Hissa R, Siekkinen J, Hohtola E, Saarela S, Hakala A, Pudas J. Seasonal patterns in the physiology of the European Brown bear (*Ursus arctos*) in Finland. *Comp Biochem Phys A.* 1994;109:781–91.
- Harlow HJ, Lohuis T, Anderson-Sprecher RC, Beck TDI. Body surface temperature of hibernating black bears may be related to periodic muscle activity. *J Mammal.* 2004;85:414–9.
- Geiser F. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:239–74.
- Geiser F. Conserving energy during hibernation. *J Exp Biol.* 2016;219:2086–7.
- Staples JF. Metabolic flexibility: hibernation, torpor, and estivation. *Compr Physiol.* 2016;6:737–71.
- Evans AL, Singh NJ, Friebe A, Arnemo JM, Laske TG, Frobert O, Swenson JE, Blanc S. Drivers of hibernation in the brown bear. *Front Zool.* 2016;13:7.
- Toien O, Blake J, Edgar DM, Grahn DA, Heller HC, Barnes BM. Hibernation in black bears: independence of metabolic suppression from body temperature. *Science.* 2011;331:906–9.
- Stenseth NE, Lutraes PN, Bjørndal V, Dahle B, Fossum KH, Jørgensen P, Johansen T, Neumann W, Opseth O, Ronning O, Steyaert SMJG, Zedrosser A, Brunberg S, Swenson JE. Seasonal and annual variation in the diet of brown bears *Ursus arctos* in the boreal forest of south-central Sweden. *Wildl Biol.* 2016;22:107–16.
- Swenson JE, Adamic M, Huber D, Stokke S. Brown bear body mass and growth in northern and southern Europe. *Oecologia.* 2007;153:37–47.
- Lohuis TD, Harlow HJ, Beck TD. Hibernating black bears (*Ursus americanus*) experience skeletal muscle protein balance during winter anorexia. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2007;147:20–8.
- Tinker DB, Harlow HJ, Beck TD. Protein use and muscle-fiber changes in free-ranging, hibernating black bears. *Physiol Zool.* 1998;71:414–24.
- Hellgren EC. Physiology of hibernation in bears. *Ursus-Series.* 1998;10:467–77.
- Elia M. Organ and tissue contribution to metabolic rate. In: Kinney JM, Tucker HN, editors. *Energy metabolism: tissue determinants and cellular correlates*. New York: Raven Press; 1992. p. 61–80.
- Owen OE, Reichard GA Jr, Boden G, Patel MS, Trapp J. Interrelationships among key tissues in the utilization of metabolic substrate. In: Katzen HM, Mahler RJ, editors. *Advances in modern nutrition. Vol 2. Diabetes, Obesity, and vascular disease: metabolic and molecular interrelationships. Part 2*. New York: Wiley; 1978. p. 517–50.
- Zurlo F, Larson K, Bogardus C, Ravussin E. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J Clin Invest.* 1990;86:1423–7.
- Zurlo F, Nemeth PM, Choksi RM, Sesodia S, Ravussin E. Whole-body energy metabolism and skeletal muscle biochemical characteristics. *Metabolism.* 1994;43:481–6.
- Fedorov VB, Goropashnaya AV, Toien O, Stewart NC, Gracey AY, Chang C, Qin S, Perte G, Quackenbush J, Showe LC, Showe MK, Boyer BB, Barnes BM. Elevated expression of protein biosynthesis genes in liver and muscle of hibernating black bears (*Ursus americanus*). *Physiol Genomics.* 2009;37:108–18.
- Anderson KJ, Vermillion KL, Jagtap P, Johnson JE, Griffin TJ, Andrews MT. Proteogenomic analysis of a hibernating mammal indicates contribution of skeletal muscle physiology to the hibernation phenotype. *J Proteome Res.* 2016;15:1253–61.
- Hindle AG, Karimpour-Fard A, Epperson LE, Hunter LE, Martin SL. Skeletal muscle proteomics: carbohydrate metabolism oscillates with seasonal and torpor-arousal physiology of hibernation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301:R1440–52.
- Hittel D, Storey KB. Differential expression of adipose- and heart-type fatty acid binding proteins in hibernating ground squirrels. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1522:238–43.
- Vermillion KL, Anderson KJ, Hampton M, Andrews MT. Gene expression changes controlling distinct adaptations in the heart and skeletal muscle of a hibernating mammal. *Physiol Genomics.* 2015;47:58–74.
- Yan J, Barnes BM, Kohl F, Marr TG. Modulation of gene expression in hibernating arctic ground squirrels. *Physiol Genomics.* 2008;32:170–81.
- Shimozuru M, Nagashima A, Tanaka J, Tsubota T. Seasonal changes in the expression of energy metabolism-related genes in white adipose tissue and skeletal muscle in female Japanese black bears. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2016;196:19738–47.
- Fedorov VB, Goropashnaya AV, Stewart NC, Toien O, Chang C, Wang H, Yan J, Showe LC, Showe MK, Barnes BM. Comparative functional genomics of adaptation to muscular disuse in hibernating mammals. *Mol Ecol.* 2014;23:5524–37.
- Abnous K, Storey KB. Skeletal muscle hexokinase: regulation in mammalian hibernation. *Mol Cell Biochem.* 2008;319:41–50.
- Soukri A, Valverde F, Hafid N, Elkebbaj MS, Serrano A. Characterization of muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms from eutherian and induced hibernating *Jaculus orientalis*. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1243:161–8.
- MacDonald JA, Storey KB. Purification and characterization of fructose biphosphate aldolase from the ground squirrel, *Spermophilus lateralis*: enzyme role in mammalian hibernation. *Arch Biochem Biophys.* 2002;408:279–85.
- Macdonald JA, Storey KB. Temperature and phosphate effects on allosteric phenomena of phosphofructokinase from a hibernating ground squirrel (*Spermophilus lateralis*). *FEBS J.* 2005;272:120–8.
- Rowles J, Scherer SW, Xi T, Majer M, Nickle DC, Rommens JM, Popov KM, Harris RA, Riebow NL, Xia J, Tsui LC, Bogardus C, Prochazka M. Cloning and characterization of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human. *J Biol Chem.* 1996;271:22376–82.
- Buck MJ, Squire TL, Andrews MT. Coordinate expression of the PDK4 gene: a means of regulating fuel selection in a hibernating mammal. *Physiol Genomics.* 2002;8:5–13.
- Logan SM, Storey KB. Tissue-specific response of carbohydrate-responsive element binding protein (ChREBP) to mammalian hibernation in 13-lined ground squirrels. *Cryobiology.* 2016;73:103–11.
- Bell RAV, Storey KB. Purification and characterization of skeletal muscle pyruvate kinase from the hibernating ground squirrel, *Urocyon richardsonii*: potential regulation by posttranslational modification during torpor. *Mol Cell Biochem.* 2018;442:47–58.
- Wijanayake S, Tessier SN, Storey KB. Regulation of pyruvate dehydrogenase (PDH) in the hibernating ground squirrel, (*Ictidomys tridecemlineatus*). *J Therm Biol.* 2017;69:199–205.

38. Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E, Wolfe RR. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Phys.* 1993;265:E380–91.
39. Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762:164–80.
40. Brown JC, Chung DJ, Belgrave KR, Staples JF. Mitochondrial metabolic suppression and reactive oxygen species production in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012;302:R15–28.
41. Barger JL, Brand MD, Barnes BM, Boyer BB. Tissue-specific depression of mitochondrial proton leak and substrate oxidation in hibernating arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284:R1306–13.
42. Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 1997;77:731–58.
43. MacDonald JA, Storey KB. Regulation of ground squirrel Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity by reversible phosphorylation during hibernation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254:424–9.
44. Hu LY, Kontogianni-Konstantopoulos A. the kinase domains of obscurin interact with intercellular adhesion proteins. *FASEB J.* 2013;27:2001–12.
45. Malysheva AN, Storey KB, Ziganshin RK, Lopina OD, Rubtsov AM. Characteristics of sarcoplasmic reticulum membrane preparations isolated from skeletal muscles of active and hibernating ground squirrel *Spermophilus undulatus*. *Biochemistry (Mosc).* 2001;66:918–25.
46. Stammers AN, Susser SE, Hamm NC, Hlynsky MW, Kimber DE, Kehler DS, Duhamel TA. The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). *Can J Physiol Pharmacol.* 2015;93:843–54.
47. Giroud S, Frare C, Strijkstra A, Boerema A, Arnold W, Ruf T. Membrane phospholipid fatty acid composition regulates cardiac SERCA activity in a hibernator, the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *PLoS One.* 2013;8:e63111.
48. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.* 2000;80:1107–213.
49. Cholewa JM, Guimaraes-Ferreira L, Zanchi NE. Effects of betaine on performance and body composition: a review of recent findings and potential mechanisms. *Amino Acids.* 2014;46:1785–93.
50. Graessli AR, Evans AL, Fahlman A, Bertelsen MF, Blanc S, Arnemo JM. Seasonal variation in haematological and biochemical variables in free-ranging subadult brown bears (*Ursus arctos*) in Sweden. *BMC Vet Res.* 2015;11:301.
51. Kusudo T, Kontani Y, Kataoka N, Ando F, Shimokata H, Yamashita H. Fatty acid-binding protein 3 stimulates glucose uptake by facilitating AS160 phosphorylation in mouse muscle cells. *Genes Cells.* 2011;16:681–91.
52. Burlington RF, Wiebers JE. Anaerobic glycolysis in cardiac tissue from a hibernator and non-hibernator as affected by temperature and hypoxia. *Comp Biochem Physiol.* 1966;17:183–9.
53. Evans AL, Sahlen V, Stoen OG, Fahlman A, Brunberg S, Madslien K, Frobert O, Swenson JE, Arnemo JM. Capture, anesthesia, and disturbance of free-ranging brown bears (*Ursus arctos*) during hibernation. *PLoS One.* 2012;7:e40520.
54. Shimozuru M, Kamine A, Tsubota T. Changes in expression of hepatic genes involved in energy metabolism during hibernation in captive, adult, female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Comp Biochem Phys B.* 2012;163:254–61.
55. Alsahli M, Gerich JE. Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;133:1–9.
56. Jani A, Martin SL, Jain S, Keys D, Edelstein CL. Renal adaptation during hibernation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;305:F1521–32.
57. Singer MA. Vampire bat, shrew, and bear: comparative physiology and chronic renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;282:R1583–92.
58. Riley DA, Van Dyke JM, Vogel V, Curry BD, Bain JLW, Schuett R, Costill DL, Trappe T, Minchev K, Trappe S. Soleus muscle stability in wild hibernating black bears. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2018; 315:R369–79.
59. Tashima LS, Adelstein SJ, Lyman CP. Radioglucose utilization by active, hibernating, and arousing ground squirrels. *Am J Phys.* 1970;218:303–9.
60. Deval C, Capel F, Laillet B, Polge C, Bechet D, Taillandier D, Attaix D, Combaret L. Docosahexaenoic acid-supplementation prior to fasting prevents muscle atrophy in mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2016;7:587–603.
61. Kim J, Carlson ME, Kuchel GA, Newman JW, Watkins BA. Dietary DHA reduces downstream endocannabinoid and inflammatory gene expression and epididymal fat mass while improving aspects of glucose use in muscle in C57BL/6J mice. *Int J Obes.* 2016;40:129–37.
62. Smith GI, Julland S, Reeds DN, Sinacore DR, Klein S, Mittendorfer B. Fish oil-derived n-3 PUFA therapy increases muscle mass and function in healthy older adults. *Am J Clin Nutr.* 2015;102:115–22.
63. Wei HK, Zhou YF, Jiang SZ, Tao YX, Sun HQ, Peng J, Jiang SW. Feeding a DHA-enriched diet increases skeletal muscle protein synthesis in growing pigs: association with increased skeletal muscle insulin action and local mRNA expression of insulin-like growth factor 1. *Brit J Nutr.* 2013;110:671–80.
64. Woodworth-Hobbs ME, Perry BD, Rahnert JA, Hudson MB, Zheng B, Russ PS. Docosahexaenoic acid counteracts palmitate-induced endoplasmic reticulum stress in C2C12 myotubes: impact on muscle atrophy. *Physiol Rep.* 2017;5:e13530.
65. Giroud S, Evans AL, Chery I, Bertile F, Tascher G, Bertrand-Michel J, Gauquelin-Koch G, Arnemo JM, Swenson JE, Lefai E, Blanc S, Simon C. Seasonal changes in eicosanoid metabolism in the brown bear. *Naturwissenschaften.* 2018;105:58.
66. Arnemo JM, Evans AL. Biomedical protocols for free-ranging brown bears, wolves, wolverines and lynx. Report 2017. 2017;<http://bearproject.info/publications/>.
67. Cox J, Hein MY, Luber CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13:2513–26.
68. Carapito C, Burel A, Guterl P, Walter A, Varrier F, Bertile F, Van Dorselaer A. MSDA, a proteomics software suite for in-depth mass spectrometry data analysis using grid computing. *Proteomics.* 2014;14:1014–9.
69. Plumel MI, Stier A, Thierse D, van Dorselaer A, Criscuolo F, Bertile F. Litter size manipulation in laboratory mice: an example of how proteomic analysis can uncover new mechanisms underlying the cost of reproduction. *Front Zool.* 2014;11:41.
70. Dessalle K, Euthine V, Chanon S, Delarichaudy J, Fujii I, Rome S, Vidal H, Nemoz G, Simon C, Lefai E. SREBP-1 transcription factors regulate skeletal muscle cell size by controlling protein synthesis through myogenic regulatory factors. *PLoS One.* 2012;7:e50878.
71. Lefai E, Terrier-Cayre A, Vincent A, Boespflug-Tanguy O, Tanguy A, Alziari S. Enzymatic activities of mitochondrial respiratory complexes from children muscular biopsies. Age-related evolutions *Biochim Biophys Acta.* 1995;1228:43–50.
72. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, Djoumbou Y, Mandal R, Aziat F, Dong E, Bouatra S, Sinelnikov I, Arndt D, Xia J, Liu P, Yallou F, Bjorn Dahl T, Perez-Pineiro R, Eisner R, Allen F, Neveu V, Greiner R, Scalbert A. HMDB 3.0—the human metabolome database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D801–7.
73. Ulrich EL, Akutsu H, Doreleijers JF, Harano Y, Ioannidis YE, Lin J, Livny M, Mading S, Mazziuk D, Miller Z, Nakatani E, Schulte CF, Tolmie DE, Kent Wenger R, Yao H, Markley JL. BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:D402–8.
74. Beckonert O, Coen M, Keun HC, Wang Y, Ebbels TM, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nat Protoc.* 2010;5: 1019–32.
75. Fan TWM, Lane AN. Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR. *Prog Nucl Mag Res Sp.* 2008;52:69–117.
76. Fan WMT. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Prog Nucl Mag Res Sp.* 1996;28:161–219.
77. Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC. 750 MHz 1H and 1H-13C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal Chem.* 1995;67:793–811.
78. Lefils J, Geloën A, Vidal H, Lagarde M, Bernoud-Hubac N. Dietary DHA: time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice. *Br J Nutr.* 2010;104:1304–12.
79. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2008; ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
80. de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics.* 2004;20:1453–4.



81. Page RD. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci*. 1996;12:357–8.
82. Vizcaino JA, Csordas A, del-Toro N, Dianas JA, Griss J, Lavidas I, Mayer G, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Ternent T, Xu QW, Wang R, Hermjakob H. 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:D447–56.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)





*Crédit photo : Dr Fabrice BERTILE*



# *antioxidants*

## Publication 2

Titre : “Limited oxidative stress favours resistance to skeletal muscle atrophy in hibernating brown bears (*Ursus arctos*)”

Auteurs : **Blandine Chazarin**, Anna Ziemianin, Alina L. Evans, Emmanuelle Meugnier, Emmanuelle Loizon, Isabelle Chery, Jon M. Arnemo, Jon E. Swenson, Guillemette Gauquelin-Koch, Chantal Simon, Stephane Blanc, Etienne Lefai, and Fabrice Bertile

Publié : Août 2019

Article

# Limited Oxidative Stress Favors Resistance to Skeletal Muscle Atrophy in Hibernating Brown Bears (*Ursus Arctos*)

Blandine Chazarin <sup>1,2</sup>, Anna Ziemianin <sup>1,2</sup>, Alina L. Evans <sup>3</sup> , Emmanuelle Meugnier <sup>4</sup>,  
Emmanuelle Loizon <sup>4</sup>, Isabelle Chery <sup>1</sup>, Jon M. Arnemo <sup>3,5</sup> , Jon E. Swenson <sup>6,7</sup>,  
Guillemette Gauquelin-Koch <sup>2</sup>, Chantal Simon <sup>4</sup> , Stéphane Blanc <sup>1</sup>, Etienne Lefai <sup>4,8</sup>  and  
Fabrice Bertile <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

<sup>2</sup> Centre National d'Etudes Spatiales, CNES, F-75001 Paris, France

<sup>3</sup> Department of Forestry and Wildlife Management, Inland Norway University of Applied Sciences, Campus Evenstad, NO-2480 Koppang, Norway

<sup>4</sup> CarMen Laboratory, INSERM 1060, INRA 1397, University of Lyon, F-69600 Oullins, France

<sup>5</sup> Department of Wildlife, Fish, and Environmental Studies, Swedish University of Agricultural Sciences, SE-901 83 Umeå, Sweden

<sup>6</sup> Faculty of Environmental Sciences and Natural Resource Management, Norwegian University of Life Sciences, NO-1432 Ås, Norway

<sup>7</sup> Norwegian Institute for Nature Research, NO-7485 Trondheim, Norway

<sup>8</sup> Université d'Auvergne, INRA, UNH UMR1019, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France

\* Correspondence: fberville@unistra.fr; Tel.: +33-368-852681

Received: 1 August 2019; Accepted: 21 August 2019; Published: 22 August 2019



**Abstract:** Oxidative stress, which is believed to promote muscle atrophy, has been reported to occur in a few hibernators. However, hibernating bears exhibit efficient energy savings and muscle protein sparing, despite long-term physical inactivity and fasting. We hypothesized that the regulation of the oxidant/antioxidant balance and oxidative stress could favor skeletal muscle maintenance in hibernating brown bears. We showed that increased expressions of cold-inducible proteins CIRBP and RBM3 could favor muscle mass maintenance and alleviate oxidative stress during hibernation. Downregulation of the subunits of the mitochondrial electron transfer chain complexes I, II, and III, and antioxidant enzymes, possibly due to the reduced mitochondrial content, indicated a possible reduction of the production of reactive oxygen species in the hibernating muscle. Concomitantly, the upregulation of cytosolic antioxidant systems, under the control of the transcription factor NRF2, and the maintenance of the GSH/GSSG ratio suggested that bear skeletal muscle is not under a significant oxidative insult during hibernation. Accordingly, lower levels of oxidative damage were recorded in hibernating bear skeletal muscles. These results identify mechanisms by which limited oxidative stress may underlie the resistance to skeletal muscle atrophy in hibernating brown bears. They may constitute therapeutic targets for the treatment of human muscle atrophy.

**Keywords:** hibernation; brown bears; skeletal muscle; cold response; oxidative stress; NRF2

## 1. Introduction

Hibernation is a natural strategy allowing certain mammals to spare energy and survive harsh cold winters with limited food supply [1,2]. During hibernation, the significant drop in animal's metabolic rate, reduction in heart and respiratory rates, decreased body core temperature, and physical inactivity are key mechanisms that underlie reduced energy utilization [1]. Hence, despite food deprivation,



hibernation can be used for weeks to months depending on how much energy animals have stored during the pre-hibernation period [3]. In a number of hibernators, periodic arousals occur during hibernation and are believed to be necessary returns to euthermia for reversing adverse effects of torpor. Indeed, hibernation/torpor triggers physiological costs, including sleep deprivation [4], decline of synaptic contacts and dendritic branching [5], memory impairment [6], reduced immunocompetence [7], compromised circulation and ionic balance [8], and oxidative stress [1].

Oxidative stress is defined as an imbalance that favors oxidant production over antioxidant protection and leads to disruption in redox signaling and to molecular damage in cells [9]. Aerobic metabolism implies generation of reactive oxygen species (ROS), the main ones being superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydroxyl radical ( $\bullet OH$ ), and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). At low or moderate concentration, ROS play physiological roles, e.g., in immunity [10]. However, ROS are unstable compounds, and when they are present in excess, they may damage biomolecules like nucleic acids, proteins, and lipids. Ultimately, these damages can induce a loss of function and cause cell death [10]. Several antioxidant systems fight oxidative stress in cells, including the glutathione system and antioxidant enzymes to deactivate ROS, and machineries for repair and elimination of damaged molecules [9,11]. Oxidative stress is triggered in relation with a number of conditions, including for example immune cell activation, inflammation, ischemia, infection, cancer, mental stress, food deprivation, and aging [10,12–14]. In skeletal muscles, oxidative stress has been reported to be induced in various disease states [15,16], but also by exercise [17], microgravity conditions [18], fasting [19], and muscle disuse [20]. In these latter examples, oxidative stress has been directly connected to the promotion of muscle proteolysis and inhibition of protein synthesis, thereby contributing to muscle atrophy [20].

The occurrence of oxidative stress during hibernation is a complex and still not fully resolved question. As stated above, hibernation in mammals is most often characterized by periodic arousals, which implies a rapid increase in body temperature and rise in oxygen consumption that may be responsible for increased ROS production. During deep torpor bouts, one can hypothesize that ROS production may either decrease due to low body temperatures and reduced activity of mitochondrial respiration, or increase due to specific alteration of electron transfer at mitochondrial ROS-producing sites. Focusing on steady-state torpor compared to the euthermic active period, oxidative stress has been shown to be induced in the intestinal mucosa of hibernating 13-lined ground squirrels (*Ictidomys tridecemlineatus*) [21], and in red blood cells of the hibernating American black bear (*Ursus americanus*) [22]. An increase in the levels of  $H_2O_2$  in the brain and heart, and of malondialdehyde (a product of lipid peroxidation) in the brain of Daurian ground squirrels (*Spermophilus dauricus*) has been found during hibernation, while antioxidant enzyme expression and/or activity was decreased in the heart, brain, and plasma [23]. Other studies have shown upregulation of some antioxidants during hibernation, supposedly to confer resistance to oxidative stress, like in the brown adipose tissue and liver of hibernating ground squirrels (*Spermophilus citellus*) [24], and in the heart and brain of several species of hibernating bats (*Myotis lucifugus*, *Roussetus leschenaultia*, *Cynopterus sphinx*, and *Myotis ricketti*) [25,26]. In hibernating *I. tridecemlineatus*, a few studies have observed upregulation of antioxidants (expression and/or activity) in the liver, kidney, heart, skeletal muscle, and brown and white adipose tissues [27–33], whereas other studies showed no change in the brain, heart and liver tissues [34,35]. In skeletal muscle of hibernating *I. tridecemlineatus*, it has also been reported that ROS production is decreased [33], and that there is no evidence of oxidative stress [32]. Finally, oxidative stress has been found to be unchanged in the liver but decreased in the brain and, to a lower extent, the brown adipose tissue, from hibernating arctic ground squirrels (*Spermophilus parryi*) [36]. Hence, the regulation of the oxidant/antioxidant balance and oxidative stress appears to largely differ according to the species and tissues considered.

In bears, very few results have been reported concerning oxidative stress during hibernation [22]. By moving to a carbohydrate-rich diet in autumn [37], Swedish brown bears (*Ursus arctos*) accumulate large amounts of fat stores that allow for 6–7 months of hibernation [3,38], during which inactive animals do not eat, drink, urinate, defecate, or exhibit arousal episodes [39,40]. Strikingly, bears lose

a very moderate amount of muscle protein during hibernation [41,42]. It could be hypothesized that the regulation of the oxidant/antioxidant balance and oxidative stress is such that it favors the maintenance of skeletal muscle in hibernating bears. Indeed, bears' body temperature drops by only a few degrees during hibernation [39,43]. This implies that the 75% decrease in metabolic rate that has been recorded in hibernating bears is essentially achieved via active metabolic inhibition, independent of body temperature [44]. The body temperature of hibernating bears (32–34 °C) is also the temperature at which expression levels of cold-inducible proteins CIRBP and RBM3 [45] is maximal, as shown in murine fibroblasts [46], murine organotypic hippocampal slice cultures [47], and human cortical neurons [48]. Accordingly, RBM3 has been reported to be upregulated in skeletal muscle of hibernating black bears [49]. Alleviation of oxidative stress has been attributed to CIRBP in mouse testes, hepatocytes, the neuroblastoma cell line neuro2a, and in rat cortical neurons [50–53], and to RBM3 in human SH-SY5Y neuroblastoma cells and C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> mouse myoblasts [54,55]. Therefore, the aim of this study was to determine if expression of cold-inducible proteins is induced in hibernating brown bear skeletal muscle and to examine the regulation of muscle oxidant/antioxidant balance and oxidative stress.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bear Sample Collection

Twenty free-ranging brown bears (*Ursus arctos*; 12 females and 8 males) were followed in Dalarna and Gävleborg counties, Sweden, from 2013 to 2017. When reaching the age of two (14 bears) or three (6 bears), the animals were captured during hibernation (February) and again during the following summer-active period (June). Immobilization was performed as previously described [56,57], and biopsies of the vastus lateralis skeletal muscle were quickly collected and immediately frozen on dry ice until storage at −80 °C. After surgery, bears were weighed and their mean body mass was found to be higher (paired student *t*-test, *p* = 0.00002) during hibernation (49.3 ± 3.0 kg) versus the summer-active period (42.2 ± 2.6 kg). Number of bears per analyses is quite variable. This is due to the variable size of biopsies collected across years, which depends on the anesthesia tolerance and the rapidity at which the veterinarians decide to work to ensure safety of the bears. The study was approved by the Swedish Ethical Committee on Animal Experiment (applications #C212/9, #C47/9, #C7/12, #C268/12, and #C18/15), the Swedish Environmental Protection Agency (NV-0758-14), and the Swedish Board of Agriculture (31-11102/12). All procedures complied with Swedish laws and regulations.

### 2.2. Proteomics Analysis of Bear Skeletal Muscles

We recently analyzed the vastus lateralis proteome for seven of the twenty bears used in the present study [58]. Here we make use of proteomics data related to oxidative stress that were not detailed by Chazarin et al. [58]. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [59] partner repository with the dataset identifiers PXD004908 (MS-based strategy) and PXD011687 (Gel-based strategy).

Samples from these seven bears were also used for measurement of oxidative damages (MDA-protein adducts, protein carbonyls, and 3-nitrotyrosine levels), and samples from the 13 other bears were used to complement the data using other methods (see below).

### 2.3. Quantitative RT-PCR Analyses in Bear Skeletal Muscle

Total RNA was isolated from bear muscle (N = 8 per season) using TRIzol reagent (Invitrogen, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions. First-strand cDNAs were synthesized from 1 µg of total RNAs using PrimeScript RT kit (Ozyme, Saint Quentin en Yveline, France) with a mixture of random hexamers and oligo(dT) primers and treated with 60 units of RnaseH (Ozyme). Real-time PCR assays were performed with Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Courtaboeuf, France). Different primers were used for cold-inducible RNA-binding protein (CIRBP; forward:

5'-CTGCTCAAGATCGTCCTTCC-3'; reverse: 5'-AGTCTAGTAACGAGGCCATC-3'), RNA-binding protein 3 (*RBM3*; forward: 5'-TGGTCGCAGCTACTCTAGAG-3'; reverse: 5'-CTCTGTAATTTCC TCCTGAG-3'), superoxide dismutase 1 (*SOD1*; forward: 5'-TGAAGAGAGGCATGTTGGAG-3'; reverse: 5'-CCACCTTTGCCCAAGTCATC-3'), glutathione peroxidase 4 (*GPX4*; forward: 5'-TTTACG GATCCTGGCCTTCC-3'; reverse: 5'-CTTGGGCTGGACTTTCATCCE-3'), and uncoupling protein 3 (*UCP3*; forward: 5'-CAATGGATGCCTACAGGACC-3'; reverse: 5'-CATGGATCAAC AACTTCAGC-3'). The results were normalized to mRNA levels of TATA box binding protein (*TBP*; forward: 5'-AGACCATTGCACTTCGTGCC-3'; reverse: 5'-CCTGTGCACACCATTTTCCC-3') used as a reference gene in each sample.

#### 2.4. Western-Blot Analyses in Bear Skeletal Muscle

Proteins were extracted from bear muscle (N = 7 per season for NRF2 and N = 12 per season for other proteins) using ice-cold lysis buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glycerol 5%, NP 40 1%, EDTA 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 20 mM, and DTT 1 mM) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) as previously described [58]. Western blotting was performed as previously described [60], by separating 20 µg of total protein into each well of precast gels (Mini-protean TGX Stain-free™ gel, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After electrophoresis, gels were UV exposed for 3 min and imaged using the Bio-Rad Chemidoc™ system for quantification of protein loading. After semi-dry transfer, all membranes were blocked with 4% BSA (Bovine Serum Albumin, Euromedex, Souffelweyersheim, France) before incubation with primary antibodies. Primary antibodies were purchased from Abcam (rabbit anti-AKR7A2 [aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2]: #ab155528; rabbit anti-CBR1 [carbonyl reductase [NADPH] 1]: #ab174852; rabbit anti-ERP29 [endoplasmic reticulum resident protein 29]: #ab11420; used at 1/1000), and Santa Cruz Biotechnology (mouse anti-NRF2 [nuclear factor, erythroid 2 like 2, also termed NFE2L2]: #sc365949; rabbit anti-catalase: #sc50508; mouse anti-HSP90AB1 [heat shock protein 90 alpha family class B member 1]: #sc-13119; mouse anti-HSPA9 [mitochondrial stress-70 protein, also termed GRP75]: #sc-133137; used at 1/1000; goat anti-β-actin: #sc-1615; used at 1/500). Corresponding secondary HRP antibodies were used for chemiluminescence visualization (Chemidoc; Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

#### 2.5. Enzyme Activity Assays in Bear Skeletal Muscle

Catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) activities were quantified in bear skeletal muscle (N = 5 per season) using commercial assay kits (BioAssay Systems, #ECAT-100 and #EGPX-100, respectively) purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France).

#### 2.6. Reduced and Oxidized Glutathione Assays in Bear Skeletal Muscle

The content of glutathione was measured in bear skeletal muscle (N = 5 per season) using the DetectX® glutathione fluorescent detection kit (Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA).

#### 2.7. Oxidative Damage Measurements in Bear Skeletal Muscle

The content in 3-nitrotyrosine, protein carbonyls, and malondialdehyde (MDA)-protein adducts, was measured in bear skeletal muscle (N = 7 per season) using commercial ELISA kits (#STA-305, #STA-315, and #STA-332, respectively) from Cell Biolabs (San Diego, CA, USA). A commercial ELISA kit (StressMarq Biosciences Inc., #SKT-120-96S) purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France) was used for the quantification of 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine (8-OHdG) in DNA extracted (DNeasy DNA; QIAGEN, Hilden, Germany) from bear skeletal muscle (N = 5 per season).



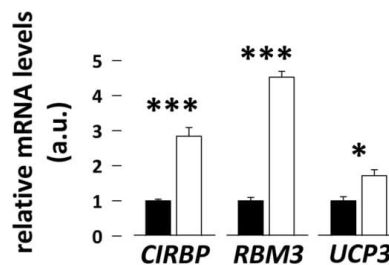
### 2.8. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the R software environment v3.4.0 [61]. For all of the measurements, hibernation was compared to the summer-active period using paired student *t*-tests. Significance was set to *p*-values < 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Gene Expression of Cold-Inducible Proteins and Uncoupling Protein 3 in Bear Skeletal Muscle

Cold-inducible *CIRBP*, *RBM3*, and *UCP3* mRNA levels were 2.8-, 4.5-, and 1.7-fold higher, respectively, in skeletal muscles of hibernating compared to summer-active bears (Figure 1; *N* = 8 per season; paired student *t*-test, *p* = 0.00007, *p* = 0.0000005, and *p* = 0.003, respectively).

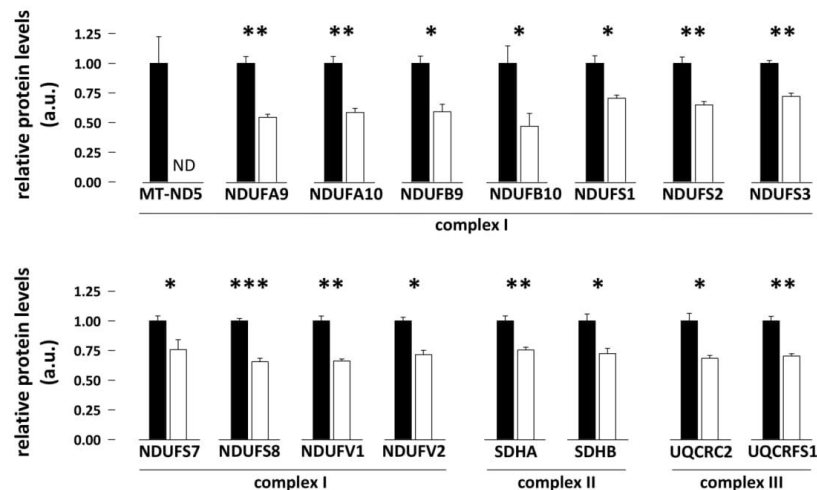


**Figure 1.** Gene expression of cold-inducible proteins and uncoupling protein 3 (UCP3) in bear skeletal muscle. Levels of cold-inducible RNA-binding protein (*CIRBP*), RNA-binding protein 3 (*RBM3*), and *UCP3* were measured using RT-qPCR in vastus lateralis muscle samples from summer-active (black bars) and hibernating (white bars) brown bears. Data (*N* = 8/group) are expressed as means  $\pm$  sem, with values in the hibernating period being normalized to those in the summer-active condition, which were arbitrarily set to 1. Statistical significance is shown for paired student *t*-tests (\* *p* < 0.05; \*\*\* *p* < 0.0001). a.u.: arbitrary units.

### 3.2. Protein Abundance of Subunits of Mitochondrial Respiratory Complexes I, II, and III in Bear Skeletal Muscle

From a proteomics analysis of bear skeletal muscle (vastus lateralis) that we recently published [58], we extracted here detailed data about protein expression levels of subunits of mitochondrial respiratory complexes I, II, and III. We found that the abundance of subunits NDUFA9, NDUFA10, NDUF9, NDUF10, NDUF11, NDUF12, NDUF13, NDUF14, NDUF15, NDUF16, NDUF17, NDUF18, NDUF19, NDUF20, NDUF21, NDUF22, NDUF23, NDUF24, NDUF25, NDUF26, NDUF27, NDUF28, NDUF29, NDUF30, NDUF31, NDUF32, NDUF33, NDUF34, NDUF35, NDUF36, NDUF37, NDUF38, NDUF39, NDUF40, NDUF41, NDUF42, NDUF43, NDUF44, NDUF45, NDUF46, NDUF47, NDUF48, NDUF49, NDUF50, NDUF51, NDUF52, NDUF53, NDUF54, NDUF55, NDUF56, NDUF57, NDUF58, NDUF59, NDUF60, NDUF61, NDUF62, NDUF63, NDUF64, NDUF65, NDUF66, NDUF67, NDUF68, NDUF69, NDUF70, NDUF71, NDUF72, NDUF73, NDUF74, NDUF75, NDUF76, NDUF77, NDUF78, NDUF79, NDUF80, NDUF81, NDUF82, NDUF83, NDUF84, NDUF85, NDUF86, NDUF87, NDUF88, NDUF89, NDUF90, NDUF91, NDUF92, NDUF93, NDUF94, NDUF95, NDUF96, NDUF97, NDUF98, NDUF99, NDUF100 of complex I (NADH dehydrogenase) was generally 1.4–2.1-fold lower in skeletal muscle of hibernating compared to summer-active bears (Figure 2; *N* = 7 per season; paired student *t*-tests, *p* = 0.00042, *p* = 0.00023, *p* = 0.0059, *p* = 0.035, *p* = 0.0015, *p* = 0.00035, *p* = 0.00066, *p* = 0.046, *p* = 0.000015, *p* = 0.00013, and *p* = 0.0012, respectively). Subunit MT-ND5 of complex I was not detectable in the skeletal muscle of hibernating bears. Only NDUFA8, NDUF6, and NDUF4 levels remained unchanged in hibernating versus summer-active bears (*N* = 7 per season; paired student *t*-tests, *p* = 0.68, *p* = 0.61, and *p* = 0.33, respectively). Concerning complex II (succinate dehydrogenase), subunits SDHA and SDHB were significantly 1.3–1.4-fold less abundant in skeletal muscle of hibernating compared to summer-active bears (Figure 2; *N* = 7 per season; paired student *t*-tests, *p* = 0.00078 and *p* = 0.014, respectively). Finally, the levels of subunits UQCRC2 and UQCRC1 of complex III (ubiquinol-cytochrome *c* reductase) were 1.4-fold lower in skeletal muscle of hibernating compared to summer-active bears (Figure 2; *N* = 7 per season; paired student *t*-tests, *p* = 0.0011 and *p* = 0.00095, respectively). Subunit UQCRC1 of complex III was also detected and it was observed that its levels remained stable (*N* = 7 per season; paired student *t*-tests, *p* = 0.19) between hibernation and the summer-active period.

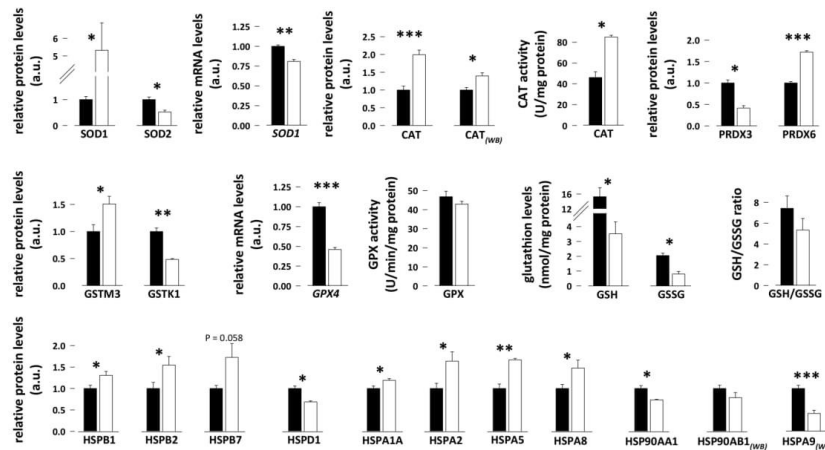




**Figure 2.** Protein abundance of subunits of mitochondrial respiratory complexes I, II, and III in bear skeletal muscle. Levels of subunits of the mitochondrial electron transfer chain (ETC) complex I, II, and III were measured using proteomics in vastus lateralis muscle samples from summer-active (black bars) and hibernating (white bars) brown bears [58]. Data (N = 7/group) are expressed as means  $\pm$  sem, with values in the hibernating period being normalized to those in the summer-active condition, which were arbitrarily set to 1. Statistical significance is shown for paired student *t*-tests (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ ). a.u.: arbitrary units; ND: below the detection threshold.

### 3.3. Expression Levels and Activity of Antioxidant Systems in Bear Skeletal Muscle

Among antioxidant enzymes, we observed that protein abundance of peroxiredoxin-3 (PRDX3) was 2.4-fold lower in skeletal muscle of hibernating compared to summer-active bears (Figure 3; N = 7 per season; paired student *t*-tests,  $p = 0.0023$ ). The opposite was observed for peroxiredoxin-6 (PRDX6) whose abundance was 1.7-fold higher during hibernation (Figure 3; N = 7 per season; paired student *t*-tests,  $p = 0.00000045$ ). Skeletal muscle levels of two other peroxiredoxins, PRDX1 and PRDX2, remained unchanged between hibernating and summer-active animals (N = 7 per season; paired student *t*-tests,  $p = 0.98$  and  $p = 0.15$ , respectively). The mRNA levels of superoxide dismutase [Cu-Zn] (SOD1) were 1.2-fold lower in skeletal muscle of hibernating compared to summer-active bears (Figure 3; N = 8 per season; paired student *t*-test,  $p = 0.00023$ ). Conversely, SOD1 protein levels were 5.3-fold higher in skeletal muscle of hibernating bears (Figure 3; N = 7 per season; paired student *t*-test,  $p = 0.03$ ). The levels of mitochondrial superoxide dismutase [Mn] (SOD2) were reduced by half in the hibernating muscle (Figure 3; N = 7 per season; paired student *t*-test,  $p = 0.026$ ). In the hibernation state, a 1.4–2-fold increase in catalase (CAT) protein levels (Figure 3; N = 7 per season for proteomics data and N = 6 for western blot analysis; paired student *t*-tests,  $p = 0.00000063$  and  $p = 0.0015$ , respectively) was observed and CAT activity was also approx. doubled (Figure 3; N = 5 per season; paired student *t*-test,  $p = 0.0022$ ).



**Figure 3.** mRNA/protein levels and/or activity of antioxidant systems in bear skeletal muscle. Levels of antioxidant enzymes and heat shock proteins (HSPs) were measured using proteomics [58], and/or western blotting (WB; see also Figure S1), and/or RT-qPCR (mRNA) in vastus lateralis muscle samples from summer-active (black bars) and hibernating (white bars) brown bears. Enzyme activities and the levels of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione were measured using commercial kits (see the text). Data (N = 5–12/group) are expressed as means  $\pm$  sem, with values in the hibernating period being normalized to those in the summer-active condition, which were arbitrarily set to 1. Statistical significance is shown for paired student *t*-tests (\* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.001; \*\*\* *p* < 0.0001). a.u.: arbitrary units.

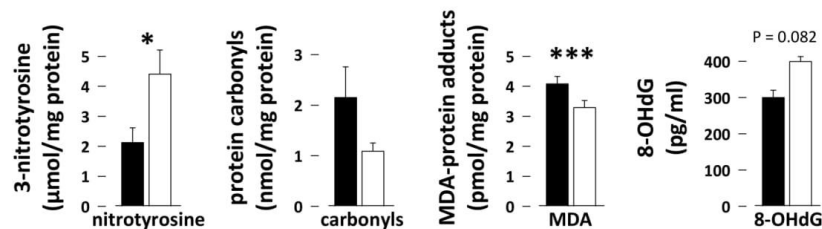
We also explored the glutathione system and observed that glutathione S-transferase Mu 3 (GSTM3) protein levels were 1.5 times increased in skeletal muscle of hibernating compared to summer-active bears (Figure 3; N = 7 per season; paired student *t*-test, *p* = 0.0026), whereas the protein levels of glutathione S-transferase kappa 1 (GSTK1) were decreased by half at the same time (Figure 3; N = 7 per season; paired student *t*-test, *p* = 0.00021) and the protein levels of glutathione S-transferase P (GSTP1), glutathione S-transferase Mu 1 (GSTM1), and glutathione peroxidase 1 (GPX1) remained unchanged (N = 7 per season; paired student *t*-tests, *p* = 0.89, *p* = 0.11, and *p* = 0.84, respectively). The mRNA levels of glutathione peroxidase 4 (GPX4) were twofold lower in skeletal muscle of hibernating compared to summer-active bears (Figure 3; N = 8 per season; paired student *t*-tests, *p* = 0.00007). Glutathione peroxidase (GPX) activity was not significantly different when comparing the hibernation versus summer-active states (N = 5 per season; paired student *t*-tests, *p* = 0.54). The muscle content of both reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms of glutathione were reduced during hibernation, by a factor of 4.3 and 2.5, respectively (Figure 3; N = 5 per season; paired student *t*-tests, *p* = 0.024 and *p* = 0.014, respectively), resulting in a slight 1.4-fold lower GSH to GSSG ratio in hibernating bears (Figure 3; N = 5 per season; paired student *t*-test, *p* = 0.29).

Heat shock proteins are stress-responsive proteins. Their protein levels were generally induced (1.2–1.7 times) in bear skeletal muscle during hibernation, including for heat shock proteins beta-1 (HSPB1), beta-2 (HSPB2), and beta-7 (HSPB7), heat shock 70 kDa proteins 1A (HSPA1A) and 2 (HSPA2), 78 kDa glucose-regulated protein (HSPA5), and heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8) (Figure 3; N = 7 per season; paired student *t*-tests, *p* = 0.002, *p* = 0.0011, *p* = 0.059, *p* = 0.029, *p* = 0.043, *p* = 0.00049, and *p* = 0.042, respectively). On the reverse, muscle levels of mitochondrial 60 kDa heat shock protein (HSPD1), heat shock protein HSP 90-alpha (HSP90AA1), and mitochondrial stress-70 protein (HSPA9 or GRP75) were 1.4–2.4-fold lower during hibernation (Figure 3; N = 7 per season for proteomics data and N = 12 for western blot analysis; paired student *t*-tests, *p* = 0.002, *p* = 0.0078, *p* = 0.000071, respectively),

and those of heat shock protein HSP 90-beta (HSP90AB1) and heat shock protein beta-6 (HSPB6) remained unchanged ( $N = 7$  per season; paired student  $t$ -tests,  $p = 0.20$ , and  $p = 0.11$ , respectively).

#### 3.4. Levels of Oxidative Damages in Bear Skeletal Muscle

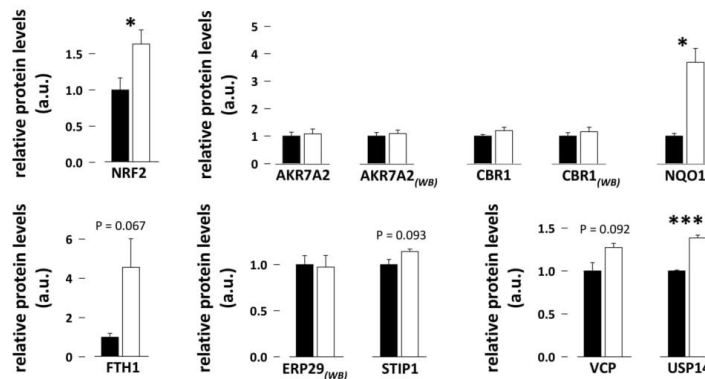
The vastus lateralis content in 3-nitrotyrosine was twofold higher in skeletal muscles of hibernating compared to summer-active bears (Figure 4;  $N = 7$  per season; paired student  $t$ -test,  $p = 0.018$ ) and the content in 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine (8-OHdG) in DNA extracted from bear skeletal muscle tended to be higher during hibernation but without reaching significance (Figure 4;  $N = 5$  per season; paired student  $t$ -test,  $p = 0.082$ ). On the contrary, the skeletal muscle levels of malondialdehyde (MDA)-protein adducts were 1.2-fold lower during hibernation (Figure 4;  $N = 7$  per season; paired student  $t$ -test,  $p = 0.000071$ ). The twofold reduction in muscle protein carbonyl levels during hibernation did not reached significance ( $N = 7$  per season; paired student  $t$ -test,  $p = 0.17$ ), due to inter-individual variations.



**Figure 4.** Oxidative damages in bear skeletal muscle. Levels of 3-nitrotyrosine, protein carbonyls, malondialdehyde (MDA)-protein adducts, and 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine (8-OHdG) were measured using commercial ELISA kits in vastus lateralis muscle samples from summer-active (black bars) and hibernating (white bars) brown bears. Data ( $N = 5$ – $7$ /group) are expressed as means  $\pm$  sem. Statistical significance is shown for paired student  $t$ -tests (\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ ).

#### 3.5. Protein Abundance of Nuclear Factor E2-Related Factor 2 (NRF2) and Selected Downstream Targets in Bear Skeletal Muscle

Abundance of nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2 or NFE2L2) and of NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (NQO1) and ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 (USP14) was 1.6-fold, 3.7-fold, and 1.4-fold higher, respectively, in skeletal muscle of hibernating compared to summer-active bears (Figure 5;  $N = 7$  per season; paired student  $t$ -tests,  $p = 0.012$ ,  $p = 0.0024$ , and  $p = 0.000027$ , respectively). Ferritin heavy chain (FTH1) exhibited increased levels (4.6-fold) during hibernation, but without reaching significance ( $N = 7$  per season; paired student  $t$ -test,  $p = 0.067$ ). Finally, no difference was found when comparing the hibernation and summer-active states for muscle aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2 (AKR7A2), carbonyl reductase [NADPH] 1 (CBR1), endoplasmic reticulum resident protein 29 (ERP29), stress-induced-phosphoprotein 1 (STIP1), and transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP) ( $N = 7$  per season; paired student  $t$ -tests,  $p = 0.32$ ,  $p = 0.22$ ,  $p = 0.79$ ,  $p = 0.094$ , and  $p = 0.092$ , respectively).



**Figure 5.** Protein levels of nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2) and selected downstream targets in bear skeletal muscle. Levels of proteins of the NRF2 pathway were measured using proteomics [58] and/or western blotting (WB; see also Figure S1) in vastus lateralis muscle samples from summer-active (black bars) and hibernating (white bars) brown bears. Data (N = 5–12/group) are expressed as means  $\pm$  sem, with values in the hibernating period being normalized to those in the summer-active condition, which were arbitrarily set to 1. Statistical significance is shown for paired student *t*-tests (\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ ). a.u.: arbitrary units.

#### 4. Discussion

During hibernation, bears demonstrate resistance to muscle atrophy over prolonged periods of physical inactivity and fasting [41,42]. This may involve a specific molecular proteomic signature of skeletal muscle during hibernation and the role of n-3 polyunsaturated fatty acids like docosahexaenoic acid [58], as well as existence of circulating antiproteolytic components in hibernating bears [60]. The present study explored the regulation of muscle cold-inducible proteins, the oxidant/antioxidant balance, and oxidative stress as another mechanism possibly contributing to muscle preservation in hibernating bears. The results show that, consistently with the increased expression of cold-inducible proteins and antioxidant systems, limited oxidative stress may favor bear skeletal muscle maintenance during months of hibernation.

##### 4.1. Induction of Cold-Inducible Protein Expression During Hibernation in Bear Skeletal Muscle

We show that both *RBM3* and *CIRBP* mRNA levels are higher in skeletal muscle of brown bears during hibernation (Figure 1). This appears to be a feature common to a number of hibernators. Indeed, the mRNA levels of *RBM3* have been shown to increase in brain, heart, and liver tissues of hibernating golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) [62], in brown adipose tissue, liver, heart, skeletal muscle, and hypothalamus of hibernating *S. parryi* [63], and in muscle, liver, and heart tissues of hibernating *U. americanus* [49,64]. Increased levels of a short form of *CIRBP*, encoding the full-length protein, have also been reported in the heart of hibernating hamsters [65].

In rodents, overexpression of *RBM3* has been shown to trigger skeletal muscle hypertrophy and attenuate atrophy as well in vitro as in vivo [66]. Such effects could be linked to previously proposed mechanisms for *RBM3* action, such as enhancement of global protein synthesis at both 37 °C and 32 °C [67], and reduction of apoptosis [55]. *CIRBP* has also been shown to exert anti-apoptotic effects at 32 °C [45]. The induction of cold-inducible protein expression in skeletal muscle of hibernating bears could then act to prevent an exaggerated decrease in protein synthesis and/or inhibit apoptosis, thereby favoring muscle maintenance.



Cold-inducible proteins have also been involved in quenching ROS and alleviating oxidative stress [50–55]. Therefore, we hypothesize that the oxidant/antioxidant balance is regulated toward prevention of oxidative stress in skeletal muscle of hibernating brown bears.

#### *4.2. Downregulation of Mitochondrial Electron Transfer Chain (ETC) Complexes I, II, and III May Favor Reduced Production of ROS during Hibernation in Bear Skeletal muscle*

Mitochondria are an important source of ROS within most mammalian cells. Of the 11 mitochondrial ROS-producing sites, the major ones are located in ETC complexes I, II, and III [68]. By extracting detailed proteomics results from a previous study [58], we observed that the abundance of 12/15 subunits of complex I, 2/2 subunits of complex II, and 2/3 subunits of complex III were significantly reduced in bear skeletal muscle during hibernation (Figure 2). As previously suggested [58], the mitochondrial content is likely decreased in hibernating bear muscle, which may contribute to the general decrease that we observed in the abundance of ETC complex subunits. In addition, we recently showed that lipid oxidation is reduced in hibernating brown bear muscle [58], which may contribute to suppress electron supply to the respiratory chain. Finally, uncoupling protein 3 (UCP3) has been attributed a role in protecting mitochondria against oxidative stress [69,70]. Therefore, the increased expression of UCP3 that we observed during hibernation (Figure 1) is not only in line with its known induction during mild hypothermia [71], but it could also constitute a mechanism to mitigate oxidative damages in the hibernating muscle. This would be in accordance with the “uncoupling to survive” hypothesis, which postulates that uncoupling proteins can decrease ROS production by lowering the potential of the inner mitochondrial membrane [72], providing that UCP3 actually reduces the mitochondrial proton motive force, a still debated question [73]. Altogether, the data suggest a reduction of mitochondrial ROS production in bear skeletal muscle during hibernation. This would be consistent with the known reduction in ROS production in skeletal muscle of hibernating *I. tridecemlineatus* [33].

#### *4.3. Upregulation of Key Antioxidant Systems may Favor ROS Scavenging during Hibernation in Bear Skeletal Muscle*

Endogenous muscle antioxidants include several enzymes like superoxide dismutases (SOD1 in the cytosol and SOD2 in the mitochondria), catalase (CAT), and peroxiredoxins (PRDXs), as well as the glutathione system encompassing enzymes like glutathione S-transferases (GSTs) and glutathione peroxidases (GPXs), and their cofactor, glutathione (GSH in its reduced form and GSSG in its oxidized form) [11,15]. The regulations we observed (Figure 3) suggest that the upregulation of SOD1 protein levels during hibernation is due to post-transcriptional events, which could involve microRNAs [74] or ELAV proteins [75]. This is a mechanism that could favor dismutation of cytosolic  $O_2^{\bullet-}$  to form  $H_2O_2$ , which reduction to water is likely favored by the increase in CAT and PRDX6 protein levels and the activity that we report here in the hibernating bear muscle. Consistently, increased levels of catalase [32] and a higher total antioxidant capacity [31] have been found during hibernation in muscle of *I. tridecemlineatus*. Enhanced expression of GPX, CAT, and SOD1 has also been shown in muscle of the hibernating ground squirrel *S. citellus* [34]. Because PRDX6 can reduce lipid hydroperoxides [76], its upregulation may also favor protection of the membranes of bear muscle cells during hibernation. Finally, lower levels of the mitochondrial SOD2 and PRDX3 proteins might reflect the reduction of that mitochondrial ROS production during hibernation in bears, as suggested above. This may be a feature depending on the animal species considered and/or whether interbout arousals are occurring during hibernation, as SOD2 protein levels have been reported to increase in the quadriceps muscle of hibernating *I. tridecemlineatus* [32], but decrease in the quadriceps muscle of hibernating *S. citellus* [34].

The glutathione system is of utmost importance in protecting cells against oxidative damages. GSH can directly scavenge ROS or act as a cofactor for GPXs and GSTs to reduce lipid hydroperoxides [77]. The increase in cytosolic GSTM3 might help in preventing accumulation of ROS and lipid peroxides in skeletal muscle of hibernating bears. On the other hand, the observed decrease in the

mitochondria-specific GST, GSTk1, is another indication that ROS-induced peroxidation is decreased in the mitochondrial compartment of hibernating bear muscle cells. Finally, the maintenance of muscle GPX activity and the stability of the GSH-to-GSSG ratio, a classical marker of oxidative stress, suggest that bear skeletal muscle is not under a significant oxidative insult during hibernation.

Apart from their role as molecular chaperones, heat shock proteins (HSPs) have been involved in protection against oxidative stress [78,79]. HSPs exert their protective effects by sensing redox changes, repairing or removing damaged proteins, favoring the action of antioxidants, and also via anti-apoptotic effects [78]. A specific role against oxidative stress has notably been reported for HSPB1 [80] and members of the HSP70 subfamily [81]. The induction of HSP expression that we observed in skeletal muscle of hibernating bears concerns the small HSPs (HSPB1 or HSP27, HSPB2, HSPB7, and HSPB6) and HSP70 (HSPA1A, HSPA2, HSPA5 or GRP78, and HSPA8) subfamilies. This may provide a protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and accumulation of damaged/misfolded proteins. These results extend previous findings showing elevated levels of phosphorylated HSPB1 and of HSP70 in skeletal muscle of bats during hibernation [25,82]. HSPA9 or GRP75 is mainly located in the mitochondria. As already suggested for the regulation of other mitochondrial proteins (see above), its decreased expression observed here in hibernating bears is an additional element supporting the view that mitochondrial oxidative stress does not occur in skeletal muscle during hibernation. The situation appears to be different in mitochondria from hibernating ground squirrels, with for example HSPA9 being overexpressed in muscle of hibernating *I. tridecemlineatus* [1].

#### 4.4. Oxidative Damages during Hibernation in Bear Skeletal Muscle

Adverse effects of oxidative stress include oxidative damages to lipids, proteins, and DNA [10]. The free radical •OH can for example cause lipid peroxidation, which leads to formation of malondialdehyde (MDA)-protein adducts. Oxidation of proteins due to ROS notably produces the so-called protein carbonyl derivatives, and O<sub>2</sub>•<sup>−</sup> and nitric oxide (•NO) together or nitrogen dioxide (•NO<sub>2</sub>) alone can lead to the modification of protein tyrosine residues to 3-nitrotyrosine. Finally, oxidative lesions of DNA are also triggered in response to oxidative stress, with the formation of, e.g., 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine (8-OHdG). The reduced levels of MDA-protein adducts and of protein carbonyls (twofold, not significant because of inter-individual variations), and the unchanged levels of 8-OHdG that we observed in muscle of hibernating versus summer-active bears altogether argue for a drastic reduction of muscle oxidative stress during hibernation. Consistent results have been obtained in hibernating *I. tridecemlineatus*, with no evidence for muscle protein oxidation (carbonyl levels) [32]. Only the levels of 3-nitrotyrosine-containing proteins were observed to be increased in hibernating bear skeletal muscle. As our results suggest a reduction of ROS-induced damage, this may reflect an increase in nitrosative stress in hibernating bear muscle, which should be explored in detail in future studies. Endogenous production of •NO and •NO<sub>2</sub> largely relies on arginine availability [83]. It could be that low levels of protein degradation during hibernation nevertheless make muscle arginine available enough to increase production of •NO and •NO<sub>2</sub>. Mitochondrial respiration is inhibited by the action of •NO [84], which could be a mechanism whereby metabolic suppression is achieved in bear muscle cells.

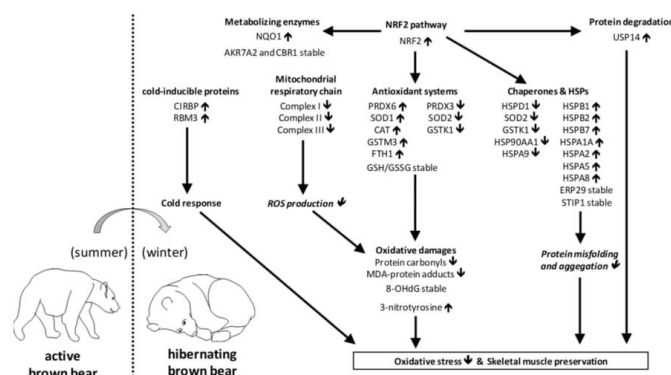
#### 4.5. NRF2 Regulation during Hibernation in Bear Skeletal Muscle

Nuclear factor, erythroid 2-like 2 (NFE2L2 or NRF2) is a transcription factor that is well known to control the response to oxidative stress by notably regulating the expression of antioxidant and detoxification enzymes [85,86]. A key role has already been attributed to NRF2 in regulating antioxidant defences in hibernating *I. tridecemlineatus* [87] and *S. dauricus* [23]. Such a role for NRF2 appears also valid for hibernating bears, as increased levels of antioxidant enzymes (see above) were paralleled by the enhanced expression of NRF2 in skeletal muscle during hibernation (Figure 5). Among NRF2 targets, apart from those presented in Figure 3, we also found an increased expression of the ferritin heavy chain (FTH1), an antioxidant protein, of NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (NQO1), a

detoxification enzyme, and of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 (USP14), which is involved in the degradation of damaged proteins. However, no change was observed due to hibernation for few other detoxification enzymes (AKR7A2, CBR1) and chaperones (ERP29 and STIP1). This may indicate a complex scheme for NRF2 action, which could selectively regulate antioxidant enzymes but no other targets in skeletal muscle of hibernating bears. To deepen these results on NRF2, the phosphorylated status of NRF2, and the possible involvement of the E3 ubiquitin ligase KEAP1 (Kelch ECH-associating protein 1) and small MAF proteins should be studied. However, we did not succeed in detecting these important factors. Alternatively, it is also likely that other transcription factors and/or pathways may play a role in regulating the response to oxidative stress in bear skeletal muscle during hibernation. Indeed, transcription factors other than NRF2, like for example nuclear factor  $\kappa$ B, are known to control the expression of antioxidant genes [75]. Moreover, as already stated above for SOD1, microRNAs could be involved in the regulation of antioxidant enzyme expression, a field that largely remains to be investigated.

## 5. Conclusions

During hibernation, the response to skeletal muscle oxidative stress has been partly studied, however only in a fragmented fashion in several studies of ground squirrels (see above). Here we examined for the first time the comprehensive aspects of the regulation of oxidative stress and its possible influence on muscle preservation in hibernating bears. In line with the reduced levels of oxidative damages, the specific response to mild hypothermia (cold response), decreased production of ROS due to metabolic suppression, increased scavenging of ROS due to the induction of antioxidant systems, and reduced accumulation of misfolded proteins due to the induction of chaperones and HSPs, appear as key mechanisms to decrease oxidative stress and promote skeletal muscle preservation during brown bear (*U. arctos*) hibernation (Figure 6). Beyond the hibernation period, the antioxidant protection may also prevent an increase of the muscle oxidative insult at hibernation exit, due to the restoration of metabolic rates and mitochondrial oxygen consumption. Our findings showing how the oxidant-antioxidant balance is regulated in hibernating bears may provide specific targets of therapeutic interest to improve health outcomes related to muscle atrophy during sarcopenia, muscle disuse or microgravity conditions.



**Figure 6.** Proposed mechanisms based on reduced oxidative stress promoting skeletal muscle preservation in hibernating versus summer-active brown bears. In *italic* are shown features that were not directly assessed.

Future studies should specifically measure the levels of ROS and reactive nitrogen species in hibernating bear muscle. Because ROS play a role in several signaling pathways [88], the impact of any change in ROS levels on cellular signaling (e.g., NF- $\kappa$ B, MAPKs, and PI3K-Akt signaling pathways)



should be evaluated during hibernation. The influence of transcription factors other than NRF2 on antioxidant systems expression would also bring a more comprehensive understanding of the mechanisms controlling cellular oxidative homeostasis.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-3921/8/9/334/s1>, Figure S1: Representative blots of bear skeletal muscle proteins.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.B. and F.B.; formal analysis, F.B.; investigation, B.C., A.Z., A.L.E., E.M., E.Lo., I.C., J.M.A., E.Le., and F.B.; resources, A.L.E., E.M., E.Lo., J.M.A., S.B., E.Le., F.B.; writing—original draft preparation, F.B.; writing—review and editing, B.C., J.M.A., J.E.S., G.G.K., C.S., S.B., E.Le., and F.B.; visualization, F.B.; supervision, F.B.; project administration, F.B.; funding acquisition, F.B., S.B., and E.Le.

**Funding:** This research was funded by the French Space Agency (CNES; Grant\_No.480000974 and No.4800001006), CNRS and Strasbourg University (H2E project; MyoBears project of the PEPS ExoMod program), French Proteomic Infrastructure (ProFI; ANR-10-INSB-08-03), and Agence Nationale de la Recherche of the French government through the program “Investissements d’Avenir” (16-IDEX-0001 CAP 20-25).

**Acknowledgments:** The authors wish to thank the field capture team and M. Arrivé for her help in the measurement of enzyme activities and oxidative damages. This is scientific paper No. 281 from the SBBRP.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Carey, H.V.; Andrews, M.T.; Martin, S.L. Mammalian hibernation: Cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 1153–1181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ruf, T.; Geiser, F. Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **2015**, *90*, 891–926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Humphries, M.M.; Thomas, D.W.; Kramer, D.L. The role of energy availability in mammalian hibernation: A cost-benefit approach. *Physiol. Biochem. Zool.* **2003**, *76*, 165–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Daan, S.; Barnes, B.M.; Strijkstra, A.M. Warming up for sleep? Ground squirrels sleep during arousals from hibernation. *Neurosci. Lett.* **1991**, *128*, 265–268. [[CrossRef](#)]
5. Popov, V.I.; Bocharova, L.S.; Bragin, A.G. Repeated changes of dendritic morphology in the hippocampus of ground squirrels in the course of hibernation. *Neuroscience* **1992**, *48*, 45–51. [[CrossRef](#)]
6. Millesi, E.; Prossinger, H.; Dittami, J.P.; Fieder, M. Hibernation effects on memory in European ground squirrels (*Spermophilus citellus*). *J. Biol. Rhythm.* **2001**, *16*, 264–271. [[CrossRef](#)]
7. Prendergast, B.J.; Freeman, D.A.; Zucker, I.; Nelson, R.J. Periodic arousal from hibernation is necessary for initiation of immune responses in ground squirrels. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2002**, *282*, R1054–R1062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Thomas, D.W.; Geiser, F. Periodic arousals in hibernating mammals: Is evaporative water loss involved? *Funct. Ecol.* **1997**, *11*, 585–591. [[CrossRef](#)]
9. Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D.P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 715–748. [[CrossRef](#)]
10. Pizzino, G.; Irrera, N.; Cucinotta, M.; Pallio, G.; Mannino, F.; Arcoraci, V.; Squadrito, F.; Altavilla, D.; Bitto, A. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 8416763. [[CrossRef](#)]
11. Birben, E.; Sahiner, U.M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* **2012**, *5*, 9–19. [[CrossRef](#)]
12. Plumel, M.I.; Stier, A.; Thierse, D.; van Dorsselaer, A.; Criscuolo, F.; Bertile, F. Litter size manipulation in laboratory mice: An example of how proteomic analysis can uncover new mechanisms underlying the cost of reproduction. *Front. Zool.* **2014**, *11*, 41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Plumel, M.I.; Wasselin, T.; Plot, V.; Strub, J.M.; Van Dorsselaer, A.; Carapito, C.; Georges, J.Y.; Bertile, F. Mass Spectrometry-Based Sequencing and SRM-Based Quantitation of Two Novel Vitellogenin Isoforms in the Leatherback Sea Turtle (*Dermochelys coriacea*). *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 4122–4135. [[CrossRef](#)]
14. Wasselin, T.; Zahn, S.; Maho, Y.L.; Dorsselaer, A.V.; Raclot, T.; Bertile, F. Exacerbated oxidative stress in the fasting liver according to fuel partitioning. *Proteomics* **2014**, *14*, 1905–1921. [[CrossRef](#)]
15. Abrego, J.; Elorza, A.A.; Riedel, C.A.; Vilos, C.; Simon, F.; Cabrera, D.; Estrada, L.; Cabello-Verrugio, C. Role of Oxidative Stress as Key Regulator of Muscle Wasting during Cachexia. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 2063179. [[CrossRef](#)]



16. Kozakowska, M.; Pietraszek-Gremplewicz, K.; Jozkowicz, A.; Dulak, J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: Focus on antioxidant enzymes. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **2015**, *36*, 377–393. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Thirupathi, A.; Pinho, R.A. Effects of reactive oxygen species and interplay of antioxidants during physical exercise in skeletal muscles. *J. Physiol. Biochem.* **2018**, *74*, 359–367. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Lawler, J.M.; Song, W.; Demaree, S.R. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *35*, 9–16. [\[CrossRef\]](#)
19. Qiu, J.; Fang, Q.; Xu, T.; Wu, C.; Xu, L.; Wang, L.; Yang, X.; Yu, S.; Zhang, Q.; Ding, F.; et al. Mechanistic Role of Reactive Oxygen Species and Therapeutic Potential of Antioxidants in Denervation- or Fasting-Induced Skeletal Muscle Atrophy. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 215. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Powers, S.K.; Morton, A.B.; Ahn, B.; Smuder, A.J. Redox control of skeletal muscle atrophy. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *98*, 208–217. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Carey, H.V.; Frank, C.L.; Seifert, J.P. Hibernation induces oxidative stress and activation of NF-kappaB in ground squirrel intestine. *J. Comp. Physiol. B* **2000**, *170*, 551–559. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Chauhan, V.P.; Tsiouris, J.A.; Chauhan, A.; Sheikh, A.M.; Brown, W.T.; Vaughan, M. Increased oxidative stress and decreased activities of Ca(2+)/Mg(2+)-ATPase and Na(+)/K(+)-ATPase in the red blood cells of the hibernating black bear. *Life Sci.* **2002**, *71*, 153–161. [\[CrossRef\]](#)
23. Wei, Y.; Zhang, J.; Xu, S.; Peng, X.; Yan, X.; Li, X.; Wang, H.; Chang, H.; Gao, Y. Controllable oxidative stress and tissue specificity in major tissues during the torpor-arousal cycle in hibernating Daurian ground squirrels. *Open Biol.* **2018**, *8*, 180068. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Buzadzic, B.; Spasic, M.; Saicic, Z.S.; Radojicic, R.; Petrovic, V.M.; Halliwell, B. Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 2. The effect of hibernation. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *9*, 407–413. [\[CrossRef\]](#)
25. Eddy, S.F.; McNally, J.D.; Storey, K.B. Up-regulation of a thioredoxin peroxidase-like protein, proliferation-associated gene, in hibernating bats. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *435*, 103–111. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Yin, Q.; Ge, H.; Liao, C.C.; Liu, D.; Zhang, S.; Pan, Y.H. Antioxidant Defenses in the Brains of Bats during Hibernation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0152135. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Rouble, A.N.; Tessier, S.N.; Storey, K.B. Characterization of adipocyte stress response pathways during hibernation in thirteen-lined ground squirrels. *Mol. Cell. Biochem.* **2014**, *393*, 271–282. [\[CrossRef\]](#)
28. Ni, Z.; Storey, K.B. Heme oxygenase expression and Nrf2 signaling during hibernation in ground squirrels. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2010**, *88*, 379–387. [\[CrossRef\]](#)
29. Morin, P.J.; Storey, K.B. Antioxidant defense in hibernation: Cloning and expression of peroxiredoxins from hibernating ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *461*, 59–65. [\[CrossRef\]](#)
30. Allan, M.E.; Storey, K.B. Expression of NF-kappaB and downstream antioxidant genes in skeletal muscle of hibernating ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Cell Biochem. Funct.* **2012**, *30*, 166–174. [\[CrossRef\]](#)
31. James, R.S.; Staples, J.F.; Brown, J.C.; Tessier, S.N.; Storey, K.B. The effects of hibernation on the contractile and biochemical properties of skeletal muscles in the thirteen-lined ground squirrel, *Ictidomys tridecemlineatus*. *J. Exp. Biol.* **2013**, *216*, 2587–2594. [\[CrossRef\]](#)
32. Xu, R.; Andres-Mateos, E.; Mejias, R.; MacDonald, E.M.; Leinwand, L.A.; Merriman, D.K.; Fink, R.H.; Cohn, R.D. Hibernating squirrel muscle activates the endurance exercise pathway despite prolonged immobilization. *Exp. Neurol.* **2013**, *247*, 392–401. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Brown, J.C.; Chung, D.J.; Belgrave, K.R.; Staples, J.F. Mitochondrial metabolic suppression and reactive oxygen species production in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2012**, *302*, R15–R28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Vucetic, M.; Stancic, A.; Otasevic, V.; Jankovic, A.; Korac, A.; Markelic, M.; Velickovic, K.; Golic, I.; Buzadzic, B.; Storey, K.B.; et al. The impact of cold acclimation and hibernation on antioxidant defenses in the ground squirrel (*Spermophilus citellus*): An update. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *65*, 916–924. [\[CrossRef\]](#)
35. Page, M.M.; Peters, C.W.; Staples, J.F.; Stuart, J.A. Intracellular antioxidant enzymes are not globally upregulated during hibernation in the major oxidative tissues of the 13-lined ground squirrel *Spermophilus tridecemlineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2009**, *152*, 115–122. [\[CrossRef\]](#)

36. Orr, A.L.; Lohse, L.A.; Drew, K.L.; Hermes-Lima, M. Physiological oxidative stress after arousal from hibernation in Arctic ground squirrel. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **2009**, *153*, 213–221. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Stenseth, N.E.; Lutnaes, P.N.; Bjarnadottir, V.; Dahle, B.; Fossum, K.H.; Jørgsved, P.; Johansen, T.; Neumann, W.; Opseth, O.; Ronning, O.; et al. Seasonal and annual variation in the diet of brown bears *Ursus arctos* in the boreal forest of southcentral Sweden. *Wildl. Biol.* **2016**, *22*, 107–116. [\[CrossRef\]](#)
38. Manchi, S.; Swenson, J.E. Denning behaviour of Scandinavian brown bears *Ursus arctos*. *Wildl. Biol.* **2005**, *11*, 123–132. [\[CrossRef\]](#)
39. Hissa, R.; Siekkinen, J.; Hohtola, E.; Saarela, S.; Hakala, A.; Pudas, J. Seasonal Patterns in the Physiology of the European Brown Bear (*Ursus Arctos Arctos*) in Finland. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* **1994**, *109*, 781–791. [\[CrossRef\]](#)
40. Harlow, H.J.; Lohuis, T.; Anderson-Sprecher, R.C.; Beck, T.D.I. Body surface temperature of hibernating black bears may be related to periodic muscle activity. *J. Mammal.* **2004**, *85*, 414–419. [\[CrossRef\]](#)
41. Lohuis, T.D.; Harlow, H.J.; Beck, T.D. Hibernating black bears (*Ursus americanus*) experience skeletal muscle protein balance during winter anorexia. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *147*, 20–28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Tinker, D.B.; Harlow, H.J.; Beck, T.D. Protein use and muscle-fiber changes in free-ranging, hibernating black bears. *Physiol. Zool.* **1998**, *71*, 414–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Evans, A.L.; Singh, N.J.; Friebe, A.; Arnemo, J.M.; Laske, T.G.; Frobert, O.; Swenson, J.E.; Blanc, S. Drivers of hibernation in the brown bear. *Front. Zool.* **2016**, *13*, 7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Toien, O.; Blake, J.; Edgar, D.M.; Grahn, D.A.; Heller, H.C.; Barnes, B.M. Hibernation in black bears: Independence of metabolic suppression from body temperature. *Science* **2011**, *331*, 906–909. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Zhu, X.; Buhner, C.; Wellmann, S. Cold-inducible proteins CIRP and RBM3, a unique couple with activities far beyond the cold. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 3839–3859. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Nishiyama, H.; Itoh, K.; Kaneko, Y.; Kishishita, M.; Yoshida, O.; Fujita, J. A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *J. Cell Biol.* **1997**, *137*, 899–908. [\[CrossRef\]](#)
47. Tong, G.; Endersfelder, S.; Rosenthal, L.M.; Wollersheim, S.; Sauer, I.M.; Buhner, C.; Berger, F.; Schmitt, K.R. Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices. *Brain Res.* **2013**, *1504*, 74–84. [\[CrossRef\]](#)
48. Rzechorzek, N.M.; Connick, P.; Patani, R.; Selvaraj, B.T.; Chandran, S. Hypothermic Preconditioning of Human Cortical Neurons Requires Proteostatic Priming. *EBioMedicine* **2015**, *2*, 528–535. [\[CrossRef\]](#)
49. Fedorov, V.B.; Goropashnaya, A.V.; Toien, O.; Stewart, N.C.; Gracey, A.Y.; Chang, C.; Qin, S.; Pertea, G.; Quackenbush, J.; Showe, L.C.; et al. Elevated expression of protein biosynthesis genes in liver and muscle of hibernating black bears (*Ursus americanus*). *Physiol. Genomics* **2009**, *37*, 108–118. [\[CrossRef\]](#)
50. Xia, Z.; Jiang, K.; Liu, T.; Zheng, H.; Liu, X.; Zheng, X. The protective effect of Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) on testicular torsion/detorsion: An experimental study in mice. *J. Pediatr. Surg.* **2013**, *48*, 2140–2147. [\[CrossRef\]](#)
51. Sakurai, T.; Kudo, M.; Watanabe, T.; Itoh, K.; Higashitsuji, H.; Arizumi, T.; Inoue, T.; Hagiwara, S.; Ueshima, K.; Nishida, N.; et al. Hypothermia protects against fulminant hepatitis in mice by reducing reactive oxygen species production. *Dig. Dis.* **2013**, *31*, 440–446. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Liu, J.L.; Xue, J.H.; Zhang, H.T.; Li, S.C.; Liu, Y.X.; Xu, D.G.; Zou, M.J.; Zhang, Z.W.; Diao, J.F. Cloning, expression, and purification of cold inducible RNA-binding protein and its neuroprotective mechanism of action. *Brain Res.* **2015**, *1597*, 189–195. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Li, S.C.; Zhang, Z.W.; Xue, J.H.; Liu, A.J.; Zhang, H.T. Cold-inducible RNA binding protein inhibits H2O2-induced apoptosis in rat cortical neurons. *Brain Res.* **2012**, *1441*, 47–52. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Yang, H.J.; Ju, F.; Guo, X.X.; Ma, S.P.; Wang, L.; Cheng, B.F.; Zhuang, R.J.; Zhang, B.B.; Shi, X.; Feng, Z.W.; et al. RNA-binding protein RBM3 prevents NO-induced apoptosis in human neuroblastoma cells by modulating p38 signaling and miR-143. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41738. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Ferry, A.L.; Vanderklisch, P.W.; Dupont-Versteegden, E.E. Enhanced survival of skeletal muscle myoblasts in response to overexpression of cold shock protein RBM3. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2011**, *301*, C392–C402. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

56. Evans, A.L.; Sahlen, V.; Stoen, O.G.; Fahlman, A.; Brunberg, S.; Madslie, K.; Frobert, O.; Swenson, J.E.; Arnemo, J.M. Capture, anesthesia, and disturbance of free-ranging brown bears (*Ursus arctos*) during hibernation. *PLoS ONE*. **2012**, *7*, e40520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Arnemo, J.M.; Evans, A.L. *Biomedical Protocols for Free-Ranging Brown Bears, Wolves, Wolverines and Lynx*; Technical Report 2017; University of Applied Sciences: Inland, Norway, 2017. [[CrossRef](#)]
58. Chazarin, B.; Storey, K.B.; Ziemianin, A.; Chanon, S.; Plumel, M.; Chery, I.; Durand, C.; Evans, A.L.; Arnemo, J.M.; Zedrosser, A.; et al. Metabolic reprogramming involving glycolysis in the hibernating brown bear skeletal muscle. *Front. Zool.* **2019**, *16*, 12. [[CrossRef](#)]
59. Vizcaino, J.A.; Csordas, A.; del-Toro, N.; Dianes, J.A.; Griss, J.; Lavidas, I.; Mayer, G.; Perez-Riverol, Y.; Reisinger, F.; Ternent, T.; et al. 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D447–D456. [[CrossRef](#)]
60. Chanon, S.; Chazarin, B.; Toubhans, B.; Durand, C.; Chery, I.; Robert, M.; Vieille-Marchiset, A.; Swenson, J.E.; Zedrosser, A.; Evans, A.L.; et al. Proteolysis inhibition by hibernating bear serum leads to increased protein content in human muscle cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5525. [[CrossRef](#)]
61. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2008; ISBN 3-900051-07-0. Available online: <http://www.R-project.org> (accessed on 9 April 2019).
62. Williams, D.R.; Epperson, L.E.; Li, W.Z.; Hughes, M.A.; Taylor, R.; Rogers, J.; Martin, S.L.; Cossins, A.R.; Gracey, A.Y. Seasonally hibernating phenotype assessed through transcript screening. *Physiol. Genomics* **2005**, *24*, 13–22. [[CrossRef](#)]
63. Yan, J.; Barnes, B.M.; Kohl, F.; Marr, T.G. Modulation of gene expression in hibernating arctic ground squirrels. *Physiol. Genomics* **2008**, *32*, 170–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Fedorov, V.B.; Goropashnaya, A.V.; Toien, O.; Stewart, N.C.; Chang, C.; Wang, H.; Yan, J.; Showe, L.C.; Showe, M.K.; Barnes, B.M. Modulation of gene expression in heart and liver of hibernating black bears (*Ursus americanus*). *BMC Genomics* **2011**, *12*, 171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Sano, Y.; Shiina, T.; Naitou, K.; Nakamori, H.; Shimizu, Y. Hibernation-specific alternative splicing of the mRNA encoding cold-inducible RNA-binding protein in the hearts of hamsters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *462*, 322–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Van Pelt, D.W.; Confides, A.L.; Judge, A.R.; Vanderklish, P.W.; Dupont-Versteegden, E.E. Cold shock protein RBM3 attenuates atrophy and induces hypertrophy in skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **2018**, *39*, 35–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Dresios, J.; Aschrafi, A.; Owens, G.C.; Vanderklish, P.W.; Edelman, G.M.; Mauro, V.P. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1865–1870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Brand, M.D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *100*, 14–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Busiello, R.A.; Savarese, S.; Lombardi, A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front. Physiol.* **2015**, *6*, 36. [[CrossRef](#)]
70. Cadenas, S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2018**, *1859*, 940–950. [[CrossRef](#)]
71. Borowiec, A.S.; Sion, B.; Chalmel, F.; Rolland, A.D.; Lemonnier, L.; De Clerck, T.; Bokhobza, A.; Derouiche, S.; Dewailly, E.; Slomianny, C.; et al. Cold/menthol TRPM8 receptors initiate the cold-shock response and protect germ cells from cold-shock-induced oxidation. *FASEB J.* **2016**, *30*, 3155–3170. [[CrossRef](#)]
72. Zhou, S.S.; Cao, L.L.; Xu, W.D.; Cao, J.; Zhao, Z.J. Effect of temperature on oxidative stress, antioxidant levels and uncoupling protein expression in striped hamsters. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **2015**, *189*, 84–90. [[CrossRef](#)]
73. Bouillaud, F.; Alves-Guerra, M.C.; Ricquier, D. UCPs, at the interface between bioenergetics and metabolism. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2016**, *1863*, 2443–2456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Wang, Q.; Wang, Y.L.; Minto, A.W.; Wang, J.H.; Shi, Q.; Li, X.M.; Quigg, R.J. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy. *FASEB J.* **2008**, *22*, 4126–4135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



75. Milani, P.; Amadio, M.; Laforenza, U.; Dell'Orco, M.; Diamanti, L.; Sardone, V.; Gagliardi, S.; Govoni, S.; Ceroni, M.; Pascale, A.; et al. Posttranscriptional regulation of SOD1 gene expression under oxidative stress: Potential role of ELAV proteins in sporadic ALS. *Neurobiol. Dis.* **2013**, *60*, 51–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Fisher, A.B. Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *617*, 68–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Lushchak, V.I. Glutathione homeostasis and functions: Potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids* **2012**, *2012*, 736837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Kalmar, B.; Greensmith, L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 310–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Jiang, B.; Xiao, W.; Shi, Y.; Liu, M.; Xiao, X. Heat shock pretreatment inhibited the release of Smac/DIABLO from mitochondria and apoptosis induced by hydrogen peroxide in cardiomyocytes and C2C12 myogenic cells. *Cell Stress Chaperones* **2005**, *10*, 252–262. [[CrossRef](#)]
80. Rogalla, T.; Ehrnsperger, M.; Preville, X.; Kotlyarov, A.; Lutsch, G.; Ducasse, C.; Paul, C.; Wieske, M.; Arrigo, A.P.; Buchner, J.; et al. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18947–18956. [[CrossRef](#)]
81. Broome, C.S.; Kayani, A.C.; Palomero, J.; Dillmann, W.H.; Mestril, R.; Jackson, M.J.; McArdle, A. Effect of lifelong overexpression of HSP70 in skeletal muscle on age-related oxidative stress and adaptation after nondamaging contractile activity. *FASEB J.* **2006**, *20*, 1549–1551. [[CrossRef](#)]
82. Lee, K.; Park, J.Y.; Yoo, W.; Gwag, T.; Lee, J.W.; Byun, M.W.; Choi, I. Overcoming muscle atrophy in a hibernating mammal despite prolonged disuse in dormancy: Proteomic and molecular assessment. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *104*, 642–656. [[CrossRef](#)]
83. Luiking, Y.C.; Engelen, M.P.; Deutz, N.E. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2010**, *13*, 97–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Poderoso, J.J.; Helfenberger, K.; Poderoso, C. The effect of nitric oxide on mitochondrial respiration. *Nitric Oxide* **2019**, *88*, 61–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Ryoo, I.G.; Kwak, M.K. Regulatory crosstalk between the oxidative stress-related transcription factor Nfe2l2/Nrf2 and mitochondria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *359*, 24–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Tonelli, C.; Chio, I.I.C.; Tuveson, D.A. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *29*, 1727–1745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Morin, P., Jr.; Ni, Z.; McMullen, D.C.; Storey, K.B. Expression of Nrf2 and its downstream gene targets in hibernating 13-lined ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Mol. Cell. Biochem.* **2008**, *312*, 121–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Zhang, J.; Wang, X.; Vikash, V.; Ye, Q.; Wu, D.; Liu, Y.; Dong, W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 4350965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Chapitre 3 : Etude des régulations du protéome de cellules musculaires humaines traitées avec du sérum d'ours hibernant (WBS) par une analyse par spectrométrie de masse quantitative et sans marquage

### **Collaborations :**

- Les équipes du « Scandinavian Brown Bear Research Project » (<https://bearproject.info/>)
- Dr Etienne Lefai (Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, St Genès Champanelle, France)
- Mme Stéphanie Chanon (Université Lyon 1, INSERM/INRA, Laboratoire Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition, Lyon, France)
- Dr Stéphane Blanc (Université de Strasbourg, CNRS, IPHC, Strasbourg, France)

## Chapitre 3 : Etude des régulations du protéome de cellules musculaires humaines traitées avec du sérum d'ours hibernant (WBS) par une analyse par spectrométrie de masse quantitative et sans marquage

*Ce projet a été réalisé en collaboration avec le Dr Etienne LEFAI et Mme Stéphanie CHANON.*

### Contexte

Lors de l'hibernation, les pertes en masse et en force des muscles squelettiques de l'ours brun sont limitées (voir pages 55 à 61). Afin de déterminer l'importance de l'activation neuronale sur le maintien musculaire de l'ours brun durant l'hibernation, une équipe a mesuré l'évolution des muscles squelettiques LDE (Long Digital Extensor) et CT (Cranial Tibial) après dénervation, chez des ours bruns captifs durant la période d'hibernation et la période active [216]. Finalement, il s'est avéré que la perte de masse musculaire induite par la dénervation chez les ours bruns actifs était significativement plus importante que pour les ours bruns en période d'hibernation. Il semble donc que les muscles squelettiques des ours bruns lors de l'hibernation soient résistants à la perte musculaire induite par dénervation. Le système nerveux ne semble donc pas impliqué en premier lieu dans le maintien des muscles squelettiques chez l'ours brun hibernant. Nous pouvons donc supposer que des molécules circulant dans le sang pourraient piloter le maintien musculaire. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé les effets du sérum d'ours brun hibernant (WBS – *Winter Bear Serum*) et du sérum d'ours actifs (SBS – *Summer Bear Serum*) sur des myotubes humains en culture [8].

Nous avons constaté qu'une exposition au WBS de 48 heures augmentait la taille et le contenu en protéines des myotubes humains par rapport aux cellules exposées au SBS. En se focalisant sur le renouvellement des protéines musculaires, nous avons observé une diminution de la synthèse des protéines et de manière plus importante une diminution de la dégradation des protéines pour les cellules musculaires exposées au WBS, comparées aux cellules musculaires exposées au SBS. Nous avons également montré que le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie étaient inhibés par le WBS par rapport au SBS. Ainsi, il semble que l'exposition au WBS ait induit une balance protéique positive (diminution modérée de la synthèse protéique et diminution drastique de la dégradation protéique), d'où l'augmentation de la taille des myotubes et de leur contenu en protéines.

Les effets observés sur la balance protéique des myotubes humains exposés au WBS (diminution modérée de la synthèse protéique et diminution importante de la dégradation protéique) sont similaires aux observations réalisées sur la balance protéique du muscle squelettique de l'ours brun hibernant [146]. Il semble donc que le sérum (ou le plasma) d'ours hibernant contienne des composés participant au maintien de la balance protéique dans le muscle squelettique de l'ours brun durant l'hibernation, et que ces molécules aient la capacité d'induire des effets similaires sur des cellules musculaires d'autres espèces : l'homme [8] et le rat [217]. Ces résultats ont été valorisés dans une publication dans le journal *Scientific Reports* en 2018 (présentée en page 196 à 205).

Dans la continuité de ces travaux, nous avons choisi de caractériser le protéome des cellules musculaires humaines exposées au WBS et au SBS par une approche de protéomique

quantitative différentielle, et de nous focaliser sur les changements métaboliques induits par ces traitements.

## **Matériel et méthodes**

### ▪ **Description des échantillons reçus au LSMBO**

Les myotubes ont été prélevés sur 8 donneurs différents et les sera utilisés pour les traitements ont été constitués à partir de volumes équivalents des sera des ours prélevés durant les campagnes de l'année 2013 et 2016. Au LSMBO ont été réceptionnés des extraits protéiques obtenus après une lyse chimique (ajout d'un tampon RIPA) des myotubes humains exposés au WBS ou au SBS.

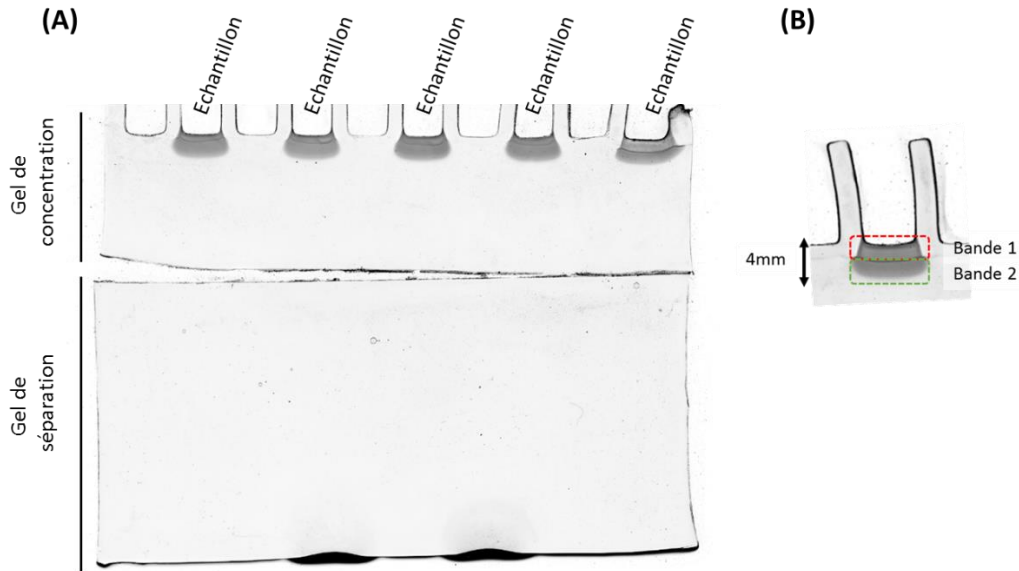
### ▪ **Préparation des extraits protéiques pour l'analyse par spectrométrie de masse**

Les concentrations protéiques ont été déterminées par un dosage colorimétrique de type RC-DC. Les résultats du dosage des concentrations protéiques ont été confirmés en obtenant des profils électrophorétiques identiques (i.e. intensités et présence des bandes protéiques) après une migration sur gel SDS PaGE de 20µg de protéines de chaque échantillon. Un échantillon de référence a été constitué avec 10µg de protéines de chaque échantillon. Cet échantillon sera traité comme les échantillons et sera analysé régulièrement sur toute la durée des analyses.

30µg de protéines des échantillons individuels et de l'échantillon de référence ont été conditionnés dans un tampon Laemmli et décomplexifiés en 2 bandes protéiques par électrophorèse sur un gel SDS PaGE (Figure 45A). Après une fixation des protéines au sein du gel (avec une solution aqueuse contenant 50% d'éthanol et 3% d'acide phosphorique) et une



coloration des protéines durant 2 heures au bleu de coomassie. Les deux bandes protéiques ont été excisées (Figure 45B) et chacune des bandes protéiques a été subdivisée en 3 pièces de gel.



*Figure 45 : Prise d'image d'une décomplexification de 30µg de protéines en deux bandes protéiques par électrophorèse sur gel SDS PaGE (A) et schématisation de l'excision des deux bandes protéiques (B).*

Après décoloration des pièces de gel avec 5 lavages successifs (avec 100µL d'une solution contenant 50% ACN, 50% ammonium bicarbonate 0.1M), et déshydratation (avec 50µL d'ACN pur), la réduction des protéines a été réalisée en incubant avec du DTT 10mM durant 30 minutes, à 60°C. L'alkylation des protéines a été réalisée avec de l'IAM (20 minutes, à l'obscurité, à température ambiante). Les pièces de gels ont été finalement déshydratées et la trypsine préparée dans de l'ammonium bicarbonate 25mM a été ajoutée avec un ratio protéines : trypsine égal à 1:66. Une incubation à 37°C pour la nuit a été réalisée, puis la digestion a été interrompue par acidification du mélange protéique avec 5µL d'acide formique (AF). Les peptides ont été extraits des pièces de gel grâce à deux incubations de 45 minutes avec 40µL d'une solution 60%

ACN, 0.1% AF, et une dernière incubation de 15 minutes avec 20µL d'ACN pur. Après évaporation des solvants, les peptides ont été repris avec une solution aqueuse contenant 1% ACN et 0.1% AF.

Des peptides iRT (*indexed Retention Time*, Biognosys) solubilisés dans 500µL d'une solution aqueuse contenant 20% d'acétonitrile ont été ajoutés en même quantité aux échantillons individuels et à l'échantillon de référence. Les temps de rétention des peptides iRT seront suivis sur toute la durée des analyses afin de confirmer la stabilité du système chromatographique.

▪ **Analyse LC-MS/MS des extraits protéiques de myotubes humains exposés au WBS et au SBS**

Les échantillons ont été répartis en deux groupes d'analyses, avec 16 échantillons par groupe d'analyse (hors échantillon de référence). 375 ng théoriques de peptides ont été analysés pour chaque bande protéique sur un système chromatographique UPLC (NanoAcquity, Waters) couplé à un Q-Exactive Plus (Thermo Scientific). Les peptides ont d'abord été chargés sur une colonne d'enrichissement (C18 180µmx20mm, 5µm ; Waters) à un débit de 5µL/min (99% H<sub>2</sub>O, 0.1% AF ; 1% ACN, 0.1% AF) durant 3 minutes. Les analytes ont ensuite été séparés sur une colonne séparative (BEH130 C18 75µm\*250mm, 1.7µm ; Waters), maintenue à 60°C. L'élution des peptides a été réalisée en augmentant graduellement le pourcentage de la solution B (ACN, 0.1% AF), de 2% à 40% sur une durée de 150 minutes, à un débit constant de 450nL/min. Les paramètres d'acquisition du spectromètre de masse (Q-Exactive Plus, Thermo Scientific) sont présentés dans le tableau suivant (Table 5) :

Table 5 : Récapitulatif des paramètres d'acquisition du Q-Exactive Plus (Thermo Scientific) pour l'analyse des extraits protéiques issus des myotubes humains exposés au WBS ou au SBS

|         | Paramètre           |              | Paramètre              |         |
|---------|---------------------|--------------|------------------------|---------|
| Général | Durée d'acquisition | 169 min      | Température (sprayeur) | 250 °C  |
|         | Polarité            | Positive     | Voltage (sprayeur)     | 1.8 kV  |
| MS      | Maximum IT          | 50 ms        | R (m/z 200)            | 140.000 |
|         | Scan Range          | 300-1800 m/z | AGC                    | 3*6     |
|         | DDA                 | TOP 10       |                        |         |
| MS2     | Maximum IT          | 100 ms       | R (m/z 200)            | 17.500  |
|         | Scan Range          | 300-1800 m/z | AGC                    | 1*5     |
|         | NCE                 | 27 eV        |                        |         |

#### ▪ Identifications et quantifications des protéines grâce au logiciel MaxQuant

Les protéines ont été identifiées grâce à l'algorithme Andromeda (MaxQuant, version 1.5.3.30), contre une banque de données protéiques contenant les séquences des protéines humaines (*SwissProt* ; taxonomie : 9606 ; incluant les isoformes ; Juillet 2018). Les séquences des 20 protéines majoritaires du sérum (décrites pour le système *Proteoprep 20*, Sigma) d'ours (taxonomies : 9646 & 29073, *Ailuropoda melanoleuca* et *Ursus maritimus*, *RefSeq*) et la séquence des peptides iRT ont été manuellement ajoutées. Les séquences *decoy* et les séquences des contaminants usuels ont été automatiquement ajoutées par l'algorithme *Andromeda* à partir du fichier contaminant.fasta. Les paramètres de recherche ont été définis comme suit : tolérance sur la première recherche de 20 ppm, tolérance sur la recherche principale de 4.5 ppm et tolérance la recherche MS/MS de 40ppm. Un nombre maximal de 1 site de clivage manqué a été accepté, la carbamidométhylation des cystéines a été paramétré en modification fixe ; l'acétylation des N-termini des protéines et l'oxydation des méthionines ont été paramétrés en modifications

variables. Le FDR (*False Discovery Rate*) a été fixé à 1% au niveau protéique et au niveau peptidique, avec une longueur minimale des séquences peptidiques fixée à 7 acides aminés. La quantification, la normalisation et l'estimation des abondances protéiques ont été réalisées grâce à l'algorithme *MaxLFQ* (*Label-Free Quantification*) implémenté dans le logiciel MaxQuant. Le *minimum ratio count* a été fixé à 1, et les peptides identifiés avec des modifications variables ont été pris en compte dans la quantification des protéines si le même peptide sans modification a également été identifié. L'ensemble des autres paramètres ont été laissé par défaut.

Seules les protéines quantifiées de manière robuste (i.e. avec au moins 6 intensités LFQ sur les 8 analyses, par groupe d'analyse), ainsi que les cas présents/absents (i.e. aucune valeur dans l'un des groupes WBS ou SBS), ont été conservées pour les tests statistiques. Après avoir validé que les valeurs d'intensités LFQ suivaient une loi normale (test Shapiro-Wilk, p-value <0.05) et avoir testé l'égalité des variances (test de Bartlett, p-value <0.05), les protéines différentiellement exprimées entre le groupe WBS et le groupe SBS ont été définies (T-test, p-value <0.05).

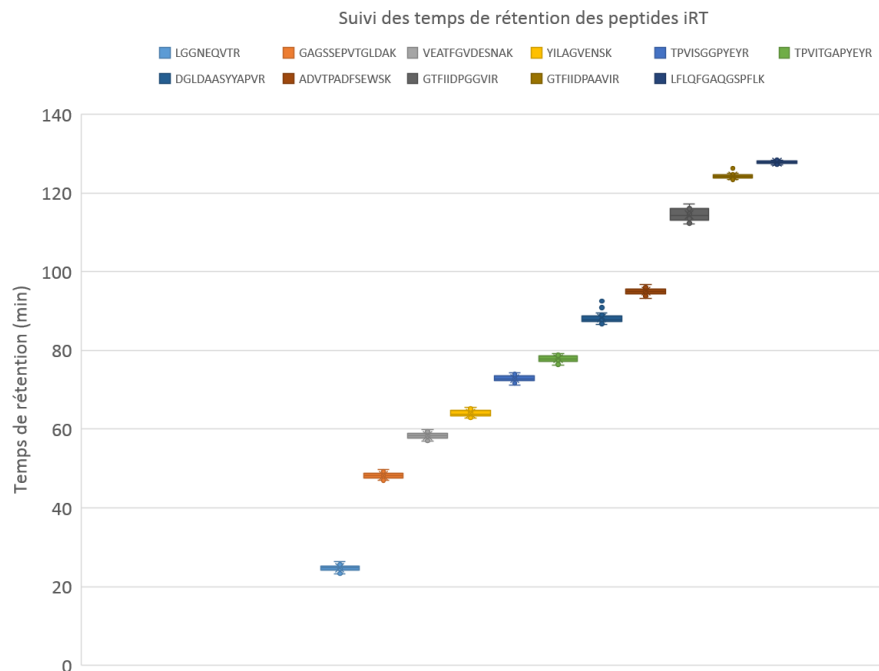
### ▪ **Traitement bioinformatique des données**

Les annotations fonctionnelles ont été extraites pour la liste des protéines différentielles (incluant les cas présent/absent) sur la base de données *Gene Ontology* (GO) grâce à l'algorithme présenté en page 64. Un calcul d'enrichissement en annotations fonctionnelles a ensuite été réalisé grâce au logiciel présenté en page 65. Les fonctions biologiques significativement régulées ont été fixées avec un score inférieur à 0.1, une p-value inférieur à 0.05 (test Benjamini-Hochberg) et un facteur d'enrichissement supérieur à 2.

## Résultats de l'analyse du protéome de myotubes humains exposés au WBS ou au SBS

- **Contrôles qualités : stabilité des temps de rétention des peptides iRT et reproductibilité des mesures quantitatives pour les analyses de l'échantillon de référence**

Les temps de rétention des peptides iRT dans l'échantillon de référence ont été suivis pour toute la durée des analyses. Un coefficient de variation moyen de 1.2% a été calculé pour les temps de rétention des 11 peptides iRT, sur l'ensemble des analyses de l'échantillon de référence, démontrant une excellente stabilité du système chromatographique (Figure 46).



*Figure 46 : Représentation du suivi des temps de rétention des 11 peptides iRT sur l'ensemble des analyses de l'échantillon de référence.*

Par ailleurs, la reproductibilité des intensités LFQ de l'ensemble des protéines quantifiées pour toutes les analyse de l'échantillon de référence a été vérifiée avec un coefficient de variation

médian inférieur à 18%, nous permettant de confirmer la reproductibilité des mesures quantitatives.

▪ **Résultats des analyses LC-MS/MS pour les deux groupes d'analyses**

3242 et 3605 protéines ont été identifiées dans le premier et le second groupe d'analyses, respectivement. Près de 72% des protéines (i.e. 2676) ont été communément identifiées entre les deux groupes d'analyses. Par ailleurs, 3034 et 3304 protéines ont été quantifiées dans le premier et le second groupe d'analyses, respectivement, dont 48 et 42 protéines ont été différenciellement exprimées entre la condition SBS et la condition WBS. Le nombre de protéines différenciellement exprimées est peu élevé comparé aux résultats présentés précédemment (e.g. 146 protéines différencielles entre le protéome musculaire de l'ours brun hibernant et le protéome musculaire de l'ours brun actif par stratégie SDS PaGE-XIC). Il est important de noter que dans le cadre de ce projet, nous avons volontairement augmenté de manière importante la variabilité individuelle en multipliant le nombre de donneurs de myotubes humains et le nombre de sera d'ours utilisés afin de mettre en évidence des régulations d'abondances protéiques systématiquement induites par les expositions au WBS, comparé aux expositions au SBS. En comparant les protéines différenciellement exprimées entre les deux groupes d'analyses, 6 protéines différencielles ont été communément identifiées : P4HA2, OAT, FBLN1, TSP2, HMGCS1 et ARFGAP1 (Table 6).

*Table 6 : Liste des 6 protéines différentielles communément identifiées dans les deux groupes d'analyses ainsi que les facteurs de changement d'abondance (FC) calculé entre la condition WBS et la condition SBS pour les deux groupes d'analyses.*

| N° Accession (UniProt) | Nom complet de la protéine                        | Nom de gène (UniProt) | FC WBS vs SBS<br>grp d'analyse 1 | FC WBS vs SBS<br>grp d'analyse 2 |
|------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| O15460                 | Isoform IIa of Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha | P4HA2                 | 1.46                             | 1.33                             |
| P04181                 | Ornithine aminotransferase, mitochondrial         | OAT                   | -1.44                            | -1.36                            |
| P23142                 | Isoform C of Fibulin                              | FBLN1                 | -2.12                            | -2.06                            |
| P35442                 | Thrombospondin                                    | TSP2                  | -1.67                            | -1.66                            |
| Q01581                 | Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic   | HMGCS1                | -1.59                            | -1.81                            |
| Q8N6T3                 | ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein | ARFGAP1               | -1.24                            | -1.24                            |

Il est intéressant de noter que les facteurs de changement d'abondance entre le traitement WBS et SBS étaient similaires entre les deux groupes d'analyse, démontrant la robustesse des mesures quantitatives réalisées au cours de ce projet. Par ailleurs, les niveaux d'expression de ces protéines pourraient être considérés comme des marqueurs des effets des traitements des myotubes humains au WBS et au SBS dans les prochains tests réalisés sur des myotubes humains traités.

Par la suite, les régulations protéiques identifiées dans la publication Chanon *et al.*, 2018 [8] évaluant les effets des sera d'ours brun (WBS vs SBS) sur des myotubes humains exposés ont été recherchées dans l'ensemble des protéines quantifiées dans les deux groupes d'analyses. Pour la protéine PKB (impliquée dans la dégradation des protéines par le systèmes autophagie-lysosome) ni le facteur de changement d'abondance (FC), ni l'évaluation statistique n'ont permis de mettre en évidence des régulations significatives de cette protéine pour les myotubes exposés au WBS, comparé à une exposition au SBS. Ces résultats sont en accord avec les mesures réalisées précédemment et nous permettent d'assurer la reproductibilité des mesures réalisées par spectrométrie de masse ou par Western-Blot. De plus, la régulation de l'activité de cette protéine

pourrait être davantage dépendante de son niveau de phosphorylation, que de son niveau d'expression pour les myotubes humains exposés au WBS, comparés aux cellules exposées au SBS. Par ailleurs, le niveau d'expression du transcrit de la protéine ATG3 mesuré pour les cellules exposées au WBS était inchangée comparé aux cellules exposés au SBS [8]. De la même manière, le niveau d'expression du transcrit de la protéine CTL était diminué après une exposition des cellules en WBS. Dans nos données de protéomique, nous mesurons des abondances protéiques inchangées pour ces deux protéines (ATG3 et CTL). Mesurer le niveau d'expression des transcrits de ces protéines sera donc à favoriser pour quantifier les effets de l'exposition au WB, plutôt que le niveau d'abondance des protéines.

Grâce au calcul d'enrichissement en annotations fonctionnelles sur les annotations fonctionnelles des protéines différentielles des deux groupes d'analyses, 10 fonctions biologiques régulées entre la condition WBS et SBS ont été mises en évidence. Parmi les fonctions biologiques régulées entre l'exposition des myotubes humains au WBS et au SBS, le métabolisme des lipides, le métabolisme des carbohydrates et la balance protéique ont été mis en évidence. Dans les mois à venir, ces données seront exploitées de manière plus détaillée afin de mieux comprendre les régulations induites par le WBS, comparé au SBS, sur le protéome des myotubes humains exposés. Un des objectifs sera également d'évaluer si les résultats obtenus sur les myotubes humains traités au WBS sont proches des résultats obtenus sur le protéome du muscle squelettique de l'ours brun analysés par spectrométrie de masse (maintien de la lipolyse, diminution de la consommation de substrats lipidiques et régulation de la balance protéique).



### **Conclusion : détection de protéines systématiquement régulées dans le protéome de myotubes humains exposés au WBS**

Grâce à une approche de protéomique quantitative différentielle, nous avons démontré que l'exposition au WBS induisait des régulations significatives sur le protéome de cellules musculaires humaines, comparé au traitement au SBS, confirmant la présence de molécules actives dans le sérum d'ours hibernant (WBS). Ces résultats préliminaires nous ont permis de mettre en évidence 6 protéines différentielles, quantifiées de manière reproductibles entre les deux groupes d'analyses et ce indépendamment de la variabilité biologique individuelle, qui pourront être utilisées comme des marqueurs systématiques des effets du WBS sur le protéome des myotubes humains.

Il sera également possible à l'avenir de comparer les régulations induites par le WBS sur le protéome des myotubes humains, aux régulations observées précédemment dans le muscle de l'ours brun hibernant. Ainsi, si les régulations sont similaires, identifier les molécules responsables des effets du WBS sur les myotubes nous permettrait de mieux comprendre les mécanismes de préservation musculaire chez l'ours brun hibernant.

Par la suite, nous avons mis en place des approches dans le but d'identifier les molécules actives dans le sérum d'ours brun (voir page 206).



## Publication 3

Titre : “Proteolysis inhibition by hibernating bear serum leads to increased protein content in human muscle cells”

Auteurs : Stéphanie Chanon, **Blandine Chazarin**, Benoit Toubhans, Christine Durand, Isabelle Chery, Maud Robert, Aurélie Vieille-Marchiset, Jon E. Swenson, Andreas Zedrosser, Alina L. Evans, Sven Brunberg, Jon M. Arnemo, Guillemette Gauquelin-Koch, Kenneth B. Storey, Chantal Simon, Stéphane Blanc, Fabrice Bertile & Etienne Lefai

DOI : 10.1038/s41598-018-23891-5

Publié en : Avril 2018

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Proteolysis inhibition by hibernating bear serum leads to increased protein content in human muscle cells

Received: 29 December 2017  
Accepted: 21 March 2018  
Published online: 03 April 2018

Stéphanie Chanon<sup>1</sup>, Blandine Chazarin<sup>2,3,4</sup>, Benoit Toubhans<sup>1</sup>, Christine Durand<sup>1</sup>, Isabelle Chery<sup>2,5</sup>, Maud Robert<sup>1,6</sup>, Aurélie Vieille-Marchiset<sup>1</sup>, Jon E. Swenson<sup>7,8</sup>, Andreas Zedrosser<sup>9,10</sup>, Alina L. Evans<sup>11</sup>, Sven Brunberg<sup>7</sup>, Jon M. Arnemo<sup>11,12</sup>, Guillemette Gauquelin-Koch<sup>4</sup>, Kenneth B. Storey<sup>13</sup>, Chantal Simon<sup>1</sup>, Stéphane Blanc<sup>2,5</sup>, Fabrice Bertile<sup>2,3</sup> & Etienne Lefai<sup>1</sup> 

Muscle atrophy is one of the main characteristics of human ageing and physical inactivity, with resulting adverse health outcomes. To date, there are still no efficient therapeutic strategies for its prevention and/or treatment. However, during hibernation, bears exhibit a unique ability for preserving muscle in conditions where muscle atrophy would be expected in humans. Therefore, our objective was to determine whether there are components of bear serum which can control protein balance in human muscles. In this study, we exposed cultured human differentiated muscle cells to bear serum collected during winter and summer periods, and measured the impact on cell protein content and turnover. In addition, we explored the signalling pathways that control rates of protein synthesis and degradation. We show that the protein turnover of human myotubes is reduced when incubated with winter bear serum, with a dramatic inhibition of proteolysis involving both proteasomal and lysosomal systems, and resulting in an increase in muscle cell protein content. By modulating intracellular signalling pathways and inducing a protein sparing phenotype in human muscle cells, winter bear serum therefore holds potential for developing new tools to fight human muscle atrophy and related metabolic disorders.

Muscle disuse atrophy is common in humans during immobilization, bedrest, spaceflight, denervation, cancer, and ageing, and therefore represents a major health issue<sup>1–3</sup>, and is also observed in a number of non-human models used for atrophy studies<sup>4</sup>. Basic knowledge regarding the underlying mechanisms is continuously growing, and an intricate network of signalling pathways appears to be involved in the regulation of muscle fibre size, including IGF1-AKT-FOXO, inflammatory cytokines, NFκB signaling, myostatin, and glucocorticoids<sup>5</sup>. However, there is still no fully effective therapy or prevention for disuse atrophy.

<sup>1</sup>CarMeN Laboratory, INSERM, INRA, University of Lyon, Pierre-Benite, France. <sup>2</sup>Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000, Strasbourg, France. <sup>3</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, 25 rue Becquerel, F-67087, Strasbourg, France. <sup>4</sup>Centre National d'Etudes Spatiales, CNES, 75039, Paris, France. <sup>5</sup>Département Ecologie, Physiologie et Ethologie, 23 rue Becquerel, F-67087, Strasbourg, France. <sup>6</sup>Department of digestive and bariatric surgery, Obesity Integrated Center, University Hospital of Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon 1 University, Lyon, France. <sup>7</sup>Faculty of Environmental Sciences and Natural Resource Management, Norwegian University of Life Sciences, 1432, Ås, Norway. <sup>8</sup>Norwegian Institute for Nature Research, 7485, Trondheim, Norway. <sup>9</sup>Department of Natural Sciences and Environmental Health, University College of Southeast Norway, N3800 Bø in Telemark, Bø, Norway. <sup>10</sup>Institute of Wildlife Biology and Game Management, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Gregor Mendel Str. 33, A-1180, Vienna, Austria. <sup>11</sup>Department of Forestry and Wildlife Management, Inland Norway University of Applied Sciences, NO-2480, Koppang, Norway. <sup>12</sup>Department of Wildlife, Fish, and Environmental Studies, Swedish University of Agricultural Sciences, SE-901 83, Umeå, Sweden. <sup>13</sup>Institute of Biochemistry and Department of Biology, Carleton University, 1125 Colonel By Drive, Ottawa, ON K1S 5B6, Canada. Correspondence and requests for materials should be addressed to E.L. (email: [lefai@univ-lyon1.fr](mailto:lefai@univ-lyon1.fr))

| Year of collection | Id Number | Age (years) | Gender | Winter weight (kg) | Summer weight (kg) | Mixes     |
|--------------------|-----------|-------------|--------|--------------------|--------------------|-----------|
| 2011               | W1015     | 2           | M      | 25                 | 27                 | M1W & M1S |
| 2012               | W1017     | 3           | F      | 56                 | 55                 |           |
|                    | W1105     | 2           | F      | 31.5               | na                 |           |
|                    | W1104     | 2           | F      | 30.2               | 29                 |           |
|                    | W1110     | 2           | F      | 27.3               | 29                 |           |
| 2013               | W1105     | 3           | F      | 55                 | 60                 | M2W & M2S |
|                    | W1207     | 2           | M      | 54                 | 64.5               |           |
|                    | W1110     | 3           | F      | 53                 | 58                 |           |
|                    | W1104     | 3           | F      | 52                 | 57                 |           |
|                    | W1202     | 3           | F      | 48                 | 48                 |           |
|                    | W1204     | 2           | M      | 40                 | 38                 |           |
|                    | W1209     | 2           | F      | 30                 | 27                 |           |
| 2014               | W1303     | 2           | F      | 36                 | 43                 | M3W & M3S |
|                    | W1317     | 2           | M      | 33                 | 40                 |           |
|                    | W1305     | 2           | F      | 37                 | 49                 |           |
|                    | W1303     | 2           | F      | 36                 | 43                 |           |
|                    | W1317     | 2           | M      | 33                 | 40                 |           |
| 2016               | W1404     | 3           | M      | 50                 | 68                 | M4W & M4S |
|                    | W1407     | 3           | F      | 74                 | 83.6               |           |
|                    | W1509     | 2           | F      | 25                 | 37.8               |           |
|                    | W1511     | 2           | F      | 29                 | 41                 |           |
|                    | W1512     | 2           | F      | 36                 | 51.2               |           |
|                    | N = 22    | 2.3 ± 0.1   | 16F/6M | 40.1 ± 2.8         | 46.7 ± 3.2         |           |

**Table 1.** Characteristics of the brown bears used in this study. A total of 22 pairs of bear serum (winter and summer) were collected during the indicated years. Equal volumes of serum were used to obtain four different mixes (M1W to M4W) of winter bear serum (WBS) and four paired mixes (M1S to M4S) of summer bear serum (SBS). All experiments presented in this study were performed with each of the mixes as replicates. Averages are given as mean ± SEM.

In humans, bed-rest and inactivity result in the loss of up to 30–40% of muscle volume after 2–4 months of disuse<sup>6–8</sup>, and this loss of muscle strength reaches 54% after 3 months of disuse<sup>6</sup>. Physical inactivity and associated loss of muscle mass and strength have severe deleterious consequences for metabolism and health, inducing metabolic inflexibility that could develop into a reduction in the capacity to oxidize lipid fuels, insulin resistance, and ectopic storage of fat<sup>9</sup>. In contrast, minimal or no loss of skeletal muscle mass and strength has been observed in several species during hibernation, despite prolonged disuse and fasting. Among them, bears (family Ursidae) are quite spectacular in this regard. They remain inactive up to seven months during the denning period, without eating, drinking, urinating, or defecating, and without arousal episodes<sup>10–12</sup>. Yet, a very low loss in protein content (from 4% to 17%) is reported in early winter, and this value remains uniquely stable during the following 3–4 months, whereas muscle and fibre cross-sectional area is preserved<sup>13–15</sup>, and muscle strength only decreases by 23%<sup>15</sup>.

The underlying protein sparing mechanisms in bears have yet to be discovered. So far, the current hypotheses, including recycling of nitrogen<sup>11,16–18</sup> and existence of a specific antioxidant strategy, still require deeper examination. Strikingly, bear skeletal muscles are resistant to the atrophic effects of denervation in winter, but not in summer<sup>19</sup>, suggesting that the nervous system is not directly involved. The direct corollary is the possible role of still unknown humoral factors in controlling bear muscle adaptive responses to hibernation. In support of this view, winter bear plasma has been reported to induce a 40% decrease in the net proteolytic rate in isolated rat muscles<sup>20</sup>, indicating the presence of circulating factors possibly able to trigger protein sparing during hibernation.

In this study, we exposed cultured human differentiated muscle cells to bear serum collected in winter and summer periods (WBS and SBS, respectively), and measured the impact on cell protein content and turnover. In addition, we explored the signalling pathways that control rates of protein synthesis and degradation. Our results highlight how serum from hibernating bears is able to trigger trans-species effects, hence being a potential source for new therapeutic molecules to fight human muscle atrophy and associated metabolic disorders.

## Materials and Methods

**Bear sample collection.** Free-ranging sub-adult (2- to 3-year-old) brown bears (*Ursus arctos*; 16 females and 6 males) were captured during both their active (summer) and inactive (winter) periods in Dalarna and Gävleborg counties, Sweden (see Table 1 for bear characteristics). The same bears were immobilized during winter (February) and recaptured during summer (June), as described previously<sup>21,22</sup>. Blood samples were collected from the jugular vein in tubes containing a clot activator (Venosafe™ VF-109SP, Terumo) within 20 min after darting, then centrifuged (2000g, 10 min) within 1 hour after sampling, and serum was immediately frozen on dry ice until storage at −80 °C. The study was approved by the Swedish Ethical Committee on Animal Experiment



(applications #C212/9, #C47/9, #C7/12, #C268/12, and #C18/15), the Swedish Environmental Protection Agency (NV-0758-14), and the Swedish Board of Agriculture (31- 11102/12). All procedures complied with Swedish laws and regulations.

We prepared different mixes of winter bear serum (WBS) and of summer bear serum (SBS) using the individual bear samples (Table 1). It is important to note that serum samples were collected from the same animals during both seasons, and that both summer and winter mixes were obtained by pooling the exact same volume of serum for all bears. Detailed characteristics of the sera in terms of metabolite and hormone levels and more global proteomic compositions have been published previously from the same bear population<sup>23,24</sup>.

**Culture of human skeletal muscle cells and treatments with bear serum mixes.** Human muscle cells were derived from *vastus lateralis* muscle biopsies obtained from healthy control donors (Diomedee experimental protocol). All procedures were approved by the French Ethical Committee SUD EST IV (Agreement #12/111 A 13-02) and performed according to the French legislation (Huriet's law). All patients gave their written consent after being informed of the nature, purpose, and possible risks of the study. The myoblasts were purified and differentiated into myotubes according to the procedure previously described in detail<sup>25</sup>. After five days of differentiation in the standard differentiation medium (DMEM medium), containing glucose (1 g/l) and fetal bovine serum (FBS, 2%), myotubes were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and then incubated at 37 °C with 5% of either SBS or WBS. The 5% concentration of bear serum was chosen on the basis of the previous work from Fuster *et al.*<sup>20</sup>, who tested the effects of plasma on *ex vivo* rat muscles. A control group was set as myotubes kept in differentiation medium containing 2% fetal bovine serum (FBS condition). For all experiments, repetitions were performed on cell preparations coming from different donors.

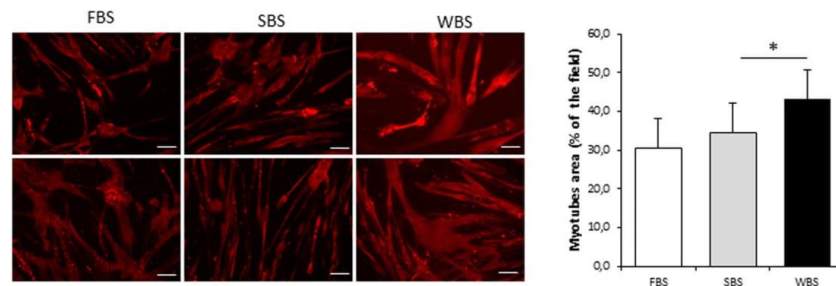
**Myosin heavy chain imaging and cell surface determination.** After exposure to FBS, SBS or WBS (48 h), human muscle cells were washed twice with PBS and fixed with 4% formaldehyde for 10 min, then permeabilized with 0.1% Triton X-100/PBS for 15 min and blocked by 1% bovine serum albumin for 30 min at room temperature. Myosin heavy chain protein of human myotubes was detected with primary antibody MF-20, followed by a secondary antibody Alexa Fluor® 555 Anti-Mouse IgG (H + L) incubation. Then, the area occupied by myotubes was measured, as described in detail previously<sup>26</sup>. For each well, corresponding to one mix applied to one cell preparation, at least ten pictures were taken to determine the percentage of surface occupied by myotubes.

**Measurement of protein degradation and synthesis rates.** Protein degradation rates were assayed, as previously described<sup>26</sup>. Human muscle cells were first incubated for 24 hours with [<sup>3</sup>H]-L-Tyrosine (2 µCi/ml), then washed three times with PBS, and shifted in chase medium (containing nonradiolabeled tyrosine) for two hours. The release of TCA-soluble radioactivity in the culture medium was assayed for the 6 hours following 24 hours of incubation in SBS and WBS conditions to determine the rate per hour of free tyrosine release. The total amount of incorporated radioactivity was then determined in the whole cell culture to calculate the degradation rate relative to the amount of labeled protein, expressed in percentage per hour. Protein degradation rates were also measured in the presence of proteasome (Bortezomib/PS-341, 1 µM) and lysosome (Concanamycin A, 0.1 µM) inhibitors, as previously described<sup>27</sup>. Briefly, after cell protein labeling (24 hours, see above), inhibitors or DMSO were added to FBS, SBS and WBS conditions one hour before monitoring the release of TCA-soluble radioactivity for 6 hours. All procedures were repeated with three different primary myotube preparations.

Protein synthesis rates were assessed using two different procedures. Incorporation of radiolabeled tyrosine was monitored, as already described<sup>26</sup>. Briefly, myotubes were exposed to SBS and WBS for 24 or 48 hours, and [<sup>3</sup>H]-L-Tyrosine (2 µCi/ml) was then added to the medium. After 2 hours incubation, cells were scraped in 10% TCA to precipitate proteins. The pellet was resuspended in lysis buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Glycerol 5%, NP 40 1%, EDTA 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 20 mM and DTT 1 mM), and protein concentration and radioactivity were quantified. Protein synthesis rates are presented as means ± SEM of at least three determinations with different myotube preparations. We also used puromycin incorporation assays to determine protein synthesis rates using the SunSET method<sup>28</sup>. Cells were exposed to SBS and WBS for 24 or 48 hours and puromycin (5 µM) was added for the last 30 minutes. Measurements for the FBS condition were only performed after 48 hours. Cells were then scraped in lysis buffer to extract proteins. After quantification, 20 µg of proteins were immunoblotted using an anti-puromycin antibody (see western blot procedures).

**Western blotting.** After bear serum incubation, cells were scraped into 200 µl of ice-cold lysis buffer (TRIS-HCl 20 mM, NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Glycerol 5%, NP 40 1%, EDTA 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 20 mM and DTT 1 mM) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, France). Protein concentration was determined by Bradford quantification. Western blotting was performed, as described previously<sup>29</sup>, loading 20 µg of total protein on precast gels (Mini-protean TGX Stain-free™ gel, Biorad, France). After migration, gels were UV exposed for 3 minutes and pictures were taken for further quantification of protein loading. After semi-dry transfer, all membranes were blocked with 4% BSA (Bovine Serum Albumin, Euromedex, Souffelweyheim, France) before incubation with primary antibodies (see Table S1). Corresponding secondary HRP antibodies were used for chemiluminescence revelation (Chemidoc Bio-Rad).

**Quantification of mRNAs by real-time RT-PCR.** Total RNA was isolated using the TRIzol reagent (Invitrogen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. RT-qPCR was performed as previously described<sup>29</sup>. TBP (Tata-box Binding Protein) mRNA levels were determined in each sample and was used as internal standard for normalization. No change in TBP expression was found comparing FBS, SBS and WBS conditions. The primers and real-time PCR assay conditions are listed in Table S2.



**Figure 1.** Winter bear serum promotes an increase in human muscle cell size. Illustrative immunodetection and corresponding quantification of myosin heavy chain in cultured myotubes upon standard culture condition with fetal bovine serum (FBS), winter bear serum (WBS) or summer bear serum (SBS) treatment. Results are the mean  $\pm$  SEM of 6 independent experiments (different cell preparations and bear serum mixes). Scale bar: 100  $\mu$ m. Significant differences result from paired T-tests (\* $p < 0.05$ ).

**Statistical analysis.** All data are presented as means  $\pm$  SEM, and fold change always related to the SBS condition. To compare the SBS and WBS conditions, statistical significance was determined using paired student t-tests, with \* indicating a  $p$  value  $< 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and NS not significant.

## Results

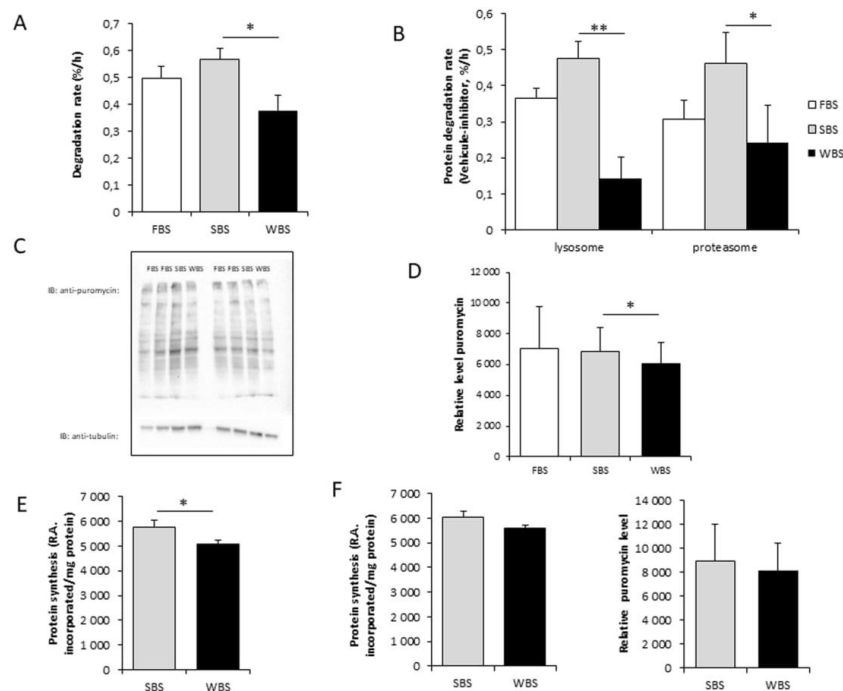
**Human muscle cells exposed to WBS exhibit higher protein content.** To evaluate the ability of bear serum to impact human muscle cell protein content, we first incubated quiescent differentiated polynucleated myotubes with bear serum collected in winter during hibernation and in summer during their active period. After 48 hours, we determined the cell content of heavy chain myosin by immunofluorescence and quantified myotube surface area (Fig. 1). While no difference could be observed between FBS and SBS conditions, the WBS treatment induced a significant increase in muscle cell surface area ( $+21.7 \pm 7.2\%$   $p = 0.015$ ) compared to SBS, indicating higher protein content.

**Reduced protein turnover in human myotubes exposed to WBS compared to SBS.** To investigate the mechanisms driving the change in protein content of treated human myotubes, we next determined the rates of protein synthesis and degradation. Whereas incubation with SBS did not change the degradation rate compared to standard culture conditions (FBS condition), a 33% lower protein degradation rate ( $0.56 \pm 0.04$  vs  $0.37 \pm 0.06$ ,  $p = 0.003$ ) was recorded after 24 hours of incubation with WBS compared to the SBS condition (Fig. 2A). To determine whether this could be related to proteasomal and/or lysosomal pathways, we next measured degradation rates in the presence of proteasome (PS-341, Bortezomid) or lysosomal proton pump (concanamycin A) specific inhibitors. Calculation of the inhibitor-sensitive fraction by subtracting the rates of proteolysis in cells treated with inhibitors from those in untreated cells then represented the actual contribution of each pathway in the total degradation process. As shown in Fig. 2B, the contribution of both proteasomes and lysosomes to the degradation rates were dramatically decreased ( $-47\%$  and  $-71\%$ , respectively) in human myotubes exposed to WBS compared to the SBS condition, thus showing the involvement of both systems in the response to WBS.

We next quantified protein synthesis rates in myotubes exposed to bear serum by measuring the incorporation of puromycin (Fig. 2C,D). SBS did not change protein synthesis rates compared to standard culture conditions (FBS condition) whereas the puromycin incorporation was significantly decreased under the WBS condition. The same result was observed when measurements were performed using incorporation of [ $^3$ H]-tyrosine into neosynthesized proteins. A mild but significant decrease was found only after 48 hours of treatment in WBS-compared to SBS-treated cells (Fig. 2E), while after 24 hours of treatment, rates were slightly, but not significantly, lower (Fig. 2F). The human myotubes exposed to WBS thus displayed a mildly reduced rate of protein synthesis, whereas protein degradation was dramatically inhibited.

**Effects of WBS on proteasomal and lysosomal degradation pathways.** To explore the ubiquitin-proteasome system in myotubes exposed to bear serum, we first quantified the level of ubiquitinated proteins in human myotubes under FBS, SBS and WBS conditions (Fig. 3A). Comparing SBS and WBS conditions, no differences could be found in the control (veh) and lysosomal inhibition (Conc.A) conditions, whereas proteasome inhibition (PS-341) promoted an increase in the amount of ubiquitinated protein (Fig. 3B). In this latter condition, the increase was significantly reduced in the WBS compared to SBS condition, suggesting that WBS alone lowers proteasome activity. The overall process from ubiquitin ligation to protein degradation was explored with the quantification of the mRNA levels of ubiquitin (UBB), E2 Ubiquitin-Conjugating Enzyme B (UBE2B), the proteasome subunit alpha1 (PSMA1), and muscle specific E3 ligases TRIM63 and FBXO32 (Fig. 3C,D). Expression levels of all of these messengers were similar in SBS and WBS conditions, indicating that lower proteasomal degradation due to WBS treatment was unlikely to originate from transcriptional regulations and would most likely be due to lower activities of related components.





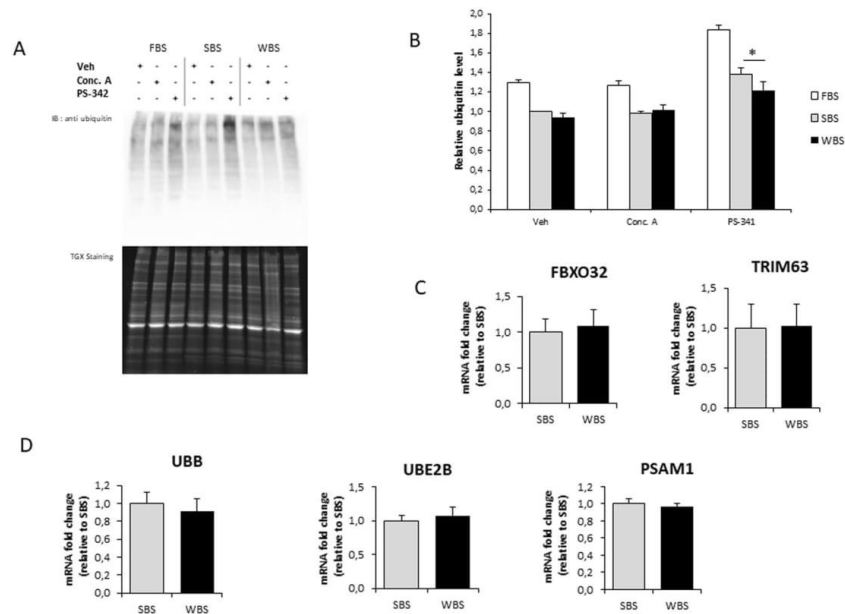
**Figure 2.** Winter bear serum inhibits protein degradation and synthesis rates in human muscle cells. Overall protein degradation rates in human myotubes exposed for 24 hours to FBS, SBS or WBS (A), and rates of proteolysis after proteasomal or lysosomal inhibition (B) were measured. For the latter, twenty-four hours after serum exposure, inhibitors (1  $\mu$ M Bortezomid [PS-341], 0.1  $\mu$ M concanamycin [Conc. A], or DMSO only [Veh.]) were added, and rates of proteolysis were determined for six hours. Proteasomal and lysosomal degradation rates were expressed as the difference between total and specifically inhibited rates. Overall protein synthesis rates were assessed in human myotubes with quantification of puromycin incorporation after 48 hours of exposure to FBS, SBS or WBS (C,D). Protein synthesis rates were also assessed by measuring [3H]-tyrosine incorporation in human myotubes exposed for 48 hours to SBS or WBS (E). (F) Shows incorporation rates of [3H]-tyrosine and puromycin after 24 hours. Results are the mean  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments measured in duplicate. Significant differences result from paired T-tests (\* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01).

Autophagy was investigated by quantification of SQSTM1 (p62) protein and LC3II/I ratios (Fig. 4A–C). During induction of the autophagosomal process, SQSTM1 binds the ubiquitinated proteins and LC3I is lipidated to LC3II, resulting in an increase in the LC3II/I ratio. We observed a highly significant lower abundance in SQSTM1 under WBS versus SBS conditions, whereas LC3b II/I ratios were not significantly decreased. At the mRNA level, expression of the E2-conjugating enzyme ATG3, and the lysosomal hydrolase cathepsin L (CTSL) were quantified in WBS- and SBS-treated cells (Fig. 4D). Whereas ATG3 expression was not modified, expression of CTSL was lower in the WBS condition, which would be in line with reduced lysosomal protein degradation.

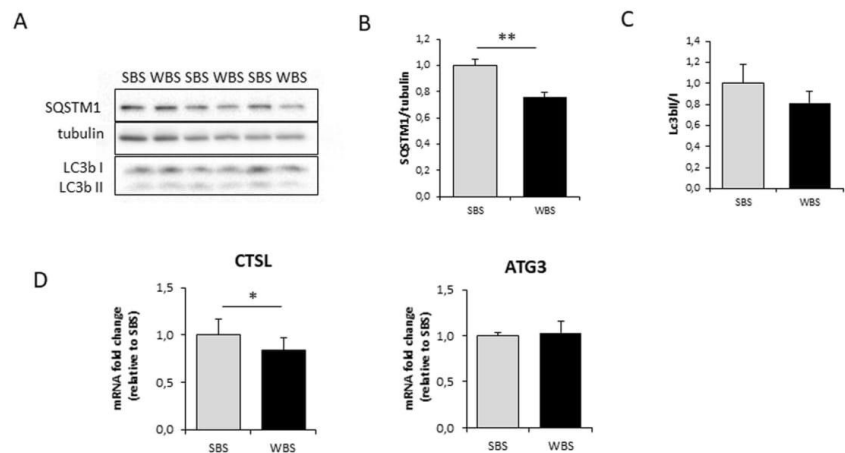
**Effects of WBS on protein metabolism signaling pathways.** Intracellular signaling pathways were investigated by the quantification of the phosphorylated fraction of several key actors involved in the regulation of protein turnover (Fig. 5). The fraction of phosphorylated PKB (protein kinase B), but not mTOR (mechanistic Target of Rapamycin), was found at higher levels in WBS- than SBS-treated cells. Accordingly, the downstream target FOXO3 (Forkhead box O3) was also found to be hyper-phosphorylated and thus presumably inactivated in the WBS condition. Meanwhile, similar phosphorylation levels of serum/glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1) were recorded in SBS and WBS conditions, indicating that it might not participate in the higher phosphorylation level of FOXO3 that we observed upon WBS exposure. Finally, the levels of phosphorylation of S6K (ribosomal protein S6 kinase) and GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) were found to be not statistically different between SBS and WBS conditions.

## Discussion

Despite prolonged periods of fasting and inactivity, conditions which induce dramatic muscle wasting in humans<sup>30,31</sup>, the muscle mass and strength of hibernating bears are remarkably well preserved<sup>14,32–34</sup>. This

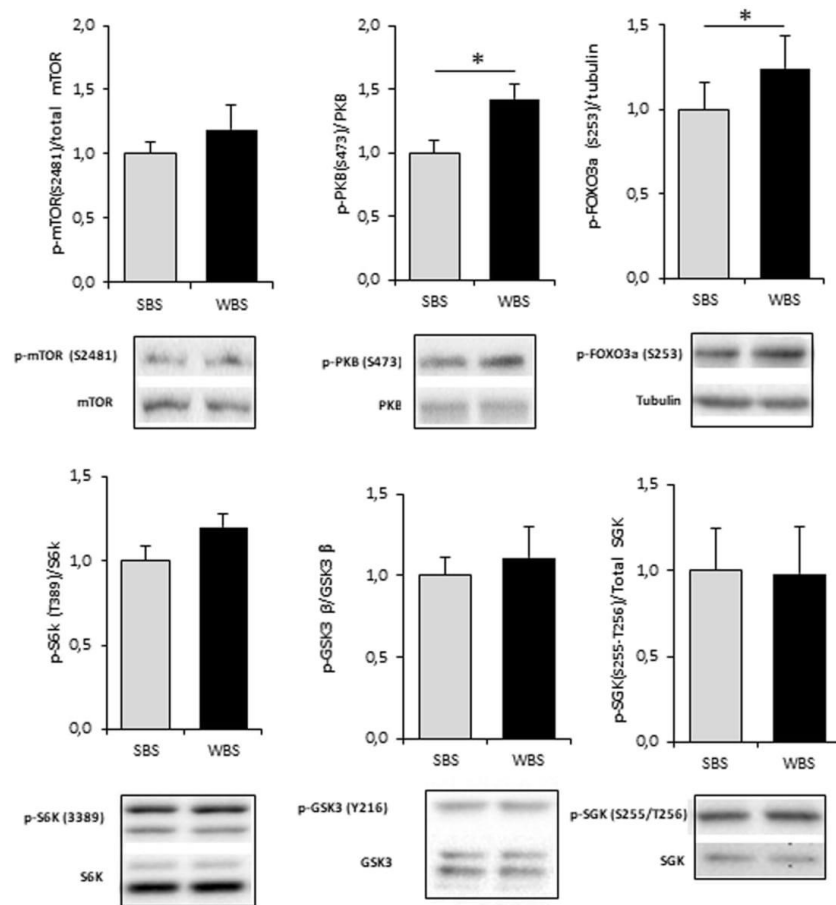


**Figure 3.** Winter bear serum inhibits proteasomal degradation in human muscle cells. Illustrative immunodetection (A) and corresponding quantification (B) of ubiquitinated proteins in human myotubes exposed for 24 hours to FBS, SBS or WBS. Quantifications were performed after one hour of proteasomal (1  $\mu$ M Bortezomid [PS-341]) or lysosomal (0.1  $\mu$ M concanamycin [Conc. A]) inhibition, and in control conditions (DMSO only [Veh.]). Myotube expression levels of muscle specific E3-specific ligase FBXO32 (MuRF1) and TRIM63 (Atrogin-1) (C), and of ubiquitin (UBB) and two components of the proteasome system (UBE2B and PSAM1) were measured by RT-qPCR, normalized against TBP mRNA levels, and expressed as a fold change relative to the SBS condition. Results are the mean  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments. Significant differences result from paired T-tests (\* $p < 0.05$ ).



**Figure 4.** Winter bear serum impacts main factors of autophagy/lysosomal degradation in human muscle cells. Illustrative immunodetection (A) and corresponding quantification (B) of SQSTM1 (p62) and the LC3b I/II ratio in human myotubes exposed for 24 hours to SBS or WBS (C). Myotube expression of CTSL and ATG3 was measured by RT-qPCR, normalized against TBP mRNA levels, and expressed as a fold change relative to the SBS condition (D). Data are the mean  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments. Significant differences result from paired T-tests (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).





**Figure 5.** Winter bear serum activates mTOR/PKB pathways in human muscle cells. Illustrative blots and corresponding quantification of mTOR, PKB, FOXO3a, S6K, GSK3beta, SGK and their phosphorylated forms. Results are the mean  $\pm$  SEM of at least of 3 independent experiments. Significant differences result from paired T-tests (\* $p < 0.05$ ).

preservation is part of an overall adaptation scheme in which energy and metabolic changes are triggered in the cardiovascular system, kidney, liver, and intestine (microbiota). In this regard, the coordination of tissue and organ functions may involve circulating factors, and winter bear plasma has been reported to decrease the net proteolytic rate in isolated rat muscles<sup>20</sup>. As a new approach to overcome the lack of efficient treatment or prevention of human muscle disuse-induced atrophy, we explored here how WBS can affect protein turnover in human muscle cells, studying protein synthesis and degradation, as well as key actors involved in regulating pathways. To examine if circulating factors could impact human muscle cell physiology, we choose to incubate cells with bear serum rather than plasma that may contain coagulation inhibitors susceptible to induce effects *per se* like alteration of enzyme activities. Application of WBS to human myotubes resulted in a unique situation, where a marked inhibition of proteolysis and a slight decrease in protein synthesis were observed. The resulting positive balance in protein turnover led to a higher protein content in muscle cells.

Muscle protein turnover is a tightly regulated process, the equilibrium between catabolic and anabolic pathways being under the control of several endocrine, paracrine, and autocrine factors (for review see<sup>5,35–38</sup>). In any situation of muscle atrophy, whether it results from immobilization, denervation, fasting, ageing (sarcopenia), inflammation, or cancer (cachexia), muscle protein degradation is activated through two intricate systems: the ubiquitin proteasome and autophagy systems<sup>39,40</sup>. We show here that, in human myotubes, both proteasomal and lysosomal system activities were reduced in the WBS condition compared to SBS. Considering signaling pathways, the canonical PKB actor was found activated and accordingly, the downstream FOXO3 transcription factor

was inactivated by higher phosphorylation. Coordinated activation of this signaling pathway may thus explain most of the observed effects on the proteasomal and lysosomal systems, considering their role in the control of protein degradation and regulation of muscle mass<sup>5,27,36,41</sup>.

Inactivation of FOXO3 is consistent with the recent demonstration of FOXO4 inactivation in hibernating squirrels<sup>42</sup>. Although serum/glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1) has been shown to be involved in the prevention of atrophy in hibernating 13-lined ground squirrels<sup>34,43</sup>, we recorded similar phosphorylation levels of SGK1 in myotubes exposed to either SBS and WBS conditions. Thus, in our human muscle cell model, SGK1 may not participate in the regulating the higher phosphorylation level of FOXO3 that we observed upon WBS exposure. The observed increase in PKB phosphorylation of treated myotubes could also reflect the modified insulin sensitivity of the bear skeletal muscle tissue during hibernation<sup>44</sup> and highlights a promising future in the field of human diabetes.

Among the few factors inhibiting muscle proteolysis described to date, insulin and amino-acids are the best characterized<sup>45–48</sup>. Their circulating levels are increased in the post-prandial situation, at the same time substrates and energy are available for muscle protein metabolism<sup>47,49</sup>. These anabolic conditions trigger activation of the PKB/mTOR pathway, with subsequent inhibition of proteolysis and concomitant activation of proteosynthesis. Strikingly, we found an activation of PKB with positive consequences on protein content in human myotubes exposed to WBS, despite the fact that the serum originated from animals that had been food deprived and physically inactive for at least three months. How WBS can mimic an anabolic situation for human cultured muscle cells remains to be elucidated. Moreover, considering the ability of WBS to reproduce in treated human cells the regulation of protein turnover already described in hibernating bear muscle (i.e. lower synthesis and lower degradation rates<sup>13</sup>), it is highly probable that the maintenance of muscle mass during bear hibernation involves one or several circulating factors.

To explain how WBS can activate PKB, leading to FOXO inactivation and protein degradation inhibition in human muscle cells, active circulating factors may be sought among those whose concentrations are known to change between seasons, either due to the central regulation of hibernation via the hypothalamic-pituitary axis<sup>50,51</sup>, and/or in relation to the nutritional status of the animals through their gut-liver axis<sup>52,53</sup>. Although several differences have already been highlighted in the blood composition of active and hibernating bears<sup>11,23,24,51–57</sup>, no particular factors have yet been identified that specifically control muscle adaptive responses. Serum conveys hormones and growth factors that are major actors in muscle mass regulation<sup>58,59</sup>. However, considering the reduced metabolic rate in hibernating bears<sup>60</sup>, it is difficult to imagine an increase in such factors during winter. Of note, higher levels of blood proteins and hematocrit have been reported during hibernation<sup>23</sup>, which can likely be attributed to dehydration in hibernating bears. Such seasonal changes may lead to higher concentrations of circulating factors during winter, without any change in their production or clearance.

Among the circulating components that are known to show seasonal regulation in bears, fatty acids, whose composition are changed due to prolonged fasting, could play a role. Lipids are known regulators of muscle mass<sup>61</sup>, notably through saturated fatty acids and their ability to generate ceramides. Whereas both lipid classes negatively affect muscle mass, the positive impact of other lipid moieties cannot be excluded. Notably ketone bodies could be involved, since their circulating levels are increased by fasting<sup>62,63</sup> and hibernation<sup>64</sup>, and they are known to be involved in the regulation of muscle mass<sup>65</sup>. In hibernating bears, fasting is also associated with modifications in urea and nitrogen metabolism<sup>66</sup>. The role of specific amino acids can not be ruled out, such as BCAA<sup>67</sup> or citrulline<sup>68</sup>, even if supplementation experiments have not yet produced conclusive results. Finally, from the recent proteomic characterization of WBS and SBS<sup>69</sup>, it has been proposed that  $\alpha$ 2-macroglobulin, a non-specific protease inhibitor that exhibits higher circulating levels in winter bears, could be involved in the reduction in protein degradation in isolated rat muscle when incubated with winter bear plasma<sup>70</sup>. Therefore,  $\alpha$ 2-macroglobulin could be involved in the reduced proteolysis of human muscle cells that we observed here upon WBS treatment.

In conclusion, the circulating components that induce the potent trans-species effects on human muscle cells and that make their phenotype closely mimic that of winter bear muscles are probably those that are responsible for the maintenance of muscle mass and strength in hibernating bears. Their identification will no doubt pave the way for a new field of studies that will investigate novel solutions to prevent and/or reverse muscle atrophy in humans.

## References

1. Bodine, S. C. Hibernation: The search for treatments to prevent disuse-induced skeletal muscle atrophy. *Exp. Neurol.* **248**, 129–135 (2013).
2. Dodson, S. *et al.* Muscle wasting in cancer cachexia: clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies. *Annu Rev Med* **62**, 265–79 (2011).
3. Narici, M. V. & de Boer, M. D. Disuse of the musculo-skeletal system in space and on earth. *Eur J Appl Physiol* **111**, 403–20 (2011).
4. Romanick, M., Thompson, L. V. & Brown-Borg, H. M. Murine models of atrophy, cachexia, and sarcopenia in skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 1410–1420 (2013).
5. Bonaldo, P. & Sandri, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Model Mech* **6**, 25–39 (2013).
6. Alkner, B. A. & Tesch, P. A. Knee extensor and plantar flexor muscle size and function following 90 days of bed rest with or without resistance exercise. *Eur J Appl Physiol* **93**, 294–305 (2004).
7. Bloomfield, S. A. Changes in musculoskeletal structure and function with prolonged bed rest. *Med Sci Sports Exerc* **29**, 197–206 (1997).
8. Trappe, T. A., Burd, N. A., Louis, E. S., Lee, G. A. & Trappe, S. W. Influence of concurrent exercise or nutrition countermeasures on thigh and calf muscle size and function during 60 days of bed rest in women. *Acta Physiol.* **191**, 147–59 (2007).
9. Bergougnan, A., Rudwill, F., Simon, C. & Blanc, S. Physical inactivity as the culprit of metabolic inflexibility: evidence from bed-rest studies. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **111**, 1201–1210 (2011).
10. Manchi, S. & Swenson, J. E. Denning behaviour of Scandinavian brown bears *Ursus arctos*. *Wildl Biol* **11**, 123–132 (2005).
11. Nelson, R. A., Wahner, H. W., Jones, J. D., Ellefson, R. D. & Zollman, P. E. Metabolism of bears before, during, and after winter sleep. *Am J Physiol* **224**, 491–6 (1973).

12. Schwartz, C. C., Miller, S. D. & Haroldson, M. A. Grizzly bear. In *Wild Mammals of North America: Biology, Management, and Conservation*. (eds Feldhamer, G. A., Thompson, B. & Chapman, J. A.) 556–586 (Johns Hopkins University Press, 2003).
13. Lohuis, T. D., Harlow, H. J. & Beck, T. D. Hibernating black bears (*Ursus americanus*) experience skeletal muscle protein balance during winter anorexia. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **147**, 20–8 (2007).
14. Tinker, D. B., Harlow, H. J. & Beck, T. D. Protein use and muscle-fiber changes in free-ranging, hibernating black bears. *Physiol Zool* **71**, 414–424 (1998).
15. Harlow, H. J., Lohuis, T., Beck, T. D. & Iaizzo, P. A. Muscle strength in overwintering bears. *Nature* **409**, 997 (2001).
16. Barboza, P. S., Farley, S. D. & Robbins, C. T. Whole-body urea cycling and protein turnover during hyperphagia and dormancy in growing bears (*Ursus americanus* and *U. arctos*). *Can. J. Zool.-Rev. Can. Zool.* **75**, 2129–2136 (1997).
17. Hissa, R. *Physiology of the European brown bear (Ursus arctos arctos)*. **34**, (1997).
18. Nelson, R. A. *et al.* Behavior, Biochemistry, and Hibernation in Black, Grizzly, and Polar Bears. *Bears Their Biol. Manag.* **5**, 284 (1983).
19. Lin, D. C., Hershey, J. D., Mattoon, J. S. & Robbins, C. T. Skeletal muscles of hibernating brown bears are unusually resistant to effects of denervation. *J Exp Biol* **215**, 2081–7 (2012).
20. Fuster, G., Busquets, S., Almendro, V., Lopez-Soriano, F. J. & Argiles, J. M. Antiproteolytic effects of plasma from hibernating bears: a new approach for muscle wasting therapy? *Clin Nutr* **26**, 658–661 (2007).
21. Arnemo, J. M. *et al.* Biomedical Protocols for Free-ranging Brown Bears, Wolves, Wolverines and Lynx. Report. [www.bearproject.info/publications/](http://www.bearproject.info/publications/) (2012).
22. Evans, A. L. *et al.* Capture, anesthesia, and disturbance of free-ranging brown bears (*Ursus arctos*) during hibernation. *PLoS One* **7**, e40520 (2012).
23. Græslı, A. R. *et al.* Haematological and biochemical reference intervals for free-ranging brown bears (*Ursus arctos*) in Sweden. *BMC Vet. Res.* **10**, 183 (2014).
24. Græslı, A. R. *et al.* Seasonal variation in haematological and biochemical variables in free-ranging subadult brown bears (*Ursus arctos*) in Sweden. *BMC Vet. Res.* **11**, 301 (2015).
25. Perrin, L. *et al.* Human skeletal myotubes display a cell-autonomous circadian clock implicated in basal myokine secretion. *Mol. Metab.* **4**, 834–845 (2015).
26. De Larichaudy, J. *et al.* TNF- $\alpha$ - and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism. *Skelet. Muscle* **2**, 2 (2012).
27. Zhao, J. *et al.* FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab.* **6**, 472–483 (2007).
28. Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M. & Pierre, P. SUNSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods* **6**, 275–7 (2009).
29. Dessalle, K. *et al.* SREBP-1 transcription factors regulate skeletal muscle cell size by controlling protein synthesis through myogenic regulatory factors. *PLoS One* **7**, e50878 (2012).
30. Jagoe, R. T., Lecker, S. H., Gomes, M. & Goldberg, A. L. Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation. *FASEB J* **16**, 1697–1712 (2002).
31. Wijngaarden, M. A. *et al.* Regulation of skeletal muscle energy/nutrient-sensing pathways during metabolic adaptation to fasting in healthy humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **307**, E885–95 (2014).
32. Lee, K. *et al.* Overcoming muscle atrophy in a hibernating mammal despite prolonged disuse in dormancy: proteomic and molecular assessment. *J Cell Biochem* **104**, 642–56 (2008).
33. Gao, Y. F. *et al.* Skeletal muscle is protected from disuse in hibernating dauria ground squirrels. *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol* **161**, 296–300 (2012).
34. Andres-Mateos, E. *et al.* Activation of serum/glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1) is important to maintain skeletal muscle homeostasis and prevent atrophy. *EMBO Mol Med* **5**, 80–91 (2013).
35. Glass, D. J. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol. Med.* **9**, 344–350 (2003).
36. Sandri, M. Signaling in Muscle Atrophy and Hypertrophy. *Physiology* **23**, 160–170 (2008).
37. Lee, S. W. *et al.* Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **15**, 1537–1545 (2004).
38. Gordon, B. S., Kelleher, A. R. & Kimball, S. R. Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2147–2157 (2013).
39. Bilodeau, P. A., Coyne, E. S. & Wing, S. S. The ubiquitin proteasome system in atrophying skeletal muscle: roles and regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **311**, C392–403 (2016).
40. Sandri, M. Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Lett.* **584**, 1411–1416 (2010).
41. Stitt, T. N. *et al.* The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents short article expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol. Cell* **14**, 395–403 (2004).
42. Zhang, Y., Tessier, S. N. & Storey, K. B. Inhibition of skeletal muscle atrophy during torpor in ground squirrels occurs through downregulation of MyoG and inactivation of Foxo4. *Cryobiology* **73**, 112–119 (2016).
43. Ivakine, E. A. & Cohn, R. D. Maintaining skeletal muscle mass: lessons learned from hibernation. *Exp Physiol* **99**, 632–7 (2014).
44. Kamine, A., Shimozuru, M., Shibata, H. & Tsubota, T. Changes in blood glucose and insulin responses to intravenous glucose tolerance tests and blood biochemical values in adult female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Jpn. J. Vet. Res.* **60**, 5–13 (2012).
45. Chen, Q. *et al.* Insulin alleviates degradation of skeletal muscle protein by inhibiting the ubiquitin-proteasome system in septic rats. *J. Inflamm. Lond. Engl.* **8**, 13 (2011).
46. Chotechuan, N. *et al.* Down-regulation of the ubiquitin-proteasome proteolysis system by amino acids and insulin involves the adenosine monophosphate-activated protein kinase and mammalian target of rapamycin pathways in rat hepatocytes. *Amino Acids* **41**, 457–468 (2011).
47. Sadiq, F., Hazlerigg, D. G. & Lomax, M. A. Amino acids and insulin act additively to regulate components of the ubiquitin-proteasome pathway in C2C12 myotubes. *BMC Mol. Biol.* **8**, 23 (2007).
48. Everman, S. *et al.* Insulin does not stimulate muscle protein synthesis during increased plasma branched-chain amino acids alone but still decreases whole body proteolysis in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **311**, E671–E677 (2016).
49. Kee, A. J. *et al.* Ubiquitin-proteasome-dependent muscle proteolysis responds slowly to insulin release and refeeding in starved rats. *J. Physiol.* **546**, 765–776 (2003).
50. Azizi, F., Mannix, J. E., Howard, D. & Nelson, R. A. Effect of winter sleep on pituitary-thyroid axis in American black bear. *Am J Physiol* **237**, E227–30 (1979).
51. Tsubota, T., Garshelis, D. L., Nelson, R. A. & Bahr, J. M. Sex steroid and prolactin profiles in male American black bears (*Ursus americanus*) during denning. *J. Vet. Med. Sci.* **61**, 81–83 (1999).
52. Hissa, R., Hohtola, E., Tuomala-Saramaki, T., Laine, T. & Kallio, H. Seasonal changes in fatty acids and leptin contents in the plasma of the European brown bear (*Ursus arctos arctos*). *Ann. Zool. Fenn.* **35**, 215–224 (1998).
53. Sommer, F. *et al.* The Gut Microbiota Modulates Energy Metabolism in the Hibernating Brown Bear *Ursus arctos*. *Cell Rep* **14**, 1655–61 (2016).



54. Arinell, K. *et al.* Brown bears (*Ursus arctos*) seem resistant to atherosclerosis despite highly elevated plasma lipids during hibernation and active state. *Clin Transl Sci* **5**, 269–72 (2012).
55. Chow, B. A., Donahue, S. W., Vaughan, M. R., McConkey, B. & Vijayan, M. M. Serum immune-related proteins are differentially expressed during hibernation in the American black bear. *PLoS One* **8**, e66119 (2013).
56. Harlow, H. J., Lohuis, T., Grogan, R. G. & Beck, T. D. I. Body mass and lipid changes by hibernating reproductive and nonreproductive black bears (*Ursus americanus*). *J. Mammal.* **83**, 1020–1025 (2002).
57. LeBlanc, P. J. *et al.* Correlations of plasma lipid metabolites with hibernation and lactation in wild black bears *Ursus americanus*. *J. Comp Physiol B* **171**, 327–34 (2001).
58. Perrini, S. *et al.* The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J. Endocrinol.* **205**, 201–10 (2010).
59. Rommel, C. *et al.* Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* **3**, 1009–13 (2001).
60. Tøien, O. *et al.* Hibernation in black bears: independence of metabolic suppression from body temperature. *Science* **331**, 906–9 (2011).
61. Lipina, C. & Hundal, H. S. Lipid modulation of skeletal muscle mass and function. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **8**, 190–201 (2017).
62. Cotter, D. G., Schugar, R. C., Wentz, A. E., d'Avignon, D. A. & Crawford, P. A. Successful adaptation to ketosis by mice with tissue-specific deficiency of ketone body oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **304**, E363–74 (2013).
63. Robinson, A. M. & Williamson, D. H. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev* **60**, 143–87 (1980).
64. Andrews, M. T., Russett, K. P., Drewes, L. R. & Henry, P. G. Adaptive mechanisms regulate preferred utilization of ketones in the heart and brain of a hibernating mammal during arousal from torpor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**, R383–93 (2009).
65. Zou, X. *et al.* Acetoacetate Accelerates Muscle Regeneration and Ameliorates Muscular Dystrophy in Mice. *J Biol Chem* **291**, 2181–95 (2016).
66. Stenvinkel, P., Jani, A. H. & Johnson, R. J. Hibernating bears (*Ursidae*): metabolic magicians of definite interest for the nephrologist. *Kidney Int* **83**, 207–12 (2013).
67. Bajotto, G., Sato, Y., Kitaura, Y. & Shimomura, Y. Effect of branched-chain amino acid supplementation during unloading on regulatory components of protein synthesis in atrophied soleus muscles. *Eur J Appl Physiol* **111**, 1815–28 (2011).
68. Ham, D. J. *et al.* L-Citrulline Protects Skeletal Muscle Cells from Cachectic Stimuli through an iNOS-Dependent Mechanism. *PLoS One* **10**, e0141572 (2015).
69. Welinder, K. G. *et al.* Biochemical Foundations of Health and Energy Conservation in Hibernating Free-ranging Subadult Brown Bear *Ursus arctos*. *J Biol Chem* **291**, 22509–22523 (2016).

## Acknowledgements

This work was supported by the French Space Agency (CNES), CNRS and Strasbourg University (H2E project; MyoBears project of the PEPS ExoMod program), and French Proteomic Infrastructure (ProFI; ANR-10-INSB-08-03). SC is supported by a grant from the National Swiss Fund. BC is supported by a grant from the CNES and the CNRS. KS is funded by grants from NSERC Canada. The long-term funding of Scandinavian Brown Bear Research Project (SBBRP) has come primarily from the Swedish Environmental Protection Agency, the Norwegian Environment Agency, the Austrian Science Fund, and the Swedish Association for Hunting and Wildlife Management. The capture team of the SBBRP was essential to the project. This is scientific paper no. 253 from the SBBRP.

## Author Contributions

FB., C.S., S.Bl., and E.L. designed the study. FB., E.L., I.C., A.L.E., S.Br., J.A., and S.Bl. conducted and managed fieldwork. S.C., B.C., B.T., C.D., A.V.-M., M.R., FB. and E.L. performed experiments and analysed data. FB. and E.L. interpreted the data. FB., S.C., C.S., S.Bl., and E.L. wrote the paper. J.S., A.Z., A.L.E., J.A., K.S., and G.G.-K. gave intellectual support and conceptual advice.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23891-5>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

## Chapitre 4 : identification des composés actifs du sérum d'ours hibernant (WBS)

### **Collaborations :**

- Les équipes du « Scandinavian Brown Bear Research Project » (<https://bearproject.info/>)
- Dr Etienne Lefai (Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, St Genès Champanelle, France)
- Dr Stéphanie Chanon (Université Lyon 1, INSERM/INRA, Laboratoire Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition, Lyon, France)
- Dr Stéphane Blanc (Université de Strasbourg, CNRS, IPHC, Strasbourg, France)

## Chapitre 4 : identification des composés actifs du sérum d'ours hibernant (WBS)

Nous avons montré la présence de composés dans le sérum d'ours brun hibernant (WBS) capables de réguler la balance protéique (synthèse et dégradation des protéines) de myotubes humains. Par la suite, nous avons développé un certain nombre d'approches afin de mieux caractériser et d'identifier ces molécules actives.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser la nature des composés actifs dans le WBS en appliquant différents traitements aux sera. Précédemment, nous avons confirmé que le niveau d'expression des transcrits de la cathépsine L, protéase impliquée dans le système de dégradation des protéines par le système lysosomal, était significativement plus important dans des myotubes exposés au WBS natif, comparé aux cellules traitées au SBS natif (voir publication Chanon *et al.*, 2018, page 196 à 205). Nous avons donc mesuré le niveau d'expression de ce transcrit pour évaluer dans quelle mesure les traitements du sérum modifiaient, ou non, sa capacité à réguler la balance protéique dans les myotubes humains. Trois traitements ont été appliqués aux sera afin de :

- ✓ Dénaturer les biomolécules thermosensibles, les rendant inactives (chauffage 20 minutes à 65°C)
- ✓ Eliminer les molécules de nature lipidique (e.g. triglycérides, cholestérol, phospholipides) grâce à l'affinité de ces molécules pour une solution butanol-DIPE 40 : 60 (v : v) [218]
- ✓ Eliminer les particules sériques par ultracentrifugation.

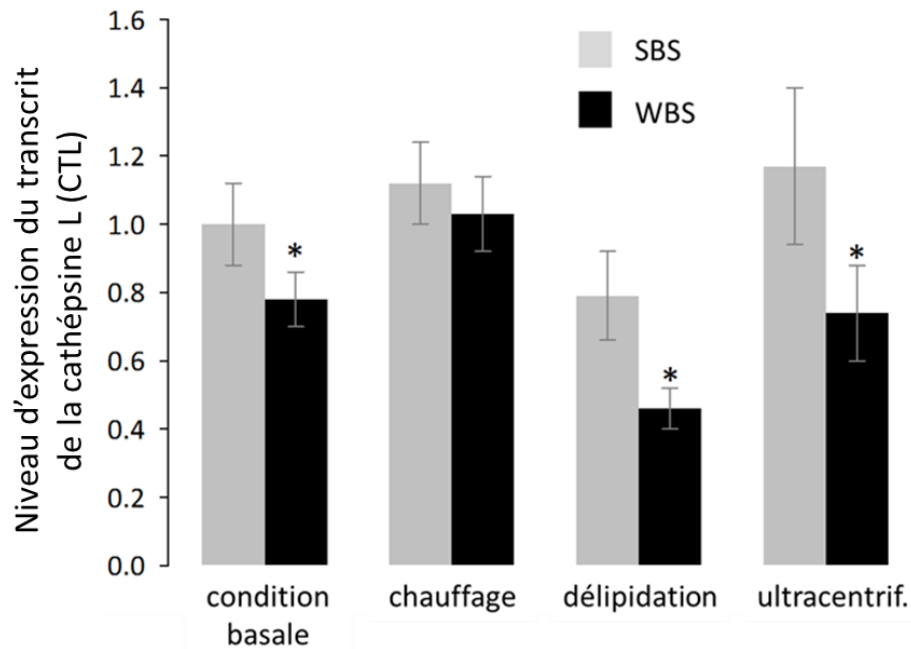


Figure 47 : Niveaux d'expression relatifs du transcrit de la cathépsine L (CTL) pour des myotubes humains exposés au WBS et SBS non traité (en condition basale), après chauffage, délipidation ou élimination des particules sériques (ultracentrifugation) du WBS et du SBS. La différence significative de l'expression du transcrit de la cathépsine L entre la condition WBS et SBS sont signalés par \* ( $p$ -value < 0.05,  $n=8$  par condition)

En comparaison avec la condition basale (traitement des myotubes avec WBS et SBS natifs), la diminution significative de l'expression du transcrit de la CTL a été conservée dans les conditions où les molécules lipidiques et les particules sériques ont été éliminées (Figure 47). Les molécules lipidiques et les particules sériques ne semblent donc pas impliquées dans la régulation de l'expression du transcrit de la CTL. En revanche, les niveaux d'expression du transcrit de la CTL étaient similaires après chauffage du SBS et du WBS. Ce résultat démontre que les molécules actives dans le WBS natif sont donc de nature thermosensible. Il a été démontré que la dégradation des protéines du plasma humain intervient dès 43-45°C [219]. Il est donc possible que les molécules thermosensibles dans le WBS soient de nature protéique. C'est la raison pour laquelle nous avons, par la suite, développé des approches « globales » dont le but était de



décomplexifier le mélange protéique du sérum d'ours brun afin d'isoler une ou des molécules. Par la suite, les différentes fractions obtenues seront utilisées pour traiter des myotubes humains et évaluer si cela permet, même partiellement, d'observer les effets mesurés en condition basale.

D'autre part, nous avons développé une approche « ciblée » pour identifier les composés actifs. Cette fois-ci, la méthode consiste à traiter les myotubes humains avec des molécules connues pour être en concentration significativement plus importante dans le WBS, comparée au SBS, et pouvant avoir des effets sur le métabolisme musculaire. Nous avons choisi d'évaluer si augmenter la concentration de bêta-hydroxybutyrate (BOH, un corps cétonique), dans le SBS, au niveau de la concentration dans le WBS, permettait de reproduire les régulations du protéome des myotubes humains exposés au WBS. La stratégie analytique et les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

### 1. Approche « ciblée » : caractérisation du protéome de myotubes humains exposés à une haute concentration de BOH

#### Contexte

Dans le cas de l'approche ciblée, nous nous sommes intéressés à un corps cétonique : le beta-hydroxybutyrate (BOH). Dans la littérature, il a été démontré que la céto-genèse, i.e. la synthèse de corps cétoniques par le foie, était plus importante en cas de jeûne prolongé, afin de remplacer le glucose dans le métabolisme énergétique cérébral [220]. Il a été suggéré que les corps cétoniques pourraient agir sur la synthèse [221, 222] et la dégradation [222, 223] des protéines musculaires. Par ailleurs, les corps cétoniques (essentiellement le BOH) ont été identifiés comme des molécules capables de réguler le métabolisme ou l'expression de certains gènes *via* une inhibition des HDACs [224].

Chez l'ours, il a déjà été démontré que la concentration en corps cétonique, était plus importante dans le plasma de les ours noirs japonais hibernants [180] et dans le sérum des ours bruns européens [199] hibernants comparée aux ours actifs. Afin de déterminer si une forte concentration de BOH pouvait être impliquée dans la régulation de la balance protéique des myotubes humains exposés au WBS, nous avons caractérisé les protéomes de ces cellules musculaires exposés à une forte concentration de BOH (100 mg/L) ajouté à du FCS ou du SBS.

#### Stratégie analytique

Dans un premier temps, nous avons déterminé la concentration de BOH dans les sera collectés sur 10 ours bruns hibernants (WBS) ou actifs (SBS). Nous avons mesuré, par dosage colorimétrique ( $\beta$ - Hydroxybutyrate (Ketone Body) Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical), une

concentration moyenne de 100 mg/L ( $\pm$  9.9) et de 4 mg/L ( $\pm$  0.7) dans le WBS et le SBS, respectivement. Nous avons donc traité des myotubes avec du SBS natif et du FCS natif (*Fetal Calf Serum*, sérum de veau fœtal) natifs. En parallèle, les myotubes humains ont été traités avec les mêmes sera dont la concentration en BOH a été augmentée à 100mg/L, pour correspondre à la concentration moyenne en BOH dans le WBS (Figure 48).

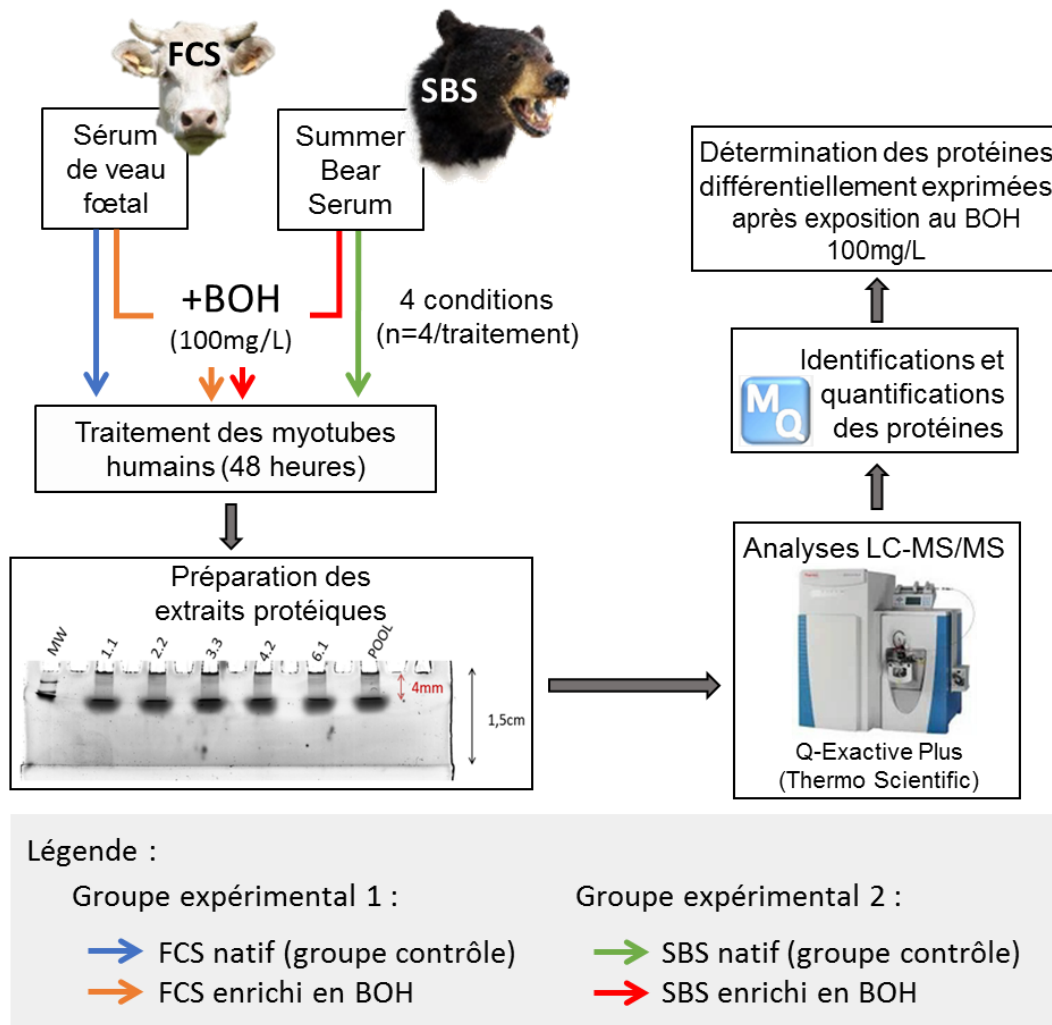


Figure 48 : Stratégie analytique pour déterminer les régulations du protéome des myotubes humains exposés à une importante concentration de BOH dans du FCS ou du SBS. Les protéines différentielles ont été déterminées en comparant le protéome de myotubes humains exposés au sérum à haute concentration

*de BOH avec le protéome des myotubes humains exposés au sérum natif dans chacun des groupes expérimentaux (définis dans la légende).*

Deux groupes expérimentaux ont alors été constitués à partir de ces 4 conditions pour déterminer les protéines différentiellement exprimées avec une forte concentration de BOH. Le premier groupe expérimental compare le protéome des myotubes humains exposés au FCS à haute concentration de BOH comparé au protéome des myotubes exposés au FCS natif. Le second groupe expérimental compare le protéome des myotubes humains exposés au SBS à haute concentration de BOH comparé au protéome des myotubes exposés au SBS natif.

### **Matériel et méthodes**

- **Description des échantillons : myotubes humains exposés à des sera natifs ou à des sera avec une importante concentration de BOH**

Les cellules musculaires humaines ont été lysées dans un tampon RIPA et les extraits protéiques ont été conditionnés dans un tampon de type Laemmli avant d'être conservés à -80°C. Les extraits protéiques ont été ensuite réceptionnés au LSMBO pour être analysés par spectrométrie de masse dans une approche de protéomique quantitative différentielle.

- **Préparation des échantillons pour l'analyse par spectrométrie de masse**

Les concentrations en protéines des échantillons ont été déterminées grâce à un dosage colorimétrique de type RC-DC. Un échantillon de référence a été constitué avec une même quantité de protéines de chaque échantillon. L'échantillon de référence sera traité comme les échantillons individuels et cet échantillon sera analysé régulièrement sur toute la durée des analyses pour confirmer la stabilité du système. 15µg de protéines de chaque échantillon et de

l'échantillon de référence ont été décomplexifiés en 2 bandes protéiques. Par la suite, les échantillons ont été traités comme présenté en page 187. Après réduction et alkylation, les protéines ont été digérées dans le gel avec un ratio trypsine : protéines de 1 : 66. Après extraction des peptides et évaporation des solvants, les peptides ont été solubilisés dans une solution aqueuse contenant 1% ACN et 0.1% AF. Des peptides iRT ont été ajoutés à l'ensemble des échantillons.

### ▪ Analyse LC-MS/MS des extraits protéiques de myotubes humains

Les analyses LC-MS/MS ont été réalisées sur un système chromatographique UPLC (NanoAcquity, Waters) couplé à un Q-Exactive Plus (Thermo Scientific). Pour chaque bande, 375ng théoriques de peptides ont été analysés. Le gradient chromatographique et les paramètres du spectromètre de masse sont identiques à ceux présentés dans les précédents résultats (page 187).

### ▪ Identifications et quantifications des protéines grâce au logiciel MaxQuant

Les protéines ont été identifiées grâce à l'algorithme Andromeda (MaxQuant, version 1.5.3.30), contre une banque de données protéiques contenant les séquences des protéines humaines (*SwissProt* ; taxonomie : 9606 ; Mars 2017). Les séquences des 20 protéines majoritaires du sérum (décrites pour le système *Proteoprep 20*, Sigma) du panda et du taureau (taxonomies : 9646 & 9913, *Ailuropoda melanoleuca* et *Bos taurus*, issues de la base de données *RefSeq* et de la base de données *SwissProt*, respectivement) et la séquence des peptides iRT ont été manuellement ajoutées. Les séquences *decoy* et les séquences des contaminants usuels ont été automatiquement ajoutées par l'algorithme *Andromeda* à partir du fichier

contaminant.fasta. Les paramètres pour l'identification des protéines (grâce à l'algorithme *Andromeda*) et la quantification des protéines (grâce à l'algorithme *MaxLFQ*) ont été définis comme décrit en page 189.

Seules les protéines quantifiées de manière robuste (i.e. avec au moins 3 intensités LFQ sur les 4 analyses de chaque condition), ainsi que les cas présents/absents (i.e. aucune valeur dans l'une des deux conditions de chaque groupe expérimental), ont été conservés pour les tests statistiques. Après avoir validé que les valeurs d'intensités LFQ suivaient une loi normale (test Shapiro-Wilk, p-value <0.05) et avoir testé l'égalité des variances (test de Bartlett, p-value <0.05), les protéines différentiellement exprimées dans chaque groupe expérimental, entre la condition à haute concentration en BOH et la condition avec le sérum natif, ont été définies (T-test, p-value <0.05).

### ▪ **Traitement bioinformatique des données**

Les annotations fonctionnelles ont été extraites pour la liste des protéines différentiellement exprimées dans les deux groupes expérimentaux (incluant les cas présent/absent) sur la base de données *Gene Ontology* (GO) grâce à l'algorithme présenté en page 64. Un calcul d'enrichissement en annotations fonctionnelles a ensuite été réalisé grâce à l'algorithme présenté en page 65. Les fonctions biologiques significativement régulées ont été identifiées avec un score inférieur à 0.1, une p-value inférieur à 0.05 (test Benjamini-Hochberg) et un facteur d'enrichissement supérieur à 2. Les protéines différentiellement exprimées dans chaque groupe expérimental et les régulations d'abondance de ces protéines ont été visualisées

sur les cartes du métabolisme et les voies de signalisation de la base de données *KEGG* avec l'algorithme présenté en page 66.

**Résultats : les régulations du protéome de myotubes humains induites par le BOH sont modulées par des molécules du sérum auquel le BOH est ajouté**

- **Contrôles qualités : stabilité des temps de rétention des peptides iRT et reproductibilité des mesures quantitatives pour les analyses de l'échantillon de référence**

Les temps de rétention des peptides iRT dans l'échantillon de référence ont été suivis pour toute la durée des analyses. Un coefficient de variation moyen de 0.5% a été calculé pour les temps de rétention des 11 peptides iRT, sur l'ensemble des analyses des échantillons individuels et de l'échantillon de référence, démontrant une excellente stabilité du système chromatographique (Figure 49).



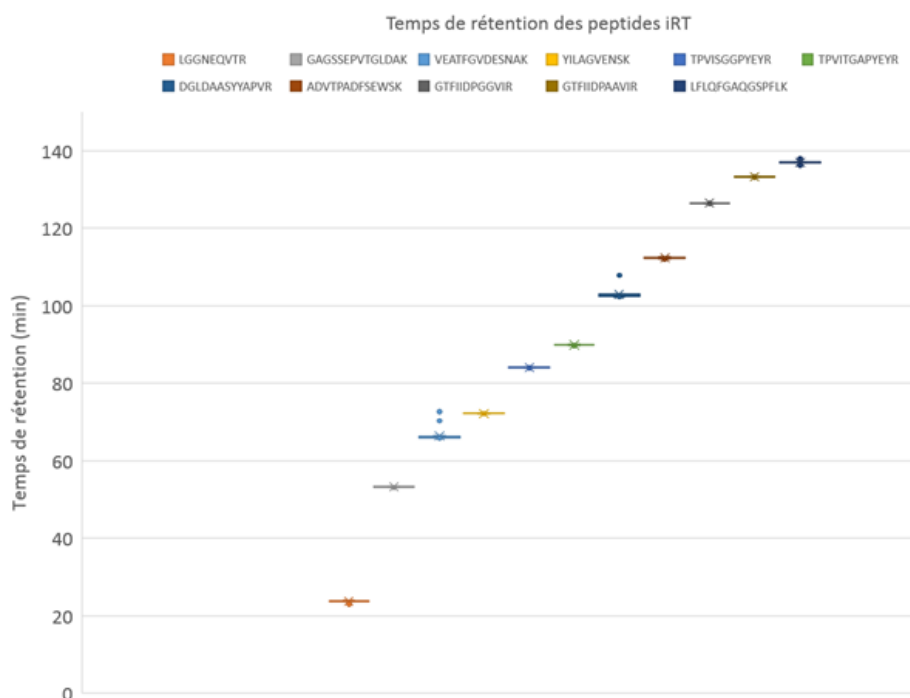


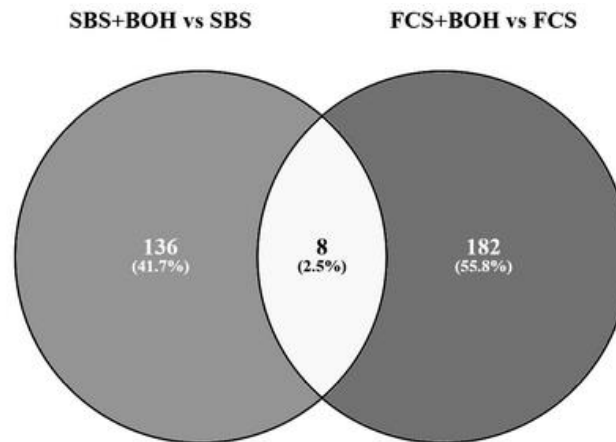
Figure 49 : Représentation de la stabilité des temps de rétention des 11 peptides iRT, sur l'ensemble des analyses des échantillons individuels et de l'échantillon de référence.

Par ailleurs, la reproductibilité des intensités *LFQ* de l'ensemble des protéines quantifiées pour toutes les analyses de l'échantillon de référence a été vérifiée avec un coefficient de variation médian inférieur à 18%, nous permettant de confirmer la reproductibilité des mesures quantitatives réalisées.

#### ▪ Résultats : identifications et quantifications des protéines dans les deux groupes expérimentaux

L'ensemble des analyses des deux groupes expérimentaux a été traité avec le logiciel *MaxQuant*, ce qui a permis d'identifier 4350 protéines. 3713 et 3683 protéines ont été quantifiées de manière robuste dans le premier groupe expérimental (i.e. condition FCS+BOH comparé à la condition FCS) et le second groupe expérimental (i.e. condition SBS+BOH comparé à la condition

SBS), respectivement. 190 et 144 protéines différentiellement exprimées ont été déterminées dans le premier et le second groupe expérimental, respectivement. Seulement 8 protéines différentielles ont été communément identifiées dans les deux groupes expérimentaux (Figure 50).



*Figure 50 : Recouvrement entre les listes de protéines différentielles identifiées dans le premier groupe expérimental (condition FCS+BOH vs condition FCS) et le second groupe expérimental (condition SBS+BOH vs condition SBS).*

Ces résultats démontrent que l'exposition à une importante concentration de BOH (à 100mg/L) est capable d'induire des variations d'abondance du protéome de myotubes humains. Cependant, étant donné la faible proportion de protéines différentielles communes aux deux groupes expérimentaux, il semblerait que selon le sérum dans lequel le BOH a été ajouté, la réponse à une forte concentration de BOH ne soit pas similaire.

Grâce au calcul d'enrichissement en annotations fonctionnelles, 9 et 4 fonctions biologiques significativement régulées ont été identifiées pour le premier (Figure 51A) et pour le second groupe expérimental (Figure 51B), respectivement.

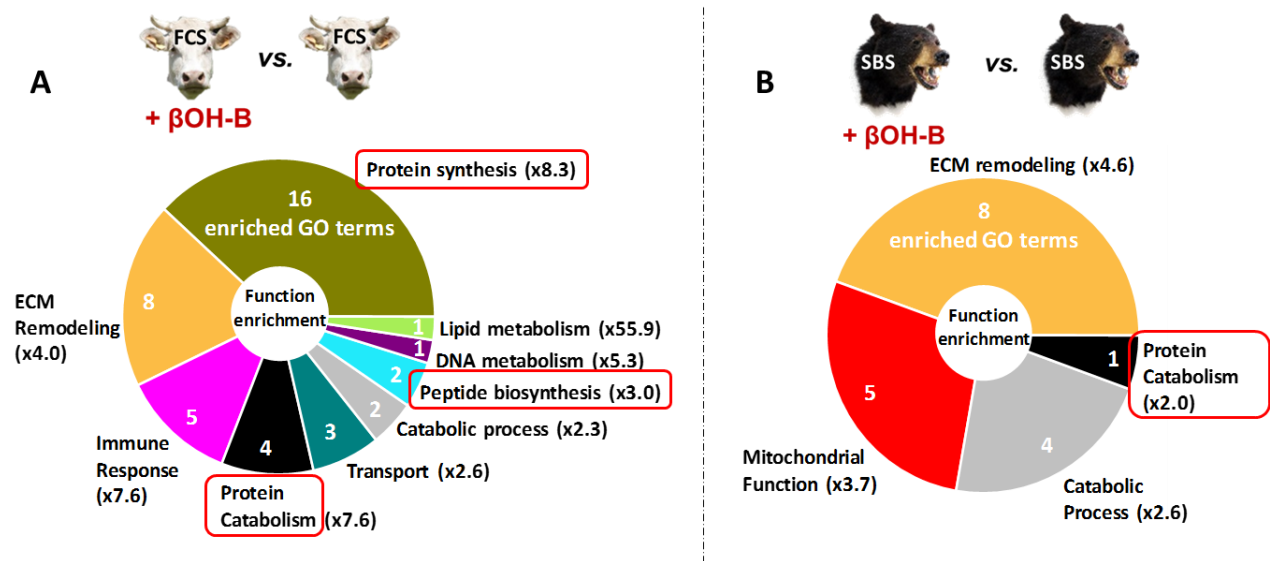


Figure 51 : Représentation des fonctions biologiques régulées dans le premier (A) et le second groupe expérimental (B). Le nombre d'annotations fonctionnelles identifiées dans chaque fonction biologique est inscrit sur la figure. Les fonctions biologiques encadrées en rouge sont impliquées dans la régulation de la balance protéique des myotubes humains traités.

Parmi les fonctions régulées, le catabolisme des protéines a été identifié dans les deux groupes expérimentaux, et la synthèse des protéines et des peptides a été identifiée dans le premier groupe expérimental uniquement (i.e. condition FCS+BOH comparé à la condition FCS). Ces fonctions biologiques sont impliquées dans la régulation de la balance protéique (i.e. synthèse et dégradation des protéines) démontrant que l'ajout d'une importante concentration de BOH régule notamment la balance protéique des myotubes humains traités. Une fois encore, selon le sérum dans lequel le BOH est ajouté, les régulations observées sur le protéome des myotubes ne sont pas exactement identiques. Il est possible que certaines molécules, de chacun des séras, modulent les régulations induites par la forte concentration de BOH.

Afin de visualiser les variations d'abondances des protéines différentielles impliquées dans la balance protéique, dans les deux groupes expérimentaux, l'algorithme de visualisation sur

les cartes de la base de données KEGG a été utilisé. Grâce à cela, nous avons schématisé les résultats obtenus dans les deux groupes expérimentaux. Nous avons complété cette illustration avec les résultats obtenus pour la caractérisation du protéome de myotubes humains exposés au WBS, comparé au SBS (chapitre 3, page 184). Ainsi, il nous a été possible d'évaluer si l'ajout de BOH à une concentration de 100mg/L (concentration équivalente à la concentration endogène dans le WBS) induisait des régulations semblables à celles observées avec le WBS (Figure 52).

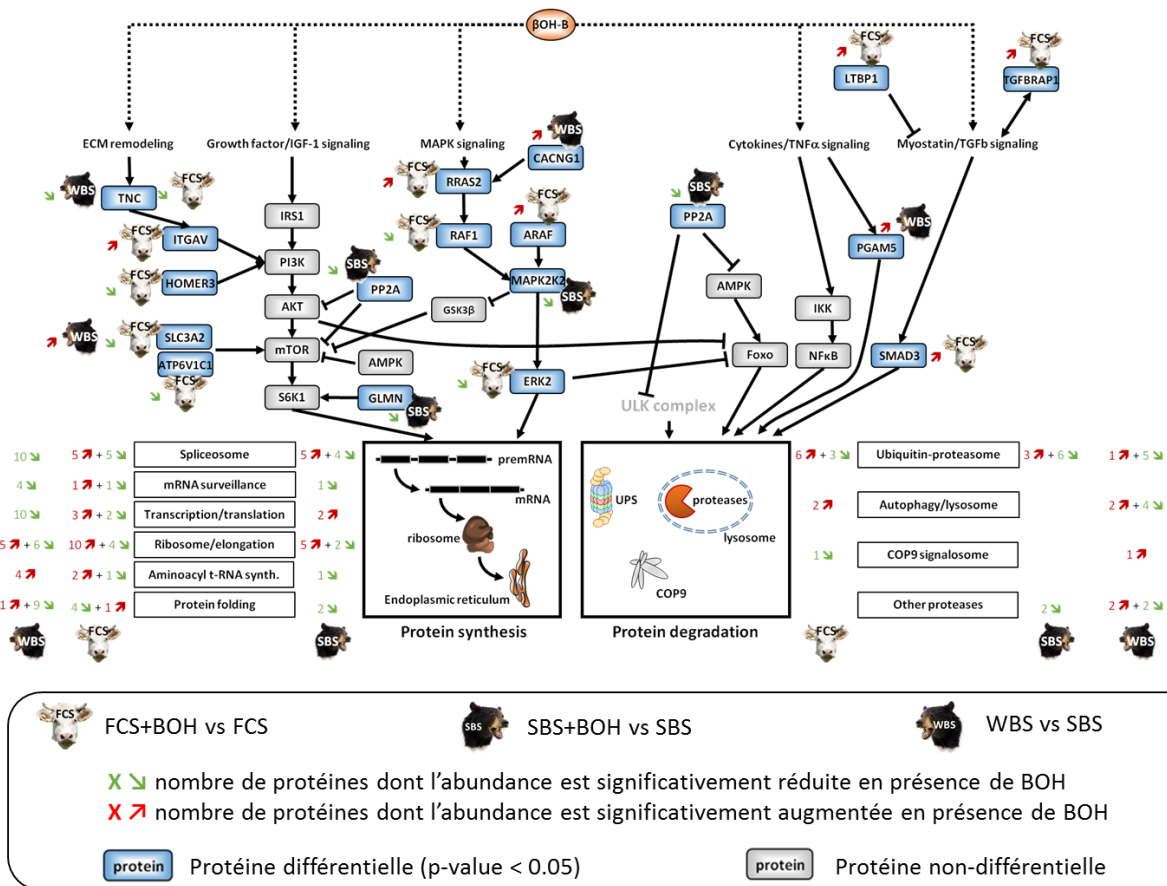


Figure 52 : Schématisation des régulations pour les protéines différentielles impliquées dans la régulation de la balance protéique (i.e. synthèse et dégradation des protéines) pour des myotubes humains exposés à de fortes concentrations de BOH dans du FCS (premier groupe expérimental) ou dans de SBS (second groupe expérimental). Les régulations des protéines impliquées dans la balance protéique identifiées

*précédemment entre des myotubes humains exposés au WBS, comparé au SBS, sont ajoutées à cette schématisation.*

Dans un premier temps, il a été constaté qu'une importante concentration de BOH modulait le niveau d'expression de protéines impliquées dans la balance protéique, mais les protéines régulées sont différentes selon le sérum auquel le BOH a été ajouté. En comparaison avec les protéines différentielles impliquées dans la balance protéique pour des myotubes humains exposés au WBS (comparé à une exposition au SBS), nous avons constaté qu'une forte concentration de BOH dans le FCS et dans le SBS mettait en évidence une similitude pour une partie des régulations. Cela laisse supposer que le BOH à une concentration de 100 mg/L pourrait participer aux régulations observées sur des myotubes humains traités au WBS.

Par ailleurs, l'incubation de myotubes C2C12 durant 24 heures avec 5mM de BOH a induit une augmentation du taux de respiration mitochondriale et une diminution de la production de  $H_2O_2$  (espèce réactive de l'oxygène, ROS) [225]. Or nous avons montré que l'expression des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale était réduite dans le muscle squelettique des ours bruns hibernants, suggérant une limitation de la production de radicaux libres et donc du stress oxydant (publication 3, voir page 167 à 183). Il est alors envisageable que le BOH, à une concentration de 100mg/L, pourrait participer à une réduction du stress oxydant dans les myotubes humains et donc à une diminution des dégâts oxydatifs sur les protéines, permettant une préservation des protéines musculaires.

Enfin, l'exposition au BOH induit une augmentation de la croissance et de la viabilité des myotubes exposés [225]. Or nous avons démontré précédemment, que l'exposition de myotubes humains à du WBS induisait une augmentation de la taille et du contenu protéique des cellules

[8]. Il serait donc possible que le BOH, à forte concentration, puisse participer à ces mécanismes de préservation des cellules musculaires humaines.

**Conclusion : le BOH pourrait être impliqué dans les régulations de la balance protéiques des myotubes humains exposés au WBS natif**

Grâce à une analyse de protéomique quantitative sans marquage, nous avons démontré qu'une forte concentration en BOH (100mg/L), ajouté à un sérum dont la concentration en BOH est faible (SBS) ou quasiment nulle (FCS) permettait de réguler l'abondance d'un grand nombre de protéines dans des myotubes humains. Nous avons constaté que les régulations d'abondance protéique n'étaient pas identiques selon le sérum auquel le BOH été ajouté, démontrant une possible régulation des effets de BOH par des molécules spécifiques au sérum utilisé. Par ailleurs, une partie des régulations impliquées dans la balance protéique étaient similaires aux régulations trouvées après une exposition au WBS natif. Il semble donc que le BOH puisse être en partie responsable des effets observés sur les myotubes humains exposés au WBS.

## 2. Approche « globale » : utilisation d'outils biochimiques pour digérer ou fractionner les protéines contenues dans le sérum de l'ours brun

Précédemment, nous avons confirmé la nature thermosensible des composés actifs présents dans le WBS (voir page 206 à 208). Etant donné la thermosensibilité des protéines, nous avons choisi de mettre en place des protocoles pour confirmer la nature protéique des composés actifs ou pour simplifier le mélange et tenter de les identifier. Afin d'obtenir le résultat le plus satisfaisant possible, de nombreuses optimisations des protocoles ont été évaluées.

### a. Traitement 1 : digestion des protéines sériques sur colonnes d'enzymes immobilisées

Pour confirmer cette nature protéique, nous avons choisi de réaliser un premier traitement du sérum par lequel les protéines seraient rendues inactives. Pour cela, nous avons procédé à une digestion enzymatique des protéines sériques. Nous nous sommes imposés différentes contraintes :

- Les conditions de préparation (température, pH, solvant utilisé) du sérum devaient être les moins dénaturantes possibles afin de ne pas dénaturer les autres molécules sériques.
- Les protéases utilisées ne devaient pas être retrouvées dans le produit destiné à être ajouté au milieu de culture des myotubes humains. En effet, l'ajout de protéases risquerait d'induire, sur le long terme, la destruction des cellules sur lesquelles seront ajoutés les produits des digestions.



Nous avons donc choisi de réaliser une digestion en utilisant des colonnes où les enzymes protéolytiques sont immobilisés sur la phase stationnaire. Les protéines sériques ont été ajoutées à la phase mobile et, après incubation, le produit de la digestion enzymatique a été élué tandis que les enzymes protéolytiques restaient fixés à la phase stationnaire. Nous avons évalué l'efficacité de digestion des protéines du sérum d'ours brun par 6 protéases différentes (présentées ci-dessous) pour multiplier les chances d'obtenir la dégradation protéique souhaitée.

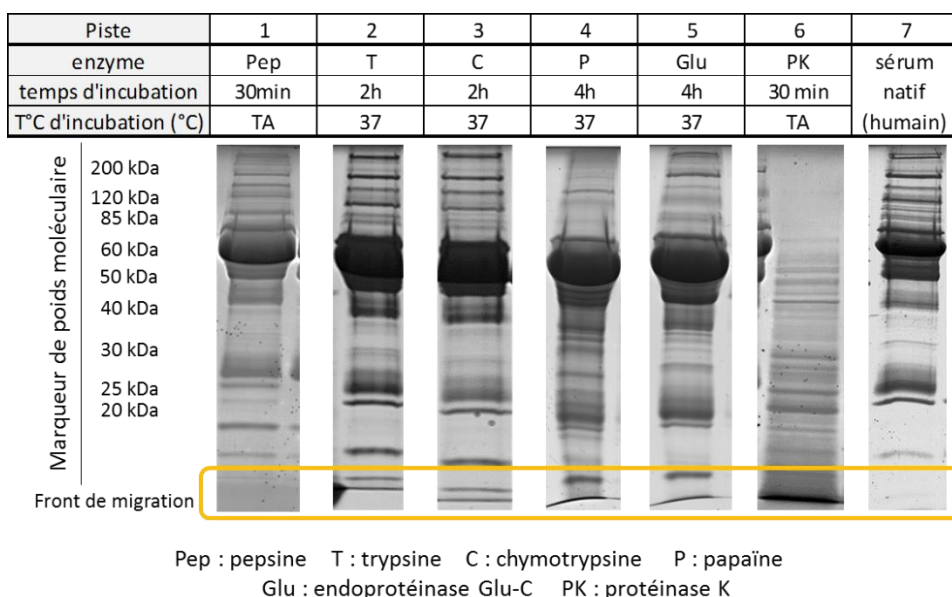
### **Matériel et méthodes :**

Dans un premier temps, les efficacités de digestion de chaque colonne d'enzymes immobilisés (MoBiTec) ont été évaluées pour le sérum humain, avant d'être évaluées pour le sérum d'ours brun. Les 6 protéases testées étaient : la pepsine (Pep), la papaïne (P), la trypsine (T), la chymotrypsine (C), la protéinase K (PK) et l'endoprotéinase Glu-C (Glu). Les colonnes ont été conditionnées avant utilisation selon le protocole du fournisseur. 90µL de sérum ont été ajoutés à 500µL du tampon de réaction fourni. Des temps d'incubation de 30 minutes (PK, Pep), 2 heures (PK, T, C) ou 4 heures (PK, P, Glu) ont été testées. De la même manière, la température d'incubation a été fixée à 37°C (PK, Glu, P, C, T) ou à température ambiante (PK, Pep). Après élution des peptides (i.e. produit attendu des digestions protéolytiques), les colonnes ont été lavées et conditionnées avant une conservation à +4°C jusqu'à une prochaine utilisation. Le résultat de la digestion a été visualisé après migration sur gel SDS PaGE et coloration sur la nuit au bleu de Coomassie. Une bonne efficacité de digestion a été confirmée à partir des profils électrophorétiques des produits de digestion. La disparition des bandes protéiques (supérieures à 20kDa), ainsi que l'apparition d'une bande au niveau du front de migration correspondant aux

peptides (« bande peptidique ») ont été considérées comme les indices de l'efficacité de la digestion.

### Optimisations, résultats et discussion :

L'ensemble des paramètres d'incubation et les résultats obtenus pour chaque protocole de digestion est présenté sur la Figure 53.



*Figure 53 : Paramètres et résultats des digestions sur sérum humain réalisés sur colonnes d'enzymes immobilisés. La piste 7 correspond au profil électrophorétique du sérum humain natif (condition avant digestion). L'encadré jaune signale le front de migration où les peptides issus des digestions seraient détectés.*

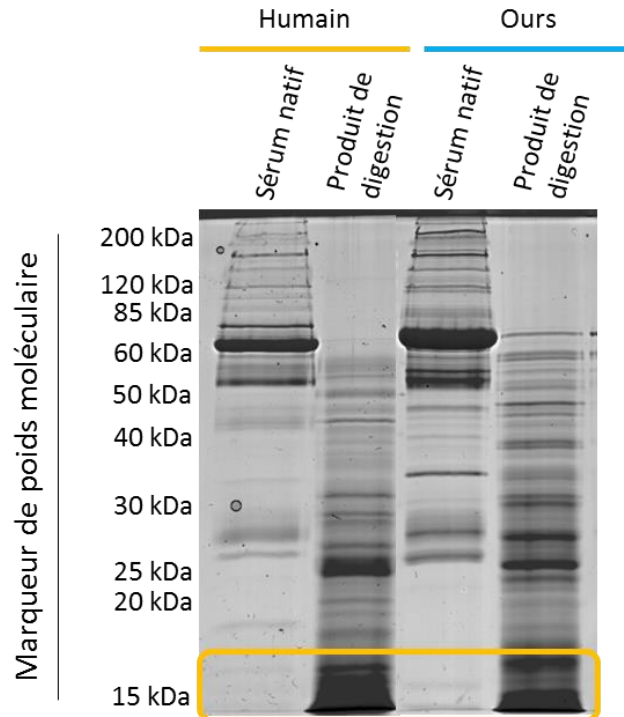
Sur les 6 protéases immobilisées utilisées, la pepsine, la trypsine, la chymotrypsine, la papaïne et l'endoprotéinase Glu-C (Figure 53 - piste 1 à piste 5 respectivement), la bande peptidique détectée est très faible, voire inexistante. Ces enzymes n'ont pas permis d'obtenir une efficacité de digestion satisfaisante. Par ailleurs, les profils électrophorétiques des produits de digestion de ces 5 enzymes comparés au profil électrophorétique du sérum natif (piste 7) ne

présentent pas de différence flagrante. La pepsine est une protéase dont le pH optimal d'activité est situé entre 1.8 et 4.4. Dans notre cas, les conditions de digestion ont été les moins dénaturantes possibles, à un pH proche du pH physiologique grâce à l'ajout d'un important volume de DMEM. Dans ces conditions, le manque d'efficacité de digestion de la pepsine n'est donc pas surprenant. Pour les autres protéases, il est important de noter que les conditions d'incubation n'étaient pas dénaturantes, ce qui a permis de conserver la conformation des protéines sériques. Il est possible qu'ainsi les protéases n'aient pas pu accéder aux sites de clivages, résultant en une digestion inefficace. Une seconde hypothèse serait liée à la présence de certains inhibiteurs de protéases naturellement présents dans le sérum humain et qui auraient pu inhiber l'activité des protéases immobilisées.

Lors de la digestion avec la protéinase K (incubation 30 minutes, température ambiante), nous avons constaté une diminution de l'intensité (voire une disparition) de la plupart des bandes protéiques et la « bande peptidique » était très intense (piste 6). Comparés au profil électrophorétique du sérum natif (piste 7), ceci suggère une bonne efficacité de digestion protéolytique. La protéinase K est active sur une large gamme de pH (4 à 12) et de température (37°C à 60°C). Pour ces raisons, cet enzyme était l'un des plus adaptés à la digestion des protéines en condition native. La colonne de digestion avec la protéinase K immobilisée a donc été sélectionnée pour poursuivre nos optimisations.

Après avoir évalué l'efficacité de digestion de la colonne de protéinase K immobilisées sur le sérum humain, l'efficacité de digestion sur le sérum d'ours a été évaluée dans les mêmes

conditions (incubation de 30 minutes, à température ambiante). Les profils électrophorétiques des sera natifs et de leurs produits de digestion respectifs sont présentés en Figure 54.

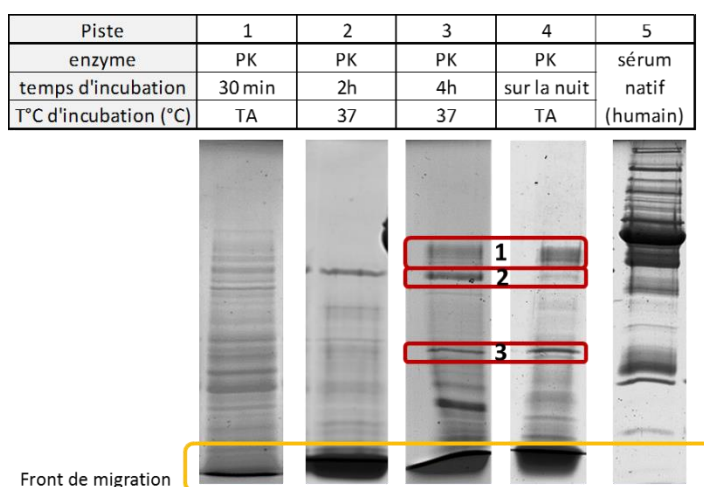


*Figure 54 : profils électrophorétiques des sera natifs ou des produits de digestion sur colonne de protéinases K immobilisées pour le sérum humain et le sérum d'ours brun. Les deux premières pistes sont les résultats obtenus sur le sérum humain et les deux pistes suivantes sont les résultats obtenus sur le sérum d'ours. L'encadré jaune représente la « bande peptidique ».*

Les profils électrophorétiques du sérum humain natif et du sérum d'ours brun natifs sont très semblables. Nous avons observé la disparition des bandes protéiques et l'apparition de la « bande peptidique » (comparé aux profils électrophorétiques des sera natifs). L'efficacité de digestion des protéines sériques par la protéinase K semble donc identique pour le sérum humain et pour le sérum d'ours.

Afin d'accroître l'efficacité de digestion de la colonne de la protéinase K immobilisée, la durée d'incubation a été augmentée sur la nuit à température ambiante. Par la suite, afin

d'obtenir une digestion aussi efficace sur un temps plus court (2 heures ou 4 heures) la température d'incubation a été augmentée à 37°C. L'efficacité a été évaluée sur 90µL de sérum humain, et les profils électrophorétiques obtenus pour le sérum humain natif et le sérum humain traités avec ces protocoles (et le protocole de 30 minutes à température ambiante) sont représentés en Figure 55.



*Figure 55 : Profils électrophorétiques sur gel SDS PaGE du sérum humain natif (piste 5) et du sérum humain digéré sur colonnes de protéinases K immobilisées en 30min (piste 1), 2h (piste 2) ou 4h (piste 3) ou sur la nuit (piste 4) à température ambiante (piste 1 et 4) ou à 37°C (pistes 2 et 3). L'encadré jaune localise la « bande peptidique », les encadrés rouges localisent 3 bandes protéiques détectées systématiquement avec les plus longs temps d'incubation (4 heures ou sur la nuit).*

Nous avons constaté une disparition des bandes protéiques et une augmentation de l'intensité de la « bande peptidique », lorsque la digestion a été réalisée sur la nuit. Des résultats similaires ont été observés avec des temps d'incubation plus court (2 heures et 4 heures) à 37°C. Les profils électrophorétiques des digestions à 37°C de 2 heures et de 4 heures, n'ont pas montré de différences, ce qui nous laisse supposer qu'augmenter le temps d'incubation à 4 heures n'apporte pas une efficacité de digestion significativement plus importante. Nous avons ainsi démontré qu'il était possible d'obtenir une efficacité de digestion plus importante en augmentant

le temps d'incubation à température ambiante ou en augmentant la température d'incubation à 37°C, comparé à une digestion à température ambiante durant 30 minutes.

Nous avons constaté la présence systématique de trois bandes protéiques après une digestion avec les plus longs temps d'incubation (4 heures ou sur la nuit). Ces bandes protéiques pourraient correspondre à des protéines présentes dans le sérum mais pour lesquelles la digestion n'est pas complète ou est inefficace, ou il pourrait s'agir d'un relargage de protéinase K par la colonne. Pour déterminer l'origine de ces protéines, les bandes de gels ont été découpées et digérées à la trypsine pour une analyse LC-MS/MS. Nous avons identifié l'anti-chymotrypsine et l'anti-trypsine en bande 1 et 3 respectivement. Ces protéines sont d'origine sériques et la détection des bandes protéiques est en accord avec une digestion partielle ou inefficace de ces protéines par la protéinase K. De plus, ces protéines sont respectivement des inhibiteurs des protéases chymotrypsine et trypsine, ce qui explique que les colonnes de chymotrypsines et trypsines immobilisées n'aient pas été efficaces pour digérer les protéines sériques. En bande 3, les analyses LC-MS/MS ont permis d'identifier la protéinase K de *Tritirachium album*, démontrant un décrochage de l'enzyme, la libérant dans le produit de digestion.

### **Conclusions : la digestion des protéines sériques peut être réalisée sur une colonne de protéinase K immobilisée**

6 colonnes de protéases immobilisées ont été testées et leur utilisation a été optimisée dans le but d'obtenir une efficacité de digestion des protéines sériques la plus satisfaisante possible. Ces systèmes sont particulièrement intéressants puisqu'ils permettent de réaliser une digestion protéolytique sans ajout de protéases au produit de digestion. Sur l'ensemble des

systèmes testés, la colonne de protéinase K immobilisée est le système ayant démontré la meilleure efficacité de digestion. Pour ce système, nous avons démontré que :

- ✓ La meilleure efficacité de digestion est obtenue avec une durée d'incubation de 2 heures, à 37°C ou avec une incubation sur la nuit à température ambiante.
- ✓ Augmenter le temps d'incubation jusqu'à 4 heures, à 37°C, ne permet pas d'améliorer l'efficacité de digestion.
- ✓ Les produits de digestion du sérum humain et du sérum d'ours sont similaires.
- ✓ Le système semble libérer une partie des protéases immobilisées.

Aux vues de l'ensemble des résultats, ce système semble efficace pour digérer les protéines du sérum d'ours brun. En revanche, avant toute incubation en présence de myotubes humains, il sera essentiel d'inhiber l'activité de la protéinase K libérée (inhibiteur) ou de supprimer cet enzyme du produit de digestion (déplétion). La déplétion de la protéinase K est réalisable en utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre des épitopes de cette protéine. Cependant, cette méthode impliquerait une nouvelle étape de traitement de l'échantillon, ce qui augmenterait le risque d'en perdre une partie. D'autre part, l'ajout d'un inhibiteur pourrait agir directement sur les myotubes humains traités. Le meilleur compromis serait d'utiliser du phényl méthane sulphonyl fluoride (PMSF), connu pour inhiber l'activité de la protéinase K [226]. Le PMSF réagit avec la sérine du site actif des sérines protéases, comme la protéinase K [227]. C'est un inhibiteur réversible dont la durée de demi-vie est courte. En 1978, James Gordon [228] a démontré que le PMSF avait une durée de demi-vie de 110, 55 et 35 minutes à des pH respectifs



de 7.0, 7.5 et 8.0. Il sera donc possible d'ajouter du PMSF aux produits de digestion avant de traiter les myotubes humains.

### b. Traitement 2 : déplétion des protéines sériques majoritaires

6 protéines (albumine, IgG, IgA, haptoglobine,  $\alpha$ -1-anti-trypsin et transferrine) représentent à elles seules 85% du contenu protéique du sérum [229] et l'albumine représente à elle seule, près de 60% du contenu protéique d'un sérum humain [32]. Ceci entraîne une difficulté pour l'analyse par spectrométrie de masse (voir page 12). De ce fait, la suppression de cette protéine dans un échantillon sérique est essentielle pour augmenter la couverture du protéome par analyse par spectrométrie de masse. Eliminer les protéines majoritaires permettrait aussi un enrichissement en molécules moins abondantes parmi lesquelles les composés actifs du sérum d'ours sont sans doute à rechercher.

Il existe de nombreuses solutions commerciales, basées sur l'utilisation d'anticorps, d'hexapeptides ou de molécules comme le *Cibacron Blue*, permettant la déplétion d'une large gamme de protéines sériques (1 à 100 protéines) comme présenté en page 12 à 14. Nous avons évalué si ces solutions pourraient permettre de dépler les protéines majoritaires (l'albumine et l'Immunoglobuline G (IgG)) des sera d'ours brun. L'albumine est une protéine qui transporte de nombreuses autres protéines dans le système sanguin. La déplétion de l'albumine aboutit donc généralement à l'élimination d'une partie des protéines sériques non-ciblées par le système utilisé. Ce phénomène est connu sous le nom de « *sponge effect* » (effet éponge) [229]. Il est donc essentiel d'évaluer l'efficacité de chaque système à dépler l'albumine sans éliminer une partie trop importante des protéines sériques.

Nous avons utilisé des méthodes d'élimination de l'albumine selon l'affinité qu'elle présente pour l'éthanol ou pour le *Cibacron Blue*, et grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre l'albumine.

### *Traitement 2-i : déplétion de l'albumine grâce à son affinité avec l'éthanol*

En 1979, il a été démontré qu'il était possible d'isoler l'albumine dans une fraction contenant 42% d'éthanol [33, 230]. L'albumine posséderait une affinité particulière pour l'éthanol permettant de l'isoler de l'ensemble des protéines sériques. Nous avons voulu déterminer la concentration en éthanol pour laquelle l'isolement de l'albumine humaine était la plus importante. Pour cela, nous avons comparé les profils électrophorétiques obtenus dans la fraction éthanol-albumine et dans la fraction protéique déplétée avec celui du sérum humain natif.

### **Matériel et méthodes :**

50 µL de sérum humain ont été incubés avec des volumes variables d'éthanol froid (-20°C) à 95% variables dans le but de faire varier la concentration finale en éthanol de 30% à 60% (Table 7). Les incubations ont été réalisées sur une durée de 1 heure, à 4°C, sous agitation. La fraction « éthanol-albumine » a été isolée grâce à une centrifugation de 45 minutes, à 4°C et avec une accélération de 16.000g. Le surnageant obtenu correspond à la fraction « éthanol-albumine » tandis que le culot contient la fraction protéique déplétée en albumine.

*Table 7 : Volumes d'éthanol 95% froid (EtOH 95%) ajoutés au sérum humain pour les différents tests de déplétion d'albumine*

| Test name          | Vol. serum (μL) | Vol. EtOH 95 % (μL) | Final Conc. EtOH (%) |
|--------------------|-----------------|---------------------|----------------------|
| EtOH 30            | 50              | 23                  | 30                   |
| EtOH 40            | 50              | 36.3                | 40                   |
| EtOH 50            | 50              | 55.6                | 50                   |
| EtOH 60            | 50              | 85.7                | 60                   |
| EtOH 42 (Hao 1979) | 50              | 39.6                | 42                   |

Après migration électrophorétique sur gel SDS PaGE, les bandes protéiques ont été révélées par coloration au bleu de Coomassie sur la nuit.

### Résultats et discussion :

Les profils électrophorétiques pour les fractions « éthanol-albumine », les fractions protéiques déplétées et le sérum natif sont présentés en Figure 56. Nous avons fait le choix de déposer 50μL de sérum natif afin que le profil électrophorétique soit comparable à ceux des fractions obtenues après une incubation de 50μL de sérum avec de l'éthanol.

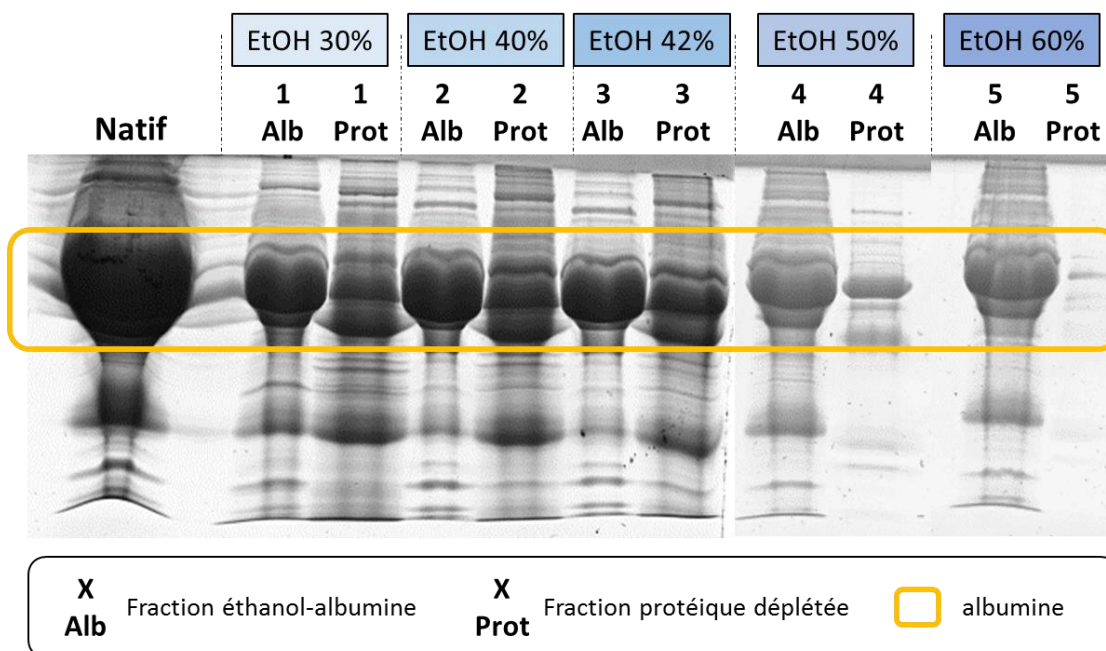


Figure 56 : Profils électrophorétiques sur gel SDS PaGE pour le sérum humain natif (Natif), les fractions éthanol-albumine (Alb) et les fractions protéiques déplétées (Prot) pour les 5 concentrations d'éthanol testées (30, 40, 42, 50 et 60%). L'encadré jaune localise la bande protéique de l'albumine humaine.

L'efficacité de déplétion de l'albumine a été évaluée en comparant l'intensité de la bande protéique correspondant à l'albumine (encadré jaune) entre la fraction « éthanol-albumine » (Alb) et la fraction protéique déplétée (Prot). Pour l'ensemble des concentrations d'éthanol utilisées, la bande protéique de l'albumine est détectable avec une forte intensité dans la fraction « éthanol-albumine », comme attendu. De plus, les profils électrophorétiques des fractions « éthanol-albumine » sont constitués de bandes protéiques qui ne correspondent pas à l'albumine. Une partie des protéines sériques est donc également isolée dans la fraction éthanol-albumine, démontrant ainsi une faible spécificité d'isolation de cette méthode. Ce résultat est en accord avec « l'effet éponge » de l'albumine. L'éthanol isole donc l'albumine, mais également les protéines qui sont en interaction avec elle : cela est défini sous le nom d'albuminome [33].

Une grande proportion de l'albumine est effectivement éliminée dans la fraction déplétée, mais cette déplétion reste incomplète. La bande protéique de l'albumine est en effet présente sur les profils électrophorétiques des fractions protéiques déplétées, sans différence flagrante entre les différentes concentrations d'éthanol utilisées. La déplétion en albumine semble néanmoins suffisante pour être utilisée dans le cadre d'un fractionnement du sérum d'ours brun.

### **Conclusion : l'éthanol permet de dépler une partie de l'albumine du sérum humain**

Les résultats obtenus confirment la possibilité d'éliminer l'albumine grâce à l'utilisation de l'éthanol, et ce indépendamment de la concentration utilisée. En revanche, il est essentiel de noter que cette méthode entraîne également l'élimination de nombreuses autres protéines sériques, ce qui revient à isoler l'albuminome. Dans le cas d'une analyse par spectrométrie de masse, ce protocole pourrait être utilisé pour réduire la proportion d'albumine présente dans l'échantillon. Pour une approche quantitative par spectrométrie de masse, il sera néanmoins nécessaire de confirmer la reproductibilité de ce protocole. Dans le cadre d'un fractionnement des protéines sériques, cette méthode de déplétion en albumine est également suffisante pour décomplexifier le sérum.

### ***Traitement 2-ii : déplétion de l'albumine sérique par Blue Sepharose™ Fast Flow 6***

Le *Cibacron Blue* seul a démontré une capacité de se lier à l'albumine, ainsi qu'aux sites de fixation des ATP d'autres protéines, ce qui en fait une méthode peu spécifique [229]. En 1974, l'équipe de Easterday *et al.* a synthétisé une molécule combinant le *Sepharose 6B* au *Cibacron blue F3GA* [231]. Ils ont démontré que cette molécule avait une affinité pour 3 protéines en

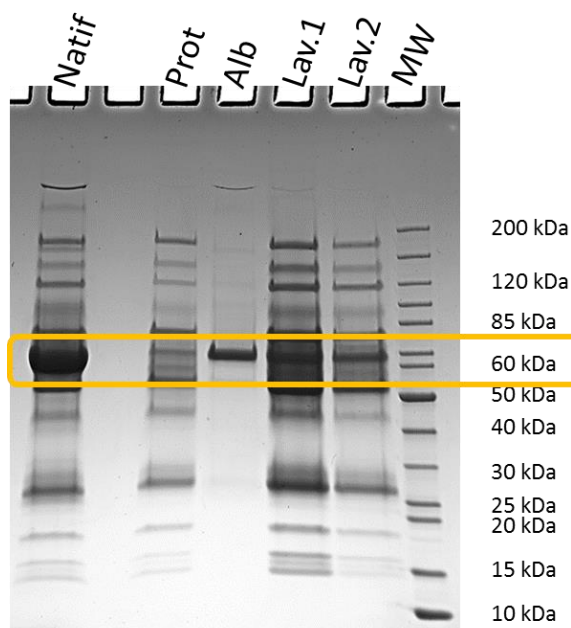
solution (créatine kinase, ovalbumine, ribonucléase A), et selon le pH utilisé, ils ont réussi à isoler de manière spécifique l'ovalbumine. Cette molécule a depuis été commercialisée sous le nom de *Blue Sepharose™ 6 Fast Flow* (BS6, GE Healthcare) et est utilisée pour la déplétion d'albumine et de l'interféron (description fournie par le fournisseur). Nous avons évalué l'efficacité d'élimination de l'albumine avec ce système ainsi que sa spécificité sur le sérum d'ours brun.

### **Matériel et méthodes :**

La solution de stockage (20% éthanol, 0.1M monopotassium phosphate, pH 8) de la résine *Blue Sepharose™ 6 Fast Flow* (BS6, GE Healthcare) a été éliminée par l'ajout de 400µL de DMEM, suivi d'une centrifugation à 2.000g, durant 2minutes, à 4°C. Le surnageant contenant la solution de stockage a été éliminé. 100µL de sérum humain ou de sérum d'ours brun ont été incubés avec 0.8mL ou 1mL de BS6 conditionné, respectivement. Après une incubation de 30 minutes à 4°C, sous agitation, les échantillons ont été filtrés sur une membrane d'acétate cellulose de porosité 22µm (Corning Costar Spin-X, Merck) avec une nouvelle centrifugation (2.000g, 4°C, 2 minutes). La fraction non retenue sur le filtre correspondait à la fraction protéique déplétée en albumine (Prot). Par la suite, des lavages (Lav.) ont été réalisés sur la fraction retenue sur le filtre avec un nouvel ajout de 400µL de DMEM, suivi d'une nouvelle centrifugation (2.000g, 4°C, 2 minutes). La fraction retenue sur le filtre a été récupérée et les protéines fixées sur le BS6 ont été éluées avec 400µL de tampon Laemmli. Cette fraction a été récupérée ; elle était supposée contenir l'albumine (Alb). L'efficacité de déplétion a été évaluée par comparaison des profils électrophorétiques après migration complète sur gel SDS PaGE (coloration sur la nuit au bleu de Coomassie).

## Résultats et discussion :

Dans un premier temps, l'efficacité de 800 $\mu$ L de BS6 a été évaluée sur 100 $\mu$ L de sérum humain. Les profils électrophorétiques obtenus sur le sérum humain (Natif), la fraction protéique déplétée (Prot), les lavages (Lav.1 et Lav.2) et la fraction albumine (Alb) sont présentés en Figure 57.

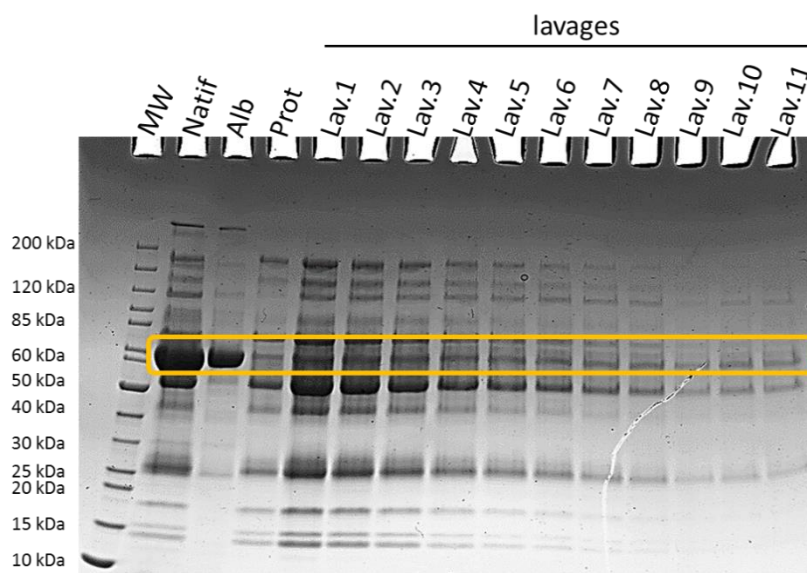


*Figure 57 : Profils électrophorétiques sur gels SDS PaGE d'un sérum humain natif ou traité au BS6. Natif : sérum humain natif ; Prot : fraction protéique déplétée en albumine ; Alb : fraction albumine ; Lav. 1 & 2 : lavages ; MW : marqueur de poids moléculaire. L'encadré jaune localise la bande protéique de l'albumine.*

La bande protéique de l'albumine est quasiment indétectable dans la fraction protéique déplétée (Prot) comparée au sérum natif. De plus, la bande protéique de l'albumine est très intense dans la fraction albumine (Alb), et il n'y a pas eu de détection d'autres bandes protéiques. Ces résultats démontrent une bonne efficacité du système pour dépléter l'albumine humaine spécifiquement.



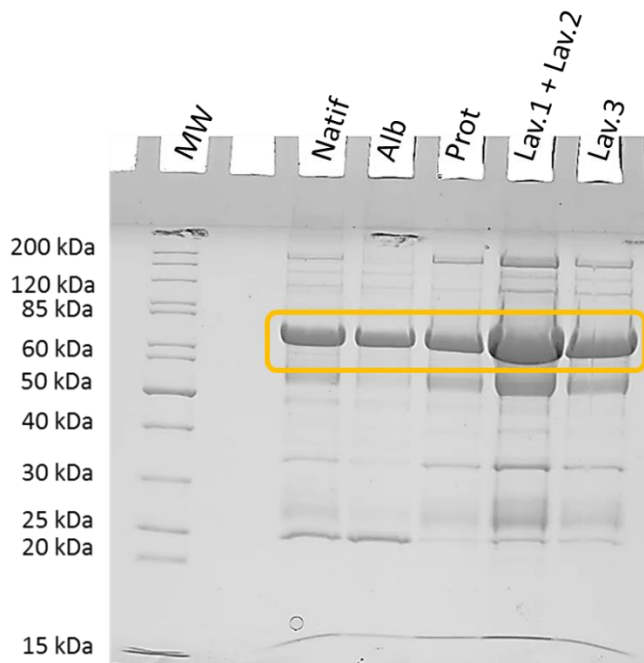
Il est intéressant de noter qu'une grande partie des protéines sériques est détectable sur les profils électrophorétiques des fractions de lavages. Cela suggère une rétention d'une grande partie des protéines sériques sur le système BS6, démontrant des liaisons aspécifiques de protéines sériques. Afin d'évaluer l'importance de cette rétention, le protocole a été reproduit en réalisant 11 lavages successifs et les profils électrophorétiques obtenus pour le sérum natif, la fraction protéique déplétée, la fraction albumine et l'ensemble des lavages sont présentés en Figure 58.



*Figure 58 : Profils électrophorétiques sur gel SDS PaGE du sérum humain natif, traité, ou des lavages réalisés après déplétion au BS6. MW : marqueur de poids moléculaire ; Natif : sérum humain natif ; Alb : fraction albumine ; Prot : fraction protéique déplétée ; Lav. 1 à 11 : lavages. L'encadré jaune représente la bande protéique de l'albumine.*

Les profils électrophorétiques des lavages présentent tous un grand nombre de bandes protéiques. Le BS6 est donc extrêmement rétentif, puisque des protéines autres que l'albumine ont été encore détectées après 11 lavages successifs. Le BS6 semble capable de dépler l'albumine humaine, mais aurait des interactions aspécifiques avec d'autres protéines sériques.

Néanmoins, nous avons évalué l'efficacité de déplétion de l'albumine d'ours par le BS6, grâce à la comparaison des profils électrophorétiques des fractions obtenues (Figure 59).



*Figure 59 : Profils électrophorétiques sur gel SDS PaGE du sérum d'ours brun natif ou traité au BS6. MW : marqueur de poids moléculaire ; Natif : sérum d'ours brun natif ; Alb : fraction albumine ; Prot : fraction protéique déplétée ; Lav.1 + Lav.2 : lavage 1 et 2 combiné ; Lav. 3 : lavage 3*

La bande protéique de l'albumine est intense dans la fraction protéique déplétée (Prot), ainsi que dans la fraction albumine (Alb). Comparés aux résultats obtenus sur le sérum humain, ces résultats démontrent une efficacité de déplétion de l'albumine moins importante sur le sérum d'ours que sur le sérum humain. De plus, plusieurs bandes protéiques, autres que celle de l'albumine, sont détectées dans la fraction albumine (Alb), ce qui confirme que le BS6 isole de manière aspécifique d'autre protéines sériques. Enfin, les profils électrophorétiques des fractions de lavage sont en accord avec les résultats précédents obtenus sur le sérum humain et qui démontraient une forte capacité de rétention du BS6 pour une partie des protéines sériques non ciblées.

### **Conclusions : le BS6 ne permet pas de dépler l'albumine du sérum de l'ours brun**

Le *Blue Sepharose™ 6 Fast Flow* (BS6, GE Healthcare) est une molécule connue pour interagir par liaison électrostatique et/ou hydrophobe avec l'albumine et la transferrine, permettant de les séparer des autres protéines sériques [232]. Les premiers résultats obtenus sur le sérum humain ont montré une bonne efficacité de déplétion de l'albumine. Cependant, d'autres protéines sériques ont également été isolées par le BS6. Cela proviendrait de liaisons électrostatiques et/ hydrophobes avec d'autres protéines sériques ou de protéines en interaction avec l'albumine (effet « éponge »).

Sur le sérum d'ours, les résultats de déplétion de l'albumine par le BS6 ont été moins concluants que ceux obtenus sur le sérum humain. Cette différence d'efficacité pourrait être due à des différences au niveau des sites d'interaction de l'albumine avec le BS6 entre l'albumine humaine et l'albumine de l'ours brun. Par ailleurs, un grand nombre d'autres protéines sériques ont été retenues, comme précédemment. Aux vues des résultats peu satisfaisants obtenus pour la déplétion de l'albumine d'ours par le BS6, cette méthode de déplétion ne sera pas conservée.

### ***Traitement 2-iii : déplétion de l'albumine et des IgG par immunoaffinité***

Parmi les méthodes de déplétion des protéines majoritaires, l'utilisation d'IgG (i.e. immunodéplétion) est courante (voir page 12 à 14). Cette méthode est efficace pour dépler les protéines ciblées par les IgG avec une proportion de liaisons aspécifiques moins importante qu'avec le *Cibacron Blue* [229]. Elle est également facile à utiliser avec une très bonne reproductibilité [233]. Nous avons évalué l'efficacité du système *Proteome Purify 2* (PP2, R&D Systems) à isoler (immunodéplétion) l'albumine et les Immunoglobulines G (IgG) du sérum de

l'ours brun. La composition exacte de la résine n'est pas précisée par le fournisseur, mais fonctionne sur un principe d'immunodéplétion c'est-à-dire avec des anticorps fixés sur des billes.

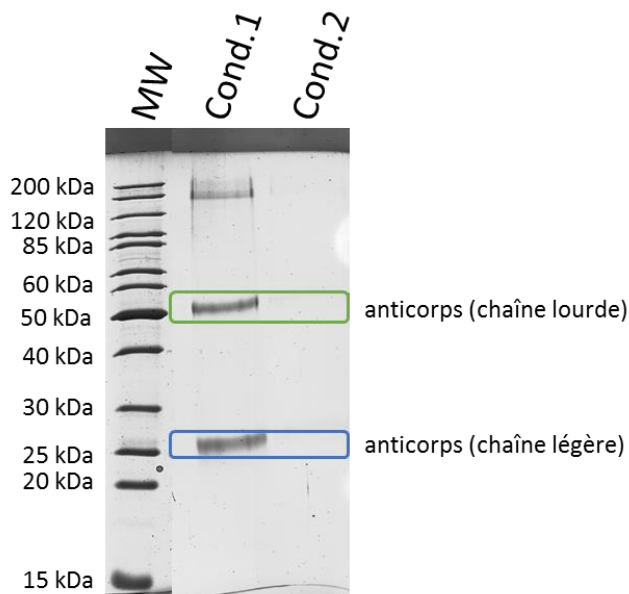
### **Matériel et méthodes :**

Le tampon de stockage de 500µL ou de 1mL de résine *Proteome Purify 2* (PP2, R&D Systems) a été éliminé en ajoutant 400µL ou 800µL de DMEM, respectivement, avant une centrifugation (2.000g, 2 minutes, 4°C) sur une membrane d'acétate cellulose de porosité 22µm (Corning Costar Spin-X, Merck), à deux reprises. Les fractions non retenues sur le filtre ont été conservées (Cond. 1 et Cond. 2). La fraction retenue (résine) a été ajoutée à 390µL de DMEM. 2.5µL de sérum humain ou de sérum d'ours ont été ajoutés avant une incubation de 2h30, à 4°C, sous agitation. Après centrifugation (2.000g, 4°C, 2 minutes) sur membrane d'acétate de cellulose, la fraction non retenue a été récupérée (fraction protéique déplétée, Prot). La fraction retenue sur la membrane a été lavée avec 400µL de DMEM avant une nouvelle centrifugation (2.000g, 4°C, 2 minutes) et les fractions non retenues par la membrane ont été récupérées (Lav.). La fraction retenue sur la membrane, correspondant à la résine et aux protéines qui y sont fixées, a été incubée 1 minute avec 250µL de tampon glycine 100mM. Après centrifugation (2.000g, 4°C, 2 minutes), la fraction non retenue par la membrane a été récupérée (fraction supposée contenir l'albumine, Alb). Les profils électrophorétiques de chaque fraction ont été révélés au bleu de coomassie colloïdal (coloration sur la nuit) après migration sur gel SDS PaGE.

### **Résultats et discussion :**

Dans un premier temps, les profils électrophorétiques des fractions obtenues après conditionnement de la résine par lavages (fractions Cond. 1 et Cond. 2) de PP2 ont été étudiés

(Figure 60). Nous avons constaté la présence de 3 bandes protéiques. Les deux bandes protéiques de plus faibles poids moléculaires pourraient correspondre à la chaîne lourde et à la chaîne légère des anticorps fixés sur la résine PP2. La nature de la bande protéique de haut poids moléculaire (150-200kDa) est inconnue.



*Figure 60 : Profils électrophorétiques sur gel SDS PaGE des fractions obtenues après lavages et conditionnement de la résine PP2.*

Ces résultats suggèrent qu'il y a un relargage d'une partie des anticorps fixés sur les billes durant le stockage de la résine. Il sera donc essentiel de réaliser au moins une étape de lavage de la résine PP2 avant utilisation pour éviter toute contamination de l'échantillon par les anticorps du PP2. Par la suite, l'efficacité de déplétion de l'albumine et des IgG du sérum humain a été évalué avec 500µL de PP2. Les profils électrophorétiques du sérum humain natif ou traité sont présentés en Figure 61.

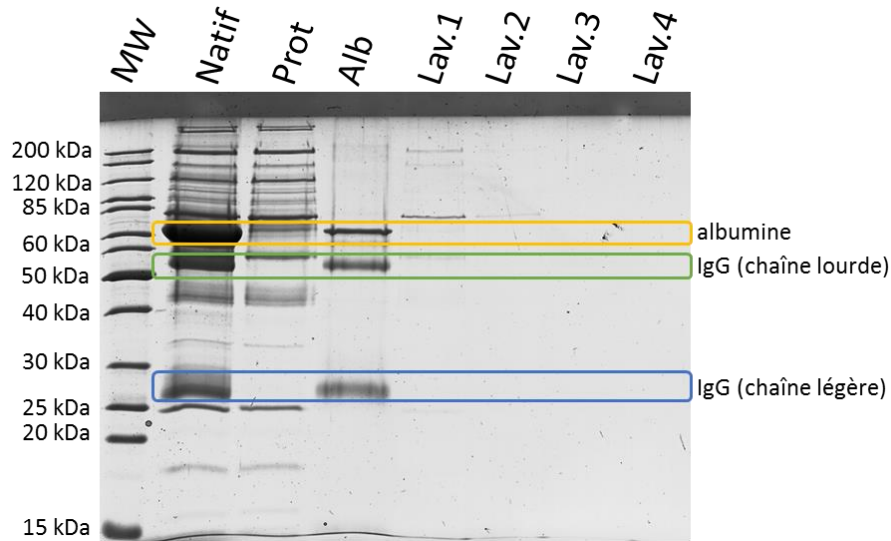


Figure 61 : Profils électrophorétiques sur gel SDS PaGE d'une sérum humain natif ou traité avec 500 $\mu$ L de PP2 conditionné. MW : marqueur de poids moléculaire ; Natif : sérum humain natif ; Prot : fraction protéique déplétée ; Alb : fraction albumine ; Lav.1 à 4 : lavages après. Les encadrés représentent la détection des bandes protéiques de l'albumine (jaune), de la chaîne lourde (vert) ou de la chaîne légère des IgG (bleu).

Les bandes protéiques de l'albumine et des chaînes des IgG ne semblaient pas détectées dans la fraction protéique déplétée (Prot), comparé au sérum natif (Natif). Ces bandes protéiques sont en revanche détectées dans la fraction albumine (Alb) comme attendu. Le système PP2 est donc efficace pour éliminer l'albumine et les IgG du sérum humain. Par ailleurs, la fraction albumine (Alb) contient des protéines sériques dont les bandes ne sont visibles qu'avec un contraste élevé sur la prise d'image du profil électrophorétique (résultat non montré). Ces bandes pourraient correspondre à des protéines de l'albuminome.

Contrairement au système BS6, nous remarquons que les profils électrophorétiques des fractions de lavages (Lav.) ne contiennent pas de bandes protéiques (à l'exception du lavage 1 où quelques bandes protéiques sont détectables), ce qui démontrerait que la déplétion par PP2 serait plus spécifique.

Afin d'évaluer l'efficacité de déplétion du PP2 sur le sérum d'ours, 2.5µL de sérum d'ours brun ont été incubés avec 0.5mL et 1mL de PP2 conditionné et les profils électrophorétiques du sérum d'ours brun natif ou traité ont été comparés (Figure 62).

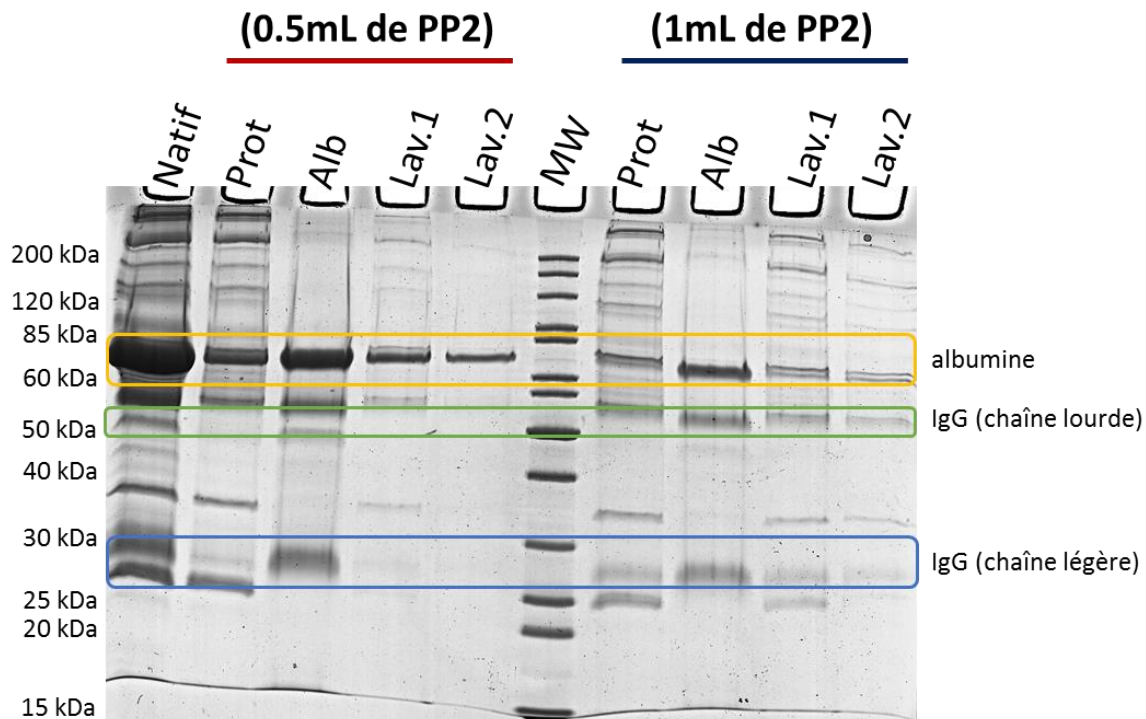


Figure 62 : Profils électrophorétiques du sérum d'ours brun natif ou traité avec 0.5 ou 1mL de PP2 conditionné. Natif : sérum d'ours brun natif ; Prot : fraction protéique déplétée ; Alb : fraction albumine ; Lav. 1 & 2 : lavages après déplétion ; MW : marqueur de poids moléculaire

Les bandes protéiques des IgG du sérum d'ours brun ne semblaient pas détectées dans la fraction protéique déplétée (Prot), comparée au profil électrophorétique du sérum natif (Natif). La bande protéique de l'albumine d'ours a néanmoins été détectée dans la fraction protéique (Prot). Ces bandes protéiques sont détectées dans la fraction albumine (Alb) comme attendu. La déplétion par PP2 semble donc efficace pour dépler l'albumine et surtout les IgG du sérum de l'ours brun. Des bandes protéiques autres que celles des protéines ciblées sont également détectées avec un contraste poussé dans la fraction albumine (Alb). Il y a donc un co-isolément



d'autres protéines sériques. Les résultats démontrent une meilleure efficacité de déplétion des IgG et de l'albumine du sérum de l'ours brun avec 1mL de PP2 comparé à 0.5mL de PP2.

En revanche, les profils électrophorétiques des lavages (Lav. 1 et Lav. 2) entre les deux tests présentent des différences : alors que peu de bandes protéiques ont été détectées pour 0.5mL de PP2, un nombre plus important de bandes protéiques ont été détectées avec 1mL de PP2. Il semble que pour un même volume de sérum, une plus grande quantité de PP2 entraîne la déplétion d'une partie des protéiques sériques autres que l'albumine et les IgG. Il peut s'agir d'interactions non-spécifiques ou de l'albuminome.

### **Conclusions : le système PP2 est une méthode efficace et spécifique pour la déplétion de l'albumine et des IgG du sérum de l'ours brun**

Nous avons démontré qu'il était essentiel de conditionner le système par au moins deux lavages afin d'éliminer des anticorps libérés par la résine du système PP2 qui peuvent être libérés durant le stockage. Sur le sérum humain, nos résultats démontrent une très bonne efficacité pour éliminer l'albumine et les IgG. Par ailleurs, le système semble relativement spécifique bien que des bandes protéiques correspondant à d'autres protéines sériques aient été détectées.

Le PP2 a démontré une bonne efficacité sur le sérum d'ours brun pour dépléter l'albumine et surtout les IgG. Cependant, un grand nombre d'autres protéines sériques semblent être retenues de manière aspécifique par le PP2 (détection de bandes protéique pour les fractions de lavage (Lav.)). Ce protocole est néanmoins suffisamment efficace pour être utilisé dans une étape de déplétion de l'albumine et surtout des IgG.

## Conclusions : méthodes d'élimination des protéines sériques majoritaires applicables au sérum d'ours brun

Trois techniques de déplétion de l'albumine (et des IgG) du sérum d'ours ont été évaluées, basées sur l'affinité de l'albumine pour l'éthanol, pour le *Blue Sepharose 6 Fast Flow 6* (BS6) ou des anticorps dirigés contre l'albumine et les IgG (*Proteome Purify 2* – PP2). En première intention nous avons évalué l'efficacité de déplétion de ces protocoles sur le sérum humain, avant de l'évaluer sur le sérum de l'ours brun. La déplétion de l'albumine par *Blue Sepharose Fast Flow 6* est moins efficace comparée aux deux autres méthodes. Pour chaque méthode, nous avons défini des paramètres optimisés d'utilisation comme le temps et la température d'incubation, le nombre de lavages à réaliser ou la nécessité d'un conditionnement avant utilisation.

Dans le but de fractionner les protéines sériques, chacune des méthodes a permis d'éliminer l'albumine mais aussi une partie d'autres protéines du sérum d'ours brun. La méthode de déplétion par immunoaffinité est très spécifique, ce qui laisse penser que les protéines co-isolées avec l'albumine sont des protéines qui sont directement en interaction avec cette dernière (i.e. albuminome). En revanche, le BS6 et l'utilisation d'éthanol ne sont pas des méthodes d'une grande spécificité et une partie des protéines co-isolées pourraient n'avoir aucune interaction avec l'albumine. Dans le but de décomplexifier le sérum d'ours brun pour identifier plus facilement les composés actifs, la déplétion avec éthanol ou par l'utilisation de PP2 sont donc susceptibles d'être utilisées dans une première étape de préparation des échantillons.

### c. Traitement 3 : fractionnement des protéines sériques par chromatographie d'exclusion sérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion sérique (SEC) est une méthode de chromatographie liquide où les biomolécules sont séparées sans interaction avec la phase stationnaire qui est composée de particules sphériques et poreuses. Les analytes de tailles moléculaires les plus importantes circuleront entre les particules et seront élués en premier, alors que les analytes de plus faible taille moléculaire traverseront les pores des particules et seront élués dans un temps plus long (voir page 22).

Actuellement, la SEC est largement utilisée pour séparer les complexes et les protéines de mélanges purifiés avant une analyse par spectrométrie de masse [62]. Son utilisation sur un mélange complexe est beaucoup moins répandue, en condition non-dénaturante et sans combinaison avec d'autres méthodes de chromatographie liquide. Donc nous avons optimisé les paramètres chromatographiques de SEC afin d'obtenir une bonne séparation chromatographique des biomolécules du sérum d'ours brun, avec une excellente reproductibilité. Par la suite, un sérum d'ours hibernant et un sérum d'ours actif ont été fractionnés en 16 fractions SEC chacun, dont les contenus protéiques ont été étudiés par électrophorèse sur gel SDS PaGE et par analyse LC-MS/MS.

#### **Matériel et méthodes :**

Différents volumes de sérum (20µL ou 50µL) ont été injectés sur un système chromatographique Alliance 2690 (Waters) constitué d'une précolonne SEC BEH (Waters) couplée à une colonne SEC BEH (7.8mm, 300mm, 3.5µm, 200Å ; Waters). Les analytes ont été

élués avec une solution d'acétate d'ammonium 100mM (pH 6.8), sur une durée de 20 minutes. Différents débits ont été testés à 0.86mL/min, 1mL/min et 1.2mL/min pour les optimisations. Une détection UV (longueur d'onde 280nm, absorbance des cycles aromatiques de l'acide aminé tryptophane et tyrosine) a été réalisée en sortie de colonne afin de détecter les protéines.

Les concentrations protéiques de chaque fraction SEC ont été déterminées par dosage colorimétrique RC-DC. 10µg ont été traitées avec des agents réducteurs (DTT) et alkylants (IAM) avant une digestion trypsique en solution (ratio 1 : 50). Les peptides ont été extraits par SPE (*Solid Phase Extraction*) sur une colonne SEP-Pack 100mg. Les peptides ont été analysés sur un système chromatographique NanoAcquity (Waters) couplé à un Q-Exactive Plus (Thermo Scientific). Les identifications des protéines ont été réalisées grâce au logiciel Mascot (Matrix Science) contre une banque de données *UniprotKB* (Taxonomie 9632, Ursidae, 22 Juin 2017, 37013 entrées) à laquelle ont été ajoutées les séquences *decoy* des protéines et les séquences de la trypsine et des contaminants communs. Les paramètres de recherche étaient les suivants : un site de clivage manqué au maximum, tolérance MS et MS/MS de 5 ppm et 0.03 Da respectivement, carbamydométhylation des cystéines en modification fixe et oxydation des méthionines, acétylation des N-termini protéiques et propionamidation des cystéines en modifications variables. Les résultats d'identifications ont été validés avec un FDR à 1% (au niveau peptidique et protéique) grâce au logiciel Proline.

### Optimisations, résultats et discussion :

Afin d'optimiser les capacités de séparation du système chromatographique, 20 $\mu$ L de sérum d'ours brun ont été analysés avec trois débits : 0.86, 1 et 1.2 mL/min, et les profils UV obtenus ont été comparés (Figure 63).

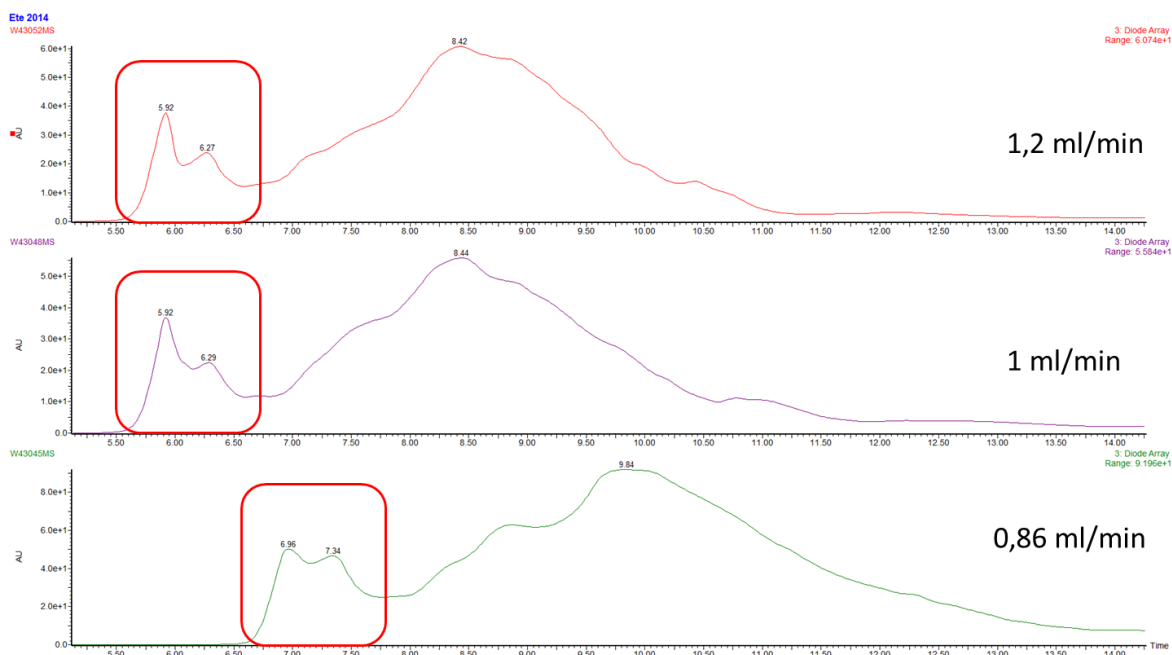
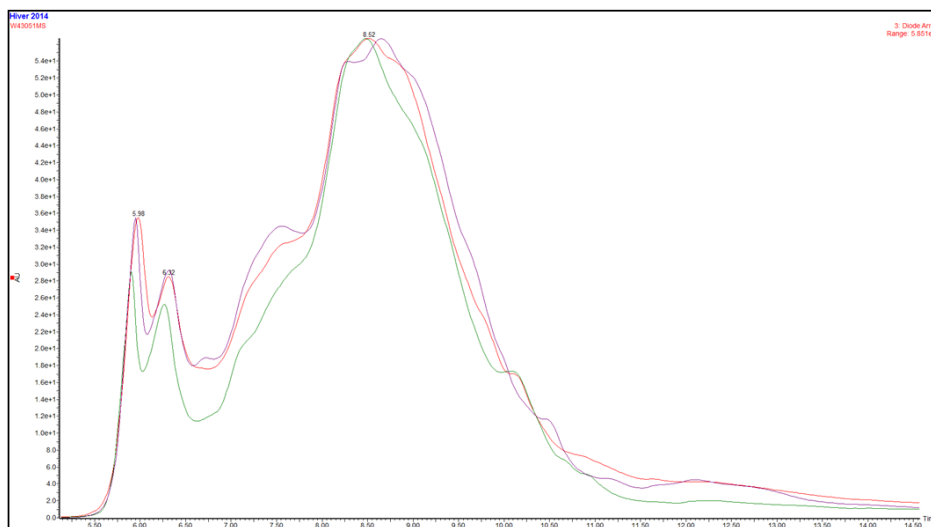


Figure 63 : Profils de détection UV ( $\lambda$  280nm) en sortie de colonne SEC pour le contenu protéique de 20 $\mu$ L de sérum d'ours brun séparés selon trois débits : 0.86 mL/min, 1 mL/min et 1.2 mL/min. L'encadré rouge est la zone des profils UV ayant servi à déterminer le débit pour lequel la séparation chromatographique était la meilleure.

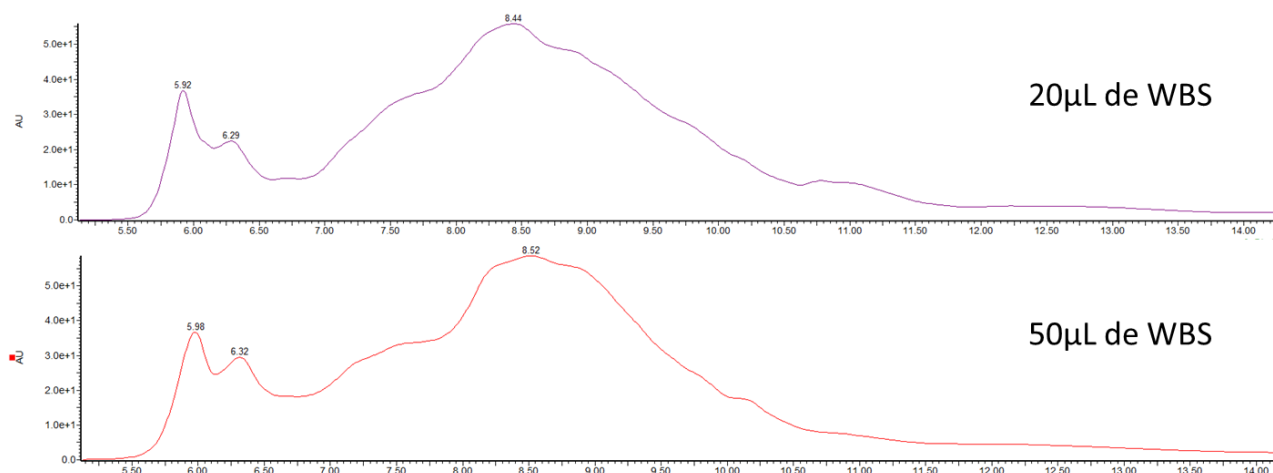
En comparant les premières minutes d'élution, le débit le moins élevé (0.86 mL/min) n'a pas permis de séparer de manière aussi efficace les deux premiers pics observés, comparé aux débits plus importants de 1 mL/min et de 1.2 mL/min. En revanche, la séparation semble relativement similaire entre ces deux débits. Afin de limiter le volume d'élution qui serait plus important avec un débit de 1.2 mL/min, le débit de 1 mL/min a été sélectionné pour la suite.

Pour évaluer la reproductibilité de notre système, 3 analyses consécutives de 20 $\mu$ L d'un sérum d'ours brun hibernant, à 1mL/min ont été réalisées. La superposition des trois profils UV a mise en évidence que les profils étaient très similaires et quasiment superposables, démontrant la reproductibilité de notre système chromatographique (Figure 64).



*Figure 64 : Superposition des profils UV ( $\lambda$  280nm) de trois séparations consécutives de 20 $\mu$ L de sérum d'ours brun hibernant sur une colonne SEC.*

Les premières optimisations ont été réalisées sur 20 $\mu$ L de sérum d'ours brun hibernant (WBS). Par la suite, nous avons décidé de fractionner 50 $\mu$ L de sérum d'ours par SEC afin d'augmenter la probabilité d'obtenir des fractions contenant suffisamment de molécules de composés actifs du sérum d'ours hibernant pour les tester sur myotubes humains. Nous avons donc évalué les différences de profils pour une élution en SEC de 20 $\mu$ L et de 50 $\mu$ L de sérum d'ours hibernant avec un débit de 1mL/min (Figure 65).



*Figure 65 : Profils UV ( $\lambda$  280nm) pour la séparation en SEC à un débit de 1mL/min de 20μL (panel du haut) et de 50μL (panel du bas) de sérum d'ours hibernant (WBS).*

Les profils UV ( $\lambda$  280nm) n'ont pas montré de différences significatives entre une analyse de 20μL et de 50μL de WBS. Notre système semble donc adapté pour la séparation en chromatographie SEC de 50μL de WBS.

L'objectif suivant a été de mettre en évidence des différences entre le sérum d'ours hibernant (WBS) et le sérum d'ours actif (SBS) grâce à la comparaison des profils UV ( $\lambda$  280nm) d'une élution à 1mL/min pour 50μL de chacun des sera (Figure 66).

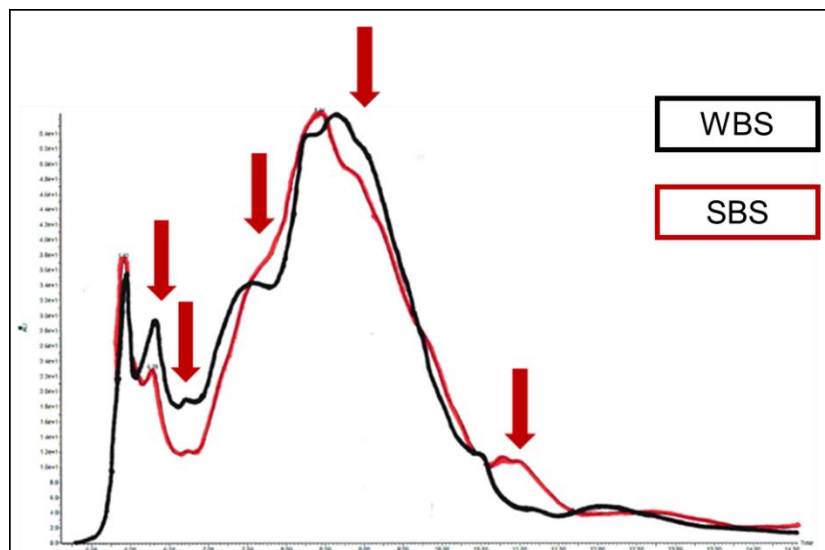


Figure 66 : Superposition des profils UV ( $\lambda$  280nm) après séparation en SEC de 50 $\mu$ L de sérum d'ours brun hibernant (WBS – ligne noire) et de 50 $\mu$ L de sérum d'ours brun actif (SBS – ligne rouge) à un débit de 1mL/min. Les flèches rouges soulignent les différences majeures entre les deux profils UV.

Des différences ont été observées entre les profils UV de chaque sérum démontrant que notre système était capable de mettre en évidence des différences de constitution entre les deux types de sera, et que son utilisation pour un fractionnement, pourrait permettre d'isoler des fractions dont les compositions seraient différentes entre le WBS et le SBS. 16 fractions SEC ont été collectées pour 50 $\mu$ L de WBS et 50 $\mu$ L de SBS à un débit de 1mL/min. Par la suite, le contenu protéique de chaque fraction, pour les deux sera, a été examiné par détection des bandes protéiques sur gel SDS PaGE (Figure 67) et par analyse LC-MS/MS.



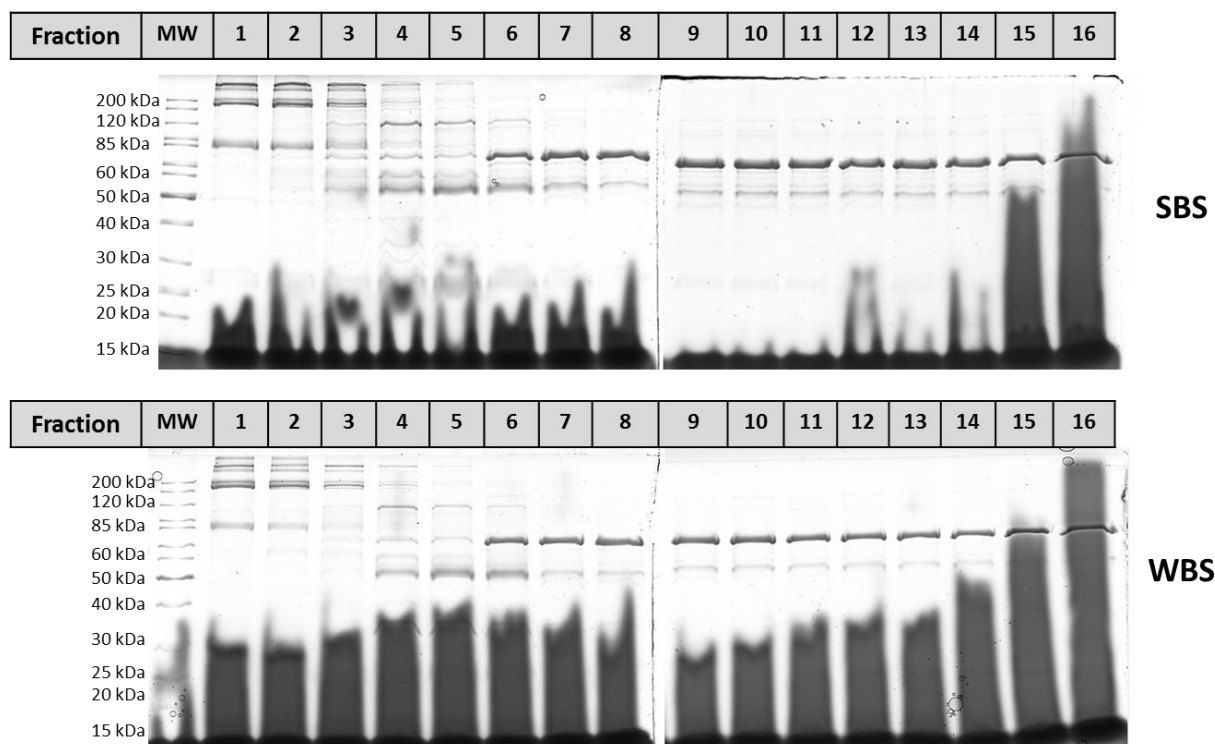


Figure 67 : Profils électrophorétiques des 16 fractions obtenues après fractionnement en SEC de 50µL de SBS et de 50µL de WBS. Les bandes noires continues de tailles aléatoires sont des artefacts. MW : marqueur de poids moléculaires.

Les profils électrophorétiques sur gel SDS PaGE étaient similaires pour une même fraction obtenue après fractionnement en SEC de 50µL de WBS et de 50µL de SBS. Pour les profils électrophorétiques des fractions 1 à 7, plusieurs bandes protéiques différentes ont été détectées et il semblerait que plus la fraction ait été collectée en début d'élution, plus les protéines aient été détectées à des hauts poids moléculaires sur le gel SDS PaGE. Ces résultats sont en accord avec le fait que la SEC permette d'isoler les biomolécules de hauts poids moléculaires en premier.

En revanche, les bandes protéiques qui ont été détectées semblent être globalement les mêmes entre les fractions SEC 8 à 16 qui présentent des profils électrophorétiques très semblables. Ce résultat est à nuancer puisque la présence d'un important artefact (qui pourrait être dû à une trop grande quantité de sels dans le tampon 0.1M d'acétate d'ammonium utilisé

pour la SEC) pourrait dissimuler la présence de bandes protéiques de faibles tailles moléculaires (<40kDa).

Dans un second temps, l'identification des protéines contenues dans les fractions du SBS et du WBS a été réalisée par analyses LC-MS/MS. 182 et 254 protéines d'ours brun ont été identifiées dans l'ensemble des fractions SEC du WBS et du SBS, respectivement (Figure 68 A) et la cause de la différence du nombre d'identifications protéiques entre les deux sera n'a pas pu être déterminée.

Seulement 13 et 3 protéines ont été identifiées dans toutes les fractions obtenues à partir du SBS et du WBS, respectivement. Cela démontre que le fractionnement par SEC du sérum d'ours brun permet d'obtenir des fractions dont le contenu protéique diffère. D'autre part, 52 et 29 protéines ont été identifiées uniquement dans une des fractions pour les fractions SEC obtenues à partir du SBS et du WBS, respectivement. Ceci démontre l'efficacité de notre système pour fractionner le sérum d'ours brun.

Nous avons ensuite évalué l'importance du nombre de protéines communément identifiées entre deux fractions SEC adjacentes issues d'un fractionnement par SEC de 50µL de SBS (Figure 68 B). Entre 33.6% et 87.0% de protéines ont été communément identifiées entre des fractions adjacentes (fractions 1-2 et fractions 8-9 respectivement), et 61.6% de protéines ont été communément identifiées en moyenne entre fractions adjacentes. Bien que la proportion de protéines communément identifiées entre deux fractions adjacentes semble élevée, le fractionnement par SEC du sérum d'ours brun a permis d'obtenir des fractions au contenu protéique différent.

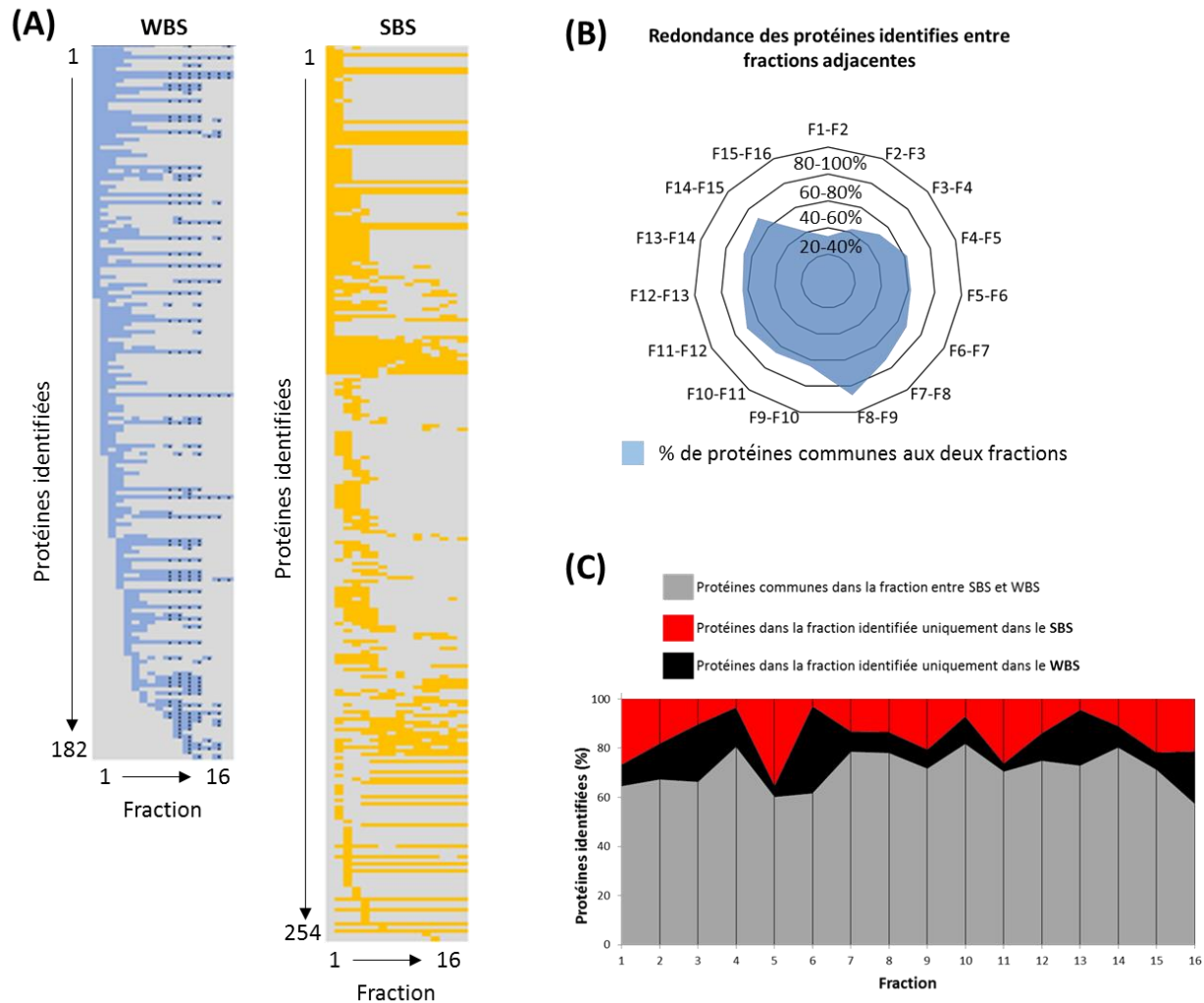


Figure 68 : Identifications des protéines présentes dans chacune des fractions issues d'un fractionnement en SEC à partir de 50µL de WBS (bleu) ou 50µL de SBS (jaune) (A). Le pourcentage de protéines communément identifiées entre deux fractions adjacentes a été évalué sur les fractions obtenues à partir de 50µL de SBS (B). La comparaison des protéines identifiées entre le SBS et le WBS pour une même fraction (C) a mis en évidence un grand nombre de protéines communes (gris), ainsi que des protéines identifiées seulement à partir d'un fractionnement SEC sur du SBS (rouge) ou sur du WBS (noir).

Grâce à l'analyse des profils UV ( $\lambda$  280nm), des différences de composition protéique avaient été observés. Il pouvait s'agir de différences dues à la présence de protéines différentes ou à des concentrations différentes pour des mêmes protéines entre le WBS et le SBS. L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'obtenir l'identification des protéines présentes dans chacune des fractions SEC à partir du WBS et du SBS. En comparant une même fraction SEC

obtenues à partir de SBS ou de WBS, il a été constaté que la majorité des protéines identifiées étaient présentes dans le WBS comme dans le SBS (Figure 68 C). Cependant, une partie des protéines n'ont été identifiées que dans des fractions issues du fractionnement SEC du WBS ou du SBS (de 18.2% à 42.7%, pour la fraction 10 et la fraction 16 respectivement), démontrant une différence de composition pour une même fraction obtenue à partir de SBS ou de WBS. Les fractions pour lesquelles la différence de composition était la plus marquée, étaient les fractions 16, 5 et 6 avec respectivement 42.7%, 40% et 38% de protéines identifiées différentes entre le WBS et le SBS. Ces fractions sont susceptibles de contenir les composés actifs ayant induits une inhibition de la protéolyse plus marquée après une exposition des myotubes humains au WBS, comparé à l'exposition au SBS [8].

### **Conclusions : le fractionnement des protéines sériques par SEC permet d'obtenir des fractions dont le contenu protéique diffère entre le SBS et le WBS**

Nous avons déterminé qu'un débit de 1mL/min permettait d'obtenir une séparation chromatographique suffisante pour mettre en évidence des différences de constitution entre le SBS et le WBS, et ce de manière reproductible. Les analyses par spectrométrie de masse ont confirmé les différences déterminées par comparaison des profils UV ( $\lambda$  280nm) et par analyse des profils électrophorétiques des fractions, après fractionnement par SEC de 50 $\mu$ L de SBS et de 50 $\mu$ L de WBS analysés par SEC. Les fractions SEC 16, 5 et 6 semblent celles pour lesquelles les différences de composition entre le SBS et le WBS semblent les plus marquées, et sont peut-être les plus susceptibles de contenir les composés actifs.

#### d. Traitement 4 : fractionnement des protéines sériques par ultrafiltration

L'ultrafiltration est une méthode de séparation membranaire permettant de laisser passer des molécules en suspension ou en solution selon leurs tailles. Plusieurs solutions d'ultrafiltration sont aujourd'hui commercialisées avec différents seuils de poids moléculaire (*Molecular Weight Cut-Off*, MWCO). Ce dernier détermine la taille moyenne des pores de la membrane. L'ultrafiltration par centrifugation consiste à utiliser la force centrifuge pour que les protéines de poids moléculaires inférieurs au seuil traversent une membrane semi-perméable (semi-perméabilité due à la présence de pores) [234]. L'ultrafiltration est utilisée pour isoler le protéome de faible poids moléculaire dans le plasma [235], le sérum humain [236] ou le peptidome du sérum humain [237].

Une étude comparative des systèmes Microcon et Amicon Ultra (Millipore), et Centriscart et Vivaspin 4 (Sartorius), avec des seuils de poids moléculaires de 20 ou 30 kDa, a démontré que le Vivaspin 4 était le plus efficace pour isoler la fraction plasmatique de faible poids moléculaires. Nous avons donc choisi d'utiliser des Vivaspin 2, avec différents seuils de poids moléculaires (30, 50 et 100kDa) et d'en évaluer l'efficacité pour fractionner du sérum humain. Tout d'abord, 4mg de BSA ont été utilisés successivement afin de vérifier que les Vivaspin 2 donnaient des résultats de fractionnement comme attendu. Par la suite, la même méthode a été appliquée à 300, 100 ou 20  $\mu$ L de sérum humain.

#### Matériels et méthodes

Les membranes (Vivaspin 2, Sartorius) ont été conditionnées avec 1mL d'une solution 70% éthanol, qui a ensuite été élué avec une centrifugation de 20 minutes, à 4.000g et à 4°C. 1mL

d'eau distillée a été ajouté avant d'être élué par une nouvelle centrifugation (4.000g, 20 minutes, 4°C). Les Vivaspin 2 ont été utilisés successivement en débutant avec le MWCO le plus élevé, comme décrit ci-après (Figure 69). L'échantillon (BSA ou sérum humain) a d'abord été centrifugé sur le filtre de MWCO (*Molecular Weight Cut-Off*) de 100kDa. La fraction ayant passé le filtre a été ensuite déposée sur un filtre de 50kDa, puis centrifugée. Enfin, de la même manière, la partie éluée du filtre de MWCO 50kDa a été déposée sur un filtre de MWCO 30kDa. L'ultrafiltration en mode décroissant a été évaluée dans un premier temps sur 4mg de BSA, puis pour fractionner 20, 100 ou 300µL de sérum humain avec une centrifugation de 1h30, à 4.000g, à 4°C. 150µL de DMEM ont été ajoutés sur la membrane du filtre avant une nouvelle centrifugation de 1h30, à 4.000g, à 4°C. Le DMEM a été utilisé car il s'agit d'un milieu de culture utilisé pour les expositions de myotubes humains aux sera d'ours bruns. Les éluions ont été déposées sur le filtre suivant alors que la fraction retenue a été diluée avec 250µL de DMEM, et a été conservée.

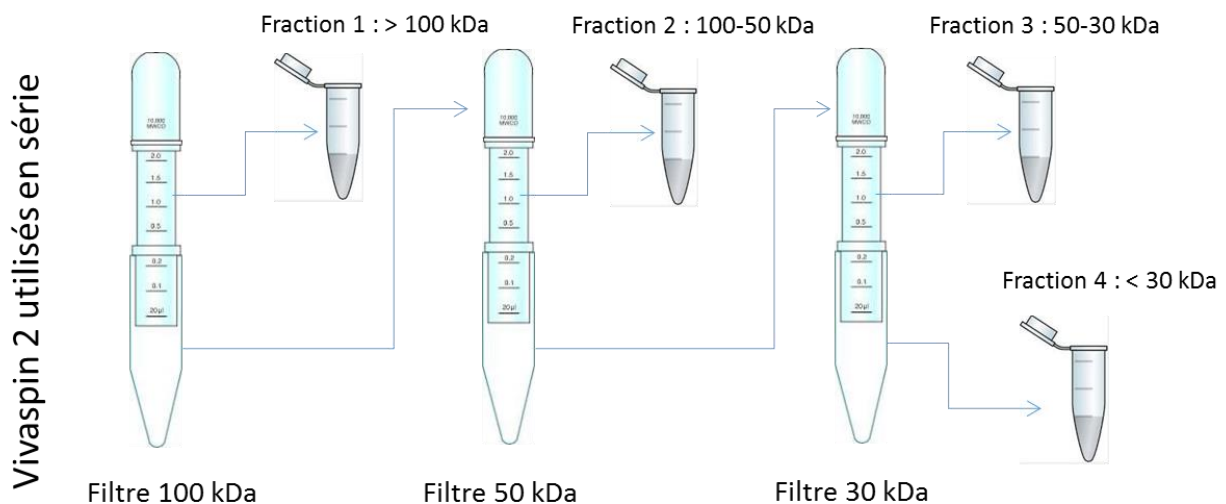


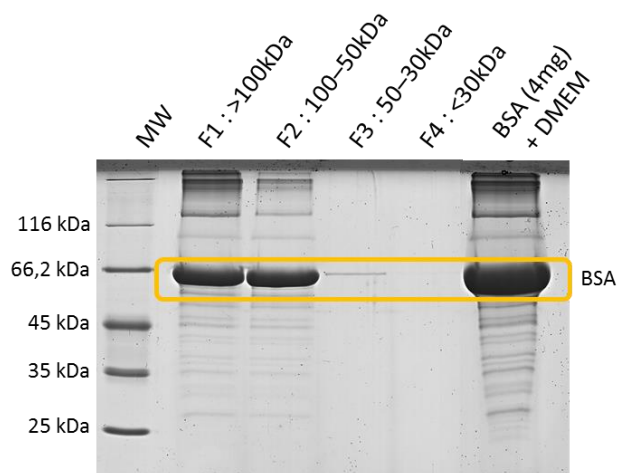
Figure 69 : Méthode d'ultrafiltration avec des Vivaspin 2 utilisés successivement : la fraction retenue sur le filtre 100kDa a été récupérée (Fraction 1, rétention des protéines > 100kDa) alors que la fraction éluée a été déposée sur le filtre de 50kDa. La fraction retenue sur le filtre 50kDa a été récupérée (Fraction 2, rétention des protéines de 50-100kDa), tandis que la fraction éluée a été déposée sur le filtre 30kDa.

*Finalement, la fraction retenue (Fraction 3, 30-50kDa) et la fraction éluée (Fraction 4, <30kDa) ont été récupérées.*

Les profils électrophorétiques des trois fractions retenues sur chacun des filtres (Fraction 1 : > 100kDa, Fraction 2 : 50-100kDa et Fraction 3 : 30- 50 kDa) et de la fraction finalement éluée (Fraction 4 : < 30kDa), ont été obtenus par électrophorèse sur gel SDS PaGE et les bandes protéiques ont été détectées par coloration au bleu de coomassie colloïdal sur la nuit.

### Résultats et interprétations

Afin d'évaluer l'efficacité des Vivaspin 2 à retenir ou à éluer 4mg de BSA (100μL) dans 200μL de DMEM selon différents MWCO utilisés en série en mode décroissant, les profils électrophorétiques obtenus pour les 4 fractions sur gel SDS PaGE ont été analysés (Figure 70).



*Figure 70 : Profils électrophorétiques sur gel SDS PaGE des fractions obtenues après une ultrafiltration sur des MWCO en série en mode décroissant de 100, 50 ou 30kDa sur une solution BSA et DMEM : fractions retenues sur le MWCO 100kDa (F1 : >100kDa), puis sur le MWCO 50kDa (F2 : 100-50kDa), puis sur le MWCO 30kDa (F3 : 50-30kDa) et éluée sur le MWCO 30kDa (F4 : <30kDa). La dernière piste est le profil électrophorétique obtenu pour l'échantillon utilisé (4mg BSA ajouté à du DMEM). La bande protéique correspondant à la BSA est signalée par un encadré jaune. MW : marqueur de poids moléculaires*

La bande protéique de la BSA a été détectée sur les profils électrophorétiques de la fraction 1 (i.e. retenue sur le filtre de 100kDa) et de la fraction 2 (i.e. éluée du filtre de MWCO

100kDa mais retenue sur le filtre de MWCO 50kDa), et très légèrement de la fraction 3 (i.e. éluée du filtre de MWCO 50kDa mais retenue sur le filtre de MWCO 30kDa). La BSA, protéine de 69kDa, a été effectivement éluée sur le filtre de MWCO de 100kDa mais pas complètement, et a été finalement retenue sur le filtre de MWCO de 50kDa, comme attendu.

Des bandes protéiques autres que celle de la BSA ont été détectées sur les profils électrophorétiques de la fraction 1 et de la fraction 2, ainsi que dans pour les 4mg de BSA dans du DMEM. Ces bandes protéiques pourraient correspondre à des protéines présentes dans le DMEM. Aucune bande protéique de faible poids moléculaire, n'a été détectée dans les fractions 3 et 4 où les protéines de poids moléculaires de 30-50kDa et <30kDa étaient attendues. Ces fractions sont censées correspondre au peptidome du sérum, et il a été démontré qu'il n'était pas détectable avec une coloration au bleu de coomassie colloïdal. Il est nécessaire de réaliser une coloration à l'argent [237]. Dans notre cas, pour s'assurer de l'absence de bandes correspondant au peptidome sérique, il aurait été nécessaire de réaliser une révélation avec une coloration à l'argent.

Puisque l'efficacité de l'ultrafiltration par centrifugation sur les Vivaspin 2 a été validée sur un mélange simplifié (4mg de BSA diluée dans du DMEM), nous avons utilisé la même méthode pour fractionner le sérum humain. Pour cela, différents volumes de sérum humain (20, 100 et 300µL) ont été fractionnés sur des Vivaspin 2 de MWCO 100, 50 et 30kDa utilisés successivement. En considérant une concentration en protéine moyenne de 65µg/µl dans le sérum, cela correspond à fractionner environ 19.5, 6.5 et 1.3mg de protéine, respectivement. 4 fractions ont



été obtenues (caractérisées comme celles obtenues sur l'échantillon de BSA), et les profils électrophorétiques de chaque fraction ont été analysés (Figure 71).

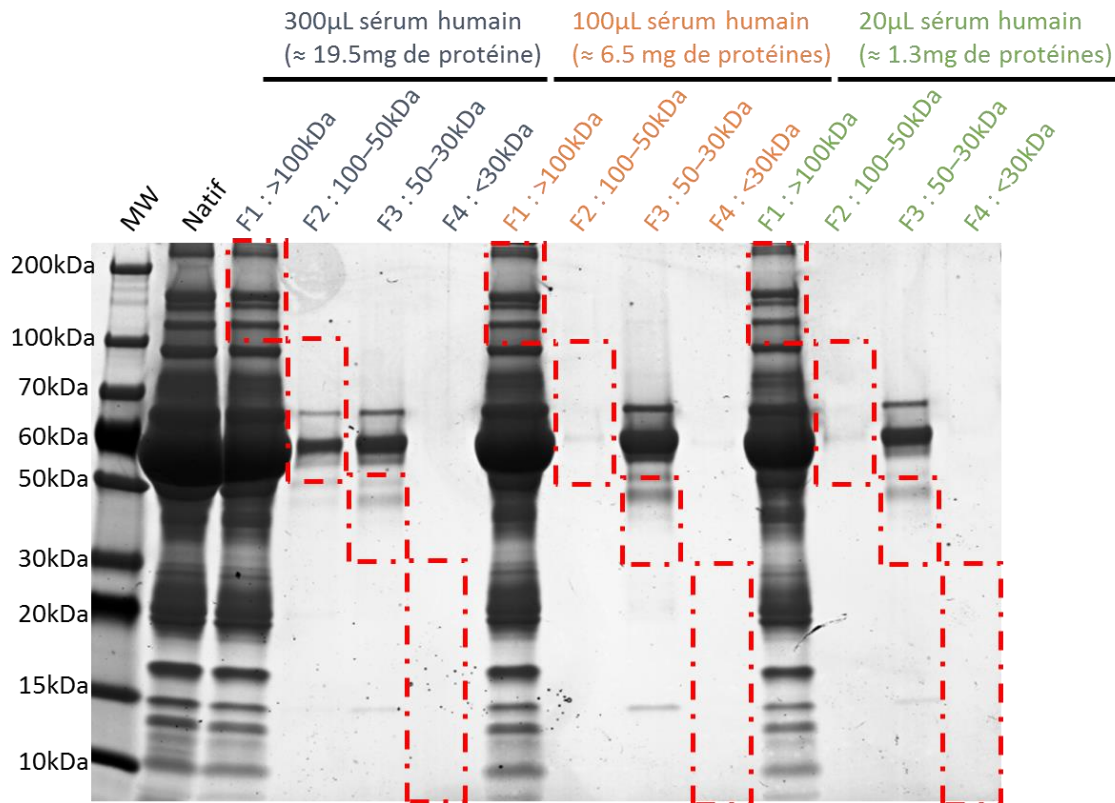


Figure 71 : Profils électrophorétiques sur gel SDS PaGE des fractions obtenues après une ultrafiltration sur des MWCO utilisés successivement de 100, 50 ou 30kDa pour 20, 100 ou 300 µL de sérum humain : fractions retenues sur le MWCO 100kDa (F1 : >100kDa), puis sur le MWCO 50kDa (F2 : 100-50kDa), puis sur le MWCO 30kDa (F3 : 50-30kDa) et éluée sur le MWCO 30kDa (F4 : <30kDa). La dernière piste est le profil électrophorétique obtenu pour l'échantillon utilisé (4mg BSA ajouté à du DMEM). Les poids moléculaires auxquels les bandes protéiques sont attendues pour chaque fraction sont signalés par les encadrés rouge.

L'ensemble des bandes protéiques caractérisant le profil électrophorétique du sérum humain natif, semble correspondre aux bandes protéiques détectées sur la fraction 1 (i.e. retenue sur le filtre de MWCO 100kDa), montrant que la grande majorité des protéines sériques étaient retenues sur le filtre de seuil de poids moléculaire de 100kDa. Pour l'ensemble des fractions, les

bandes protéiques ne sont pas détectées aux poids moléculaires attendus, à l'exception de la fraction 2 pour l'ultrafiltration sur 300µL de sérum humain.

De plus, la méthode d'ultrafiltration avec l'utilisation de filtres de différents MWCO utilisés successivement, a été testée sur trois volumes de sérum humain (20, 100 et 300µL,) afin d'évaluer si l'efficacité de fractionnement était dépendante du volume de sérum (i.e. de la quantité de protéines sériques) déposé sur la première membrane. Aucune différence n'a été observée pour les 3 volumes de sérum testés, puisque quasiment l'ensemble des protéines sériques semblent retenu sur le filtre de MWCO 100kDa. Les résultats obtenus sont différents de ce qui avait été obtenu pour le fractionnement de 4mg de BSA diluée dans du DMEM, et ce indépendamment de la quantité de protéines déposées sur le premier filtre. Le fractionnement sur 20µL de sérum humain, correspond au fractionnement de 1.3mg de protéine sérique. Cette quantité est bien inférieure à la quantité de BSA utilisée auparavant (4mg). Il semblerait donc que le sérum humain ne puisse pas être fractionné avec des Vivaspin 2 et il est possible que des protéines sérique (comme la fibrine) colmatent les pores de la membrane, empêchant une circulation des protéines au travers de ces pores. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe de Georgiou *et al.* [238] qui n'a pas réussi à fractionner les protéines du plasma humain avec des systèmes d'ultrafiltration par centrifugation (MWCO de 30kDa). Dans cette publication, il est proposé que l'inefficacité des systèmes serait due au fait que ces membranes ont été produites dans le but de concentrer les protéines et d'éluer les sels plutôt que pour fractionner les protéines selon leurs tailles moléculaires. L'équipe de Zheng *et al.* [237] a réussi à isoler le peptidome circulant humain à partir de 500µL de sérum ou plasma humain par ultrafiltration sur Vivaspin 4 (MWCO 10kDa). De ce fait, il est possible que notre méthode ait

permis d'isoler le peptidome du sérum, et pour nous en assurer il aurait été nécessaire de réaliser une détection des bandes du peptidome (<14kDa) avec une coloration à l'argent qui est plus sensible.

**Conclusion du traitement 4 : l'ultrafiltration doit être optimisée pour fractionner les protéines sériques**

L'ultrafiltration sur Vivaspin 2 semble fonctionner pour isoler 4 mg de BSA. En revanche, les résultats obtenus pour le fractionnement du sérum humain ne sont pas satisfaisants puisque la plupart des protéines sériques ont été retenues sur le premier filtre de MWCO 100kDa. L'ultrafiltration par filtration sur Vivaspin 2 n'est donc pas utilisable pour fractionner les protéines sériques humaines et n'a donc jamais été appliqué au fractionnement des protéines du sérum d'ours brun. A l'avenir, il sera possible de fractionner le sérum en éliminant des protéines majoritaires ou grâce à la SEC.



*Crédit photo : Dr Fabrice BERTILE*

## Conclusion générale

## Conclusion générale

L'analyse par spectrométrie de masse est largement répandue pour caractériser le protéome d'un tissu ou d'une cellule. Cependant, il n'existe pas de stratégie analytique « standard », et il est nécessaire de faire des choix à chaque étape clef de l'analyse afin de répondre au mieux à la question posée. L'étude d'espèces « exotiques » est de plus en plus répandue afin d'ouvrir la voie à de nouvelles solutions face à des problématiques humaines. L'analyse par spectrométrie de masse de telles espèces reste un défi de par le fait que les bases de données sont peu, voire pas, renseignées. Par ailleurs, les outils biochimiques utilisés classiquement pour la préparation d'échantillons (méthodes de déplétion ou de fractionnement) peuvent se montrer inefficaces pour les espèces « exotiques ». De ce fait, il est indispensable de développer ou d'optimiser des solutions (de la préparation d'échantillons à l'interprétation bioinformatique des données). Au cours de cette thèse, nous avons mis en place des stratégies afin de faciliter l'analyse par spectrométrie de masse d'échantillons provenant d'ours bruns (Figure 72), l'objectif étant de mieux caractériser les adaptations de l'ours brun à l'hibernation *via* l'étude des régulations du protéome, et en particulier du protéome musculaire.

## Etape d'une analyse protéomique

## Solutions développées

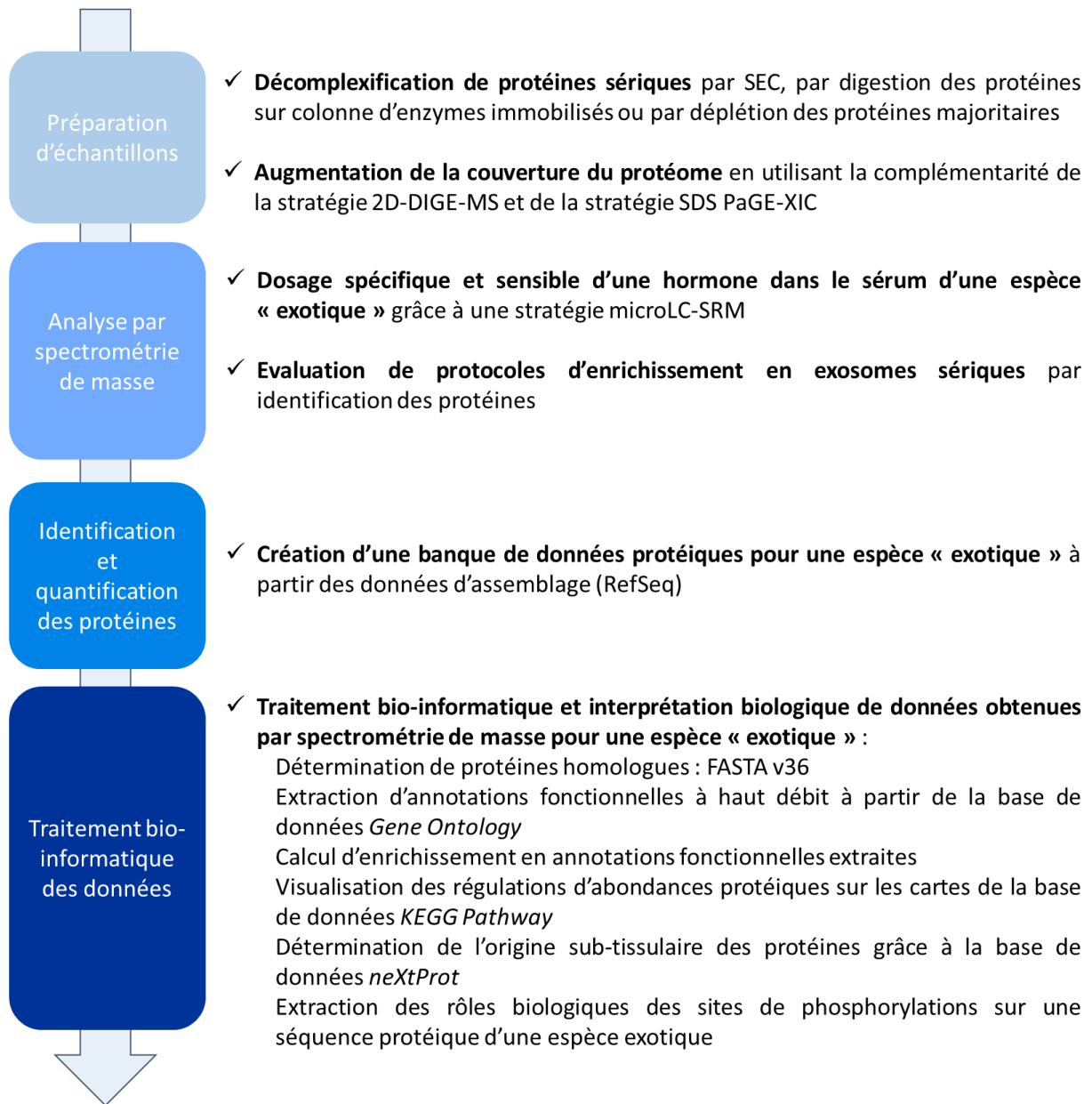


Figure 72 : Résumé des solutions développées au cours de ces travaux pour l'analyse par spectrométrie de masse d'échantillons d'un organisme « exotique »

Dès la **préparation d'échantillon**, il est indispensable de tenir compte de la complexité de l'échantillon (gamme dynamique, présence de protéines majoritaires...) pour mettre en place un protocole permettant une bonne couverture du protéome (i.e. identification du plus grand nombre de protéines possible). Dans le cadre d'études sur les modifications chimiques des protéines, comme la phosphorylation, la préparation d'échantillon nécessite également d'importantes précautions puisque l'ajout ou la suppression de phosphorylations sont des événements très dynamiques et labiles. Au cours de cette thèse, nous avons bénéficié de la complémentarité des stratégies SDS PaGE-XIC et 2D-DIGE-MS pour analyser de manière quantitative le protéome musculaire et le protéome du tissu adipeux de l'ours brun en phase hibernante vs en phase active. Par ailleurs, un protocole de préparation d'échantillon dédié à l'enrichissement en phosphopeptides provenant du muscle squelettique d'ours brun a été développé pour l'analyse du phosphoprotéome musculaire de l'ours brun hibernant vs actif, qui sera réalisée dans les mois à venir. Des méthodes de préparation d'échantillons ont été optimisées afin de digérer (sur colonnes d'enzymes immobilisées) ou de fractionner (déplétion en albumine et fractionnement par SEC) les protéines sériques. Les produits de ces préparations seront ajoutés au milieu de culture de myotubes humains, ce qui pourrait permettre de caractériser les facteurs d'épargne protéique circulants dans le sérum d'ours brun hibernant.

L'analyse par spectrométrie de masse peut être réalisée par **différentes stratégies** selon que l'on souhaite analyser un nombre restreint de protéines pré-déterminées (approche ciblée) ou sur l'ensemble du protéome (approche globale). Dans le cadre de cette thèse, nous avons développé une approche quantitative ciblée par microLC-SRM qui pourra être utilisée afin de doser la concentration d'adiponectine sur un grand nombre d'échantillons sériques d'ours bruns.

En parallèle, des stratégies globales ont été mises en place pour identifier les protéines présentes dans le LCR et les exosomes sériques d'ours brun, ou pour quantifier les régulations d'abondance protéique dans des myotubes humains exposés à différents traitements (sera natifs [WBS vs SBS] ou sera enrichis en BOH).

L'étude d'une espèce « exotique » par spectrométrie de masse reste un défi puisqu'il existe peu, ou pas, d'informations dans les bases de données de séquences protéiques et dans les bases de données d'annotations fonctionnelles. Afin d'obtenir une **identification et une quantification des protéines**, les plus représentatifs de notre modèle d'étude (i.e. sans utiliser de banque de données d'espèces phylogénétiquement proche), nous avons développé un algorithme pour générer une banque de données protéiques à partir des données d'assemblage de la base de données *RefSeq*. En parallèle, nous avons réalisés d'importants développements pour le **traitement bio-informatique des données**. Les algorithmes présentés dans ce manuscrit ont permis de déterminer les protéines humaines homologues de protéine d'organismes « exotiques » et d'extraire les annotations fonctionnelles de ces protéines, ainsi que de visualiser les variations d'un protéome donné, dans des conditions données, sur des cartes des voies métaboliques et des voies de signalisation dans lesquelles elles étaient impliquées. Nous avons pu déterminer les origines tissulaires des protéines, grâce à l'extraction d'informations de la base de données *neXtProt*. L'ensemble de ces algorithmes ont été implémentés sur notre plateforme Galaxy et peuvent être appliqués au traitement bioinformatique de données obtenues sur des échantillons d'espèces « exotiques ». Enfin, nous sommes actuellement en train de développer un algorithme dans le but d'interpréter les régulations induites par les phosphorylations, grâce à l'utilisation de la base de données *PhosphoSite Plus*.



Grâce à l'analyse par spectrométrie de masse d'échantillons d'ours brun, nous avons démontré des régulations du métabolisme énergétique (substrats lipidiques préférentiels bien que leur oxydation soit diminuée, maintien de la glycolyse) et de la réponse au stress oxydant (diminution du stress oxydant) dans le muscle squelettique, pouvant favoriser la préservation des protéines musculaires durant l'hibernation. Ainsi, l'augmentation de la concentration sérique de DHA (acide gras omega 3) en période d'hibernation pourrait être impliquée dans le maintien des muscles squelettiques grâce à des mécanismes qui ne sont pas encore déterminés. De plus, nous avons montré que des molécules actives dans le sérum d'ours brun hibernant sont capables de réguler la balance protéique de cellules musculaires humaines (diminution de la synthèse et de manière plus importante, diminution de la protéolyse), ce qui pourraient participer à la préservation du muscle squelettique face à l'hibernation. Afin d'identifier ces composés, des méthodes de décomplexification du sérum d'ours (fractionnement par SEC, digestion des protéines sériques, déplétion des protéines majoritaires) ont été développées. Nous avons également montré que les corps cétoniques sont capables de réguler la balance protéique musculaire. Identifier précisément les composés anti-protéolytiques du sérum d'ours hibernant permettrait d'ouvrir la voie à de nouvelles solutions thérapeutiques pour lutter contre l'atrophie musculaire humaine pour les personnes sédentaires, obèses, immobilisées ou même les astronautes.



*Crédits : Alexandre Monchartre*

## Perspectives

# Perspectives

## 1. Etude de la physiologie de l'ours brun hibernant par spectrométrie de masse

Au cours de ces travaux de thèse, des stratégies analytiques ont été développées pour l'analyse par spectrométrie de masse d'échantillons provenant d'un organisme exotique (génome non séquencé), l'ours brun. Dans un premier temps, l'intérêt a été porté sur l'analyse des régulations du protéome musculaire et du tissu adipeux afin d'explorer les changements dans le métabolisme des substrats énergétiques, de la balance protéique et du stress oxydant. Dans ce but, des outils bioinformatiques ont été optimisés pour accélérer l'interprétation biologique des larges jeux de données obtenus en protéomique et la faciliter pour des études sur des espèces exotiques.

### a. Identification et interprétation des effets des phosphorylations portées par des protéines musculaires

Afin d'affiner notre compréhension des régulations de l'activité des protéines musculaires, un protocole d'analyse du phosphoprotéome (i.e. ensemble des phosphorylations portées par les protéines) a été mise en place avec un enrichissement manuel en phosphopeptides. Cependant, l'acquisition récente d'un robot (BravoAssay, AbSciex) pourrait permettre un enrichissement facilité et très reproductible. Il sera donc nécessaire de comparer l'enrichissement manuel avec le protocole ici présenté, avec un enrichissement automatisé par ce robot.

Dans le cas de modèles « classiques » (i.e. humains ou murins), des bases de données spécialisées, comme PhosphoSite Plus [174], sont bien renseignées et permettent d'appréhender

les effets des sites de phosphorylations sur l'activité, la localisation ou la durée de demi-vie de la protéine. Afin de faire de même pour l'ours brun, il sera nécessaire de développer des solutions bio-informatiques permettant (i) d'identifier la protéine humaine homologue à la protéine d'ours, (ii) aligner les séquences protéiques pour mettre en exergue les sites de phosphorylations communs, et (iii) exporter les informations relatives aux sites de phosphorylations communs à partir d'une base de données spécialisées comme PhosphoSitePlus. De cette manière, il sera possible de mieux appréhender les possibles régulations induites par les phosphorylations sur les protéines musculaires d'ours brun (voir page 76 à 77).

#### b. Etudier les mitochondries pour explorer le métabolisme et la production de stress oxydant dans le muscle de l'ours hibernant

Dans nos données sur le protéome musculaire chez l'ours hibernant, les résultats suggéraient une utilisation limitée mais préférentielle des substrats lipidiques et un maintien de la glycolyse [183]. Par ailleurs, le stress oxydant musculaire semble limité en phase hibernante notamment grâce à une possible limitation de la production des espèces réactives de l'oxygène [239]. Les mitochondries sont des organelles cellulaires largement impliquées dans la régulation du métabolisme [240] et sont également une source majeure de stress oxydant [241]. Une diminution du nombre et/ou de l'activité des mitochondries dans le muscle de l'ours brun hibernant pourrait participer aux régulations que nous avons évoqué ci-dessus. Pour répondre à cette hypothèse, des mesures sur le nombre de mitochondries ainsi que sur leur activité entre la phase hibernante et la phase active de l'ours brun pourraient être réalisées. Par ailleurs, l'analyse par spectrométrie de masse serait également un outil de choix pour caractériser les régulations

du protéome mitochondrial à partir de mitochondries musculaires isolées et ainsi identifier des régulations spécifiques aux mitochondries musculaires en phase hibernante.

#### c. Quels sont mes mécanismes qui provoquent une inhibition du catabolisme protéique lors de l'hibernation ?

La diminution des taux de dégradation et de synthèse protéique musculaire [146] est un élément important de la préservation musculaire chez l'ours brun hibernant. D'après nos données obtenues sur le protéome musculaire par spectrométrie de masse, l'abondance des protéines des systèmes de dégradation et de synthèse (augmentation pour les protéines de dégradation et stabilité pour les protéines de synthèse) ne concorde pas avec la diminution des taux de dégradation et de synthèse. Il est donc nécessaire d'explorer davantage la régulation des systèmes de protéolyse.

Le système ubiquitine-protéasome est l'un des systèmes de dégradation des protéines, et obtenir des informations sur sa structure (abondance relative des sous-unités du protéasome entre l'état hibernant et l'état actif) et son activité, ou encore déterminer si ce système cible une population de protéines spécifique ou non (i.e. analyse de l'ubiquitinome) entre la phase hibernante et la phase active permettrait de déterminer par quels mécanismes le catabolisme de des protéines musculaires est diminué chez l'ours hibernant.

#### d. Les fibres musculaires et le métabolisme énergétique dans le muscle de l'ours hibernant

Dans le cas de l'atrophie musculaire, il est connu que la composition en fibre se modifie avec une augmentation de la proportion de fibres de type 2 (fibres glycolytiques) et une

diminution de la proportion de fibres de type 1 (fibres oxydatives) [242]. Chez l'ours brun hibernant, il a été montré que ce changement de proportions en type de fibres musculaires n'était pas systématiquement identifié selon le muscle squelettique étudié [144]. Dans nos données, nous avons constaté que l'abondance et l'activité des protéines musculaires étaient en accord avec une diminution de la consommation des substrats lipidiques et un maintien de la consommation des substrats glucidiques [183]. De ce fait, nous pouvons poser l'hypothèse que le nombre de fibres glycolytiques pourrait être plus important lors de l'hibernation, au détriment des fibres oxydatives. Une approche d'immunohistochimie, avec des marquages immunologiques ciblant des protéines spécifiques de chaque type de fibre musculaire (isoformes de myosines), permettrait de déterminer la proportion de chaque type de fibre dans le muscle de l'ours hibernant vs l'ours actif.

## 2. Capacités anti-protéolytiques du sérum d'ours brun hibernant

Nous avons démontré les capacités anti-protéolytiques du sérum d'ours brun hibernant (WBS) sur des cellules musculaires humaines [8]. Une première approche d'identification des composés actifs par recherche de candidat suggère que le beta-hydroxybutyrate (BOH) pourrait être l'un des composés actifs dans le WBS.

### a. Identification des composés actifs dans le sérum d'ours brun hibernant

Outre le BOH, d'autres molécules comme les acides aminés ou les acides gras omega 3 (tel que le DHA) pourraient être testées avec la même stratégie analytique. En parallèle, des méthodes de fractionnement du contenu sérique ont été développées (immunodéplétion des protéines majoritaires, fractionnement par SEC et digestion des protéines sériques par enzymes

immobilisées) afin de décomplexifier le contenu sérique et ainsi de faciliter l'identification des molécules anti-protéolytiques. Les fractions obtenues devront être testées prochainement sur des myotubes humains en culture. L'objectif sera de déterminer si une (ou des fractions) permet(tent) de reproduire tout ou partie des effets obtenus avec une incubation des myotubes humains avec du WBS natif. Le contenu protéique de la (des) fraction(s) active(s) devra être caractérisé, par exemple par spectrométrie masse. Ces fractions actives pourront également être à nouveau fractionnées pour faciliter l'identification des composés actifs qu'elles contiendraient.

Par ailleurs, nous avons montré le bénéfice à utiliser une banque de données protéiques issue de la base de données d'assemblage *RefSeq* (NCBI) [92]. En effet, contrairement à l'utilisation d'une banque de données de plusieurs espèces homologues, la banque de données *RefSeq* permet d'obtenir des séquences protéiques spécifiques de l'espèce étudiée et apporte une plus grande certitude sur les résultats d'identifications obtenus. Ce type de base de données sera à privilégier pour la suite du projet (voir page 71 à 75).

#### b. Transfert des stratégies d'épargne protéique de l'ours hibernant vers la thérapeutique humaine

Les fractions actives identifiées, ou le BOH, pourraient être utilisés pour traiter des cellules musculaires humaines et vérifier s'il est possible de prévenir, limiter ou encore reverser une atrophie induite. Pour ce faire, il faudra induire une atrophie musculaire chez les myotubes humains et traiter les cellules avant, durant l'induction de l'atrophie ou après le traitement à la dexaméthasone, par exemple.

A l'échelle de l'organisme, et après une identification plus fine des composés actifs, le même type de test pourra être appliqué sur des modèles murins avant ou après le développement d'une atrophie musculaire.

Lors des voyages spatiaux, induire chez les astronautes une condition physiologique proche de celle de l'ours hibernant pourrait participer à la préservation musculaire et pourrait permettre de limiter la perte musculaire induite par la microgravité. Lors de l'hibernation, la température corporelle de l'ours brun diminue pour atteindre une température moyenne de 32°C [142]. Dans la logique de reproduire les conditions physiologiques de l'hibernation, une diminution de la température de l'environnement permettrait d'abaisser la température des astronautes ce qui pourrait ralentir le métabolisme, participer à l'économie d'énergie et indirectement préserver les protéines musculaires. De plus, lors de la préparation à l'hibernation, l'ours augmente de manière importante sa masse grasseuse. Ainsi, durant les sept mois d'hibernation, il est en capacité de consommer des substrats lipidiques, libérés par le tissu adipeux, pour se fournir en énergie cellulaire, tout en économisant efficacement ses protéines. Sélectionner des astronautes, certes entraînés, mais disposant de réserves lipidiques non négligeables aiderait peut-être à limiter le développement de l'atrophie musculaire. Enfin, aux vues des résultats que nous avons obtenus sur le muscle de l'ours brun hibernant, la prise alimentaire de corps cétoniques, d'acides gras oméga 3 (comme le DHA) et d'antioxydants pourraient également participer à limiter la perte musculaire.





## Publication 4

Titre : “Proteomics analysis of femurs from mice embarked on board BION-M1 biosatellite reveals worsened decrease of B lymphopoiesis after one week of recovery on Earth”

Auteurs : Georg Tascher, Maude Gerbaix, Pauline Maes, **Blandine Chazarin**, Stéphanie Ghislin, Evgenia Antropova, Galina Vasslieva, Nassima Ouzren-Zarhloul, Guillemette Gauquelin-Koch, Laurence Vico, Jean-Pol Fripiat, Fabrice Bertile

DOI : 10.1096/fj.201801463R

Publié en : Mars 2019

## Analysis of femurs from mice embarked on board BION-M1 biosatellite reveals a decrease in immune cell development, including B cells, after 1 wk of recovery on Earth

Georg Tascher,<sup>\*,†,1</sup> Maude Gerbaix,<sup>\*,†,1</sup> Pauline Maes,<sup>\*</sup> Blandine Chazarin,<sup>\*,†</sup> Stéphanie Ghislin,<sup>§</sup> Evgenia Antropova,<sup>¶</sup> Galina Vassilieva,<sup>¶</sup> Nassima Ouzren-Zarhloul,<sup>§</sup> Guillemette Gauquelin-Koch,<sup>†</sup> Laurence Vico,<sup>‡</sup> Jean-Pol Frippiat,<sup>¶,1</sup> and Fabrice Bertile<sup>\*,1,2</sup>

<sup>\*</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), Unité Mixte de Recherche (UMR) 7178, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; <sup>†</sup>Centre National d'Etudes Spatiales (CNES), Paris, France; <sup>‡</sup>INSERM, Unité 1059 Sainbiose, Faculté de Médecine, Université de Lyon-Université Jean Monnet, Campus Santé Innovation, Saint-Étienne, France; <sup>§</sup>Equipe d'Accueil 7300, Stress Immunity Pathogens Laboratory, Faculty of Medicine, Lorraine University, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; and <sup>¶</sup>Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**ABSTRACT:** Bone loss and immune dysregulation are among the main adverse outcomes of spaceflight challenging astronaut's health and safety. However, consequences on B-cell development and responses are still under-investigated. To fill this gap, we used advanced proteomics analysis of femur bone and marrow to compare mice flown for 1 mo on board the BION-M1 biosatellite, followed or not by 1 wk of recovery on Earth, to control mice kept on Earth. Our data revealed an adverse effect on B lymphopoiesis 1 wk after landing. This phenomenon was associated with a 41% reduction of B cells in the spleen. These reductions may contribute to explain increased susceptibility to infection even if our data suggest that flown animals can mount a humoral immune response. Future studies should investigate the quality/efficiency of produced antibodies and whether longer missions worsen these immune alterations.—Tascher, G., Gerbaix, M., Maes, P., Chazarin, B., Ghislin, S., Antropova, E., Vassilieva, G., Ouzren-Zarhloul, N., Gauquelin-Koch, G., Vico, L., Frippiat, J.-P., Bertile, F. Analysis of femurs from mice embarked on board BION-M1 biosatellite reveals a decrease in immune cell development, including B cells, after 1 wk of recovery on Earth. *FASEB J.* 33, 000–000 (2019). www.fasebj.org

**KEY WORDS:** lymphopoiesis · bone · immunity · proteomics · gravity

Spaceflight exposes astronauts to adverse effects, including bone loss, muscle atrophy, and metabolic, cardiovascular, hematologic, and immunologic deregulations (1). In conjunction with limited clinical care, immune system alterations associated with spaceflight represent a risk to crewmembers during deep-space missions. Indeed, the first epidemiologic study based on medical data collected from 46 astronauts who spent 6 mo onboard the

International Space Station showed that 46% of them faced immunologic problems, infection being the second most frequent event (2). In the framework of the envisioned deep-space missions to Mars, the moon, or an asteroid that will require very long flights, the study of immune system responses to long-term spaceflight is therefore mandatory.

Until now, most studies addressed the effects of spaceflight on innate immunity and T-cell responses (3, 4), whereas humoral immunity and B-cell development have been less intensively investigated. Using the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* as an animal model, it was shown that spaceflight affects antibody production in response to antigen stimulation (5, 6). In addition, somatic hypermutation, which diversifies antibody binding sites to improve their affinity, was shown to occur in space following immunization but at a frequency 2 times lower than that seen on Earth (7). These data show that spaceflight quantitatively and qualitatively affects the amphibian humoral immune response. These results are likely transposable to mammals because the cardinal elements of the adaptive

**ABBREVIATIONS:** ACN, acetonitrile; HSC, hematopoietic stem cell; HU, hindlimb unloading; iRT, indexed retention time; LC, liquid chromatography; LFQ, label-free quantification; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; QC, quality control; SDS, sodium dodecyl sulfate

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Correspondence: Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) Unité Mixte de Recherche (UMR) 7178, Université de Strasbourg, 25 rue Bequerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, France. E-mail: fberville@unistra.fr

doi: 10.1096/fj.201801463R

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

immune system are shared by all gnathostomes (8–10). Furthermore, it was shown that *P. walshi* antibody isotypes have mammalian analogs (11).

Concerning lymphocyte development, it has been shown that T lymphopoiesis is sensitive to gravity changes. Indeed, reductions in CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocyte populations were reported when murine fetal thymuses were cultured under clinorotation used to simulate microgravity (12). Furthermore, hypergravity exposure during murine gestation strongly modified pups' T-cell receptor  $\beta$  repertoire created during T-cell maturation (13). Gravity changes during *P. walshi* development also affected the transcription of IgM heavy chains and of the lymphoid-determining transcription factor Ikaros, suggesting a modification in B lymphopoiesis (14). Hindlimb unloading (HU), a rodent ground-based model frequently used to simulate spaceflight conditions, confirmed this decrease in B lymphopoiesis and highlighted a major block at the pro-B- to pre-B-cell transition (5–10-fold decrease) (15). This observation was associated to changes in bone microarchitecture, which is not surprising because it is known that immune-competent lymphocytes are derived from hematopoietic stem cells (HSCs) that reside in the bone marrow within specialized niches made up of bone and vascular structures (e.g., bone-forming osteoblasts and bone-resorbing osteoclasts) (16), and that interactions between HSCs and bone marrow niches control the balance between quiescence, self-renewal, and differentiation of HSCs (17–19).

The objectives of this study were to determine whether extreme conditions encountered during a real spaceflight affect B-cell development. To reach that goal, advanced quantitative proteomics and various molecular and cellular technologies were used to decipher the responses of bone and marrow of mice embarked on board the Bion-M1 biosatellite during a 30 d spaceflight. We also examined the reversibility of the effects upon return to Earth's gravitational conditions. Our data revealed a decrease in the expression of several proteins involved in the development of immune cells, as well as 61 and 41% decreases in the quantity of B cells in the bone marrow and spleen, respectively, 1 wk after landing, thereby indicating a reduction in immune cell development, including B cells, at this stage.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethical statement

The Institutional Animal Care and Use Committee of the Moscow State University Institute of Mitoengineering (Protocol No. 35), the Biomedical Ethics Committee of the Institute for Biomedical Problems (IBMP), and the Russian Academy of Sciences (Protocol No. 319) approved the experimental design of the Bion-M1 project. All experimental procedures complied with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* [National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA].

Hypergravity exposure was carried out in accordance with the French Legislation and the Council Directive of the European Communities on the Protection of Animals Used for

Experimental and Other Scientific Purposes (2010/63/UE). Furthermore, the protocol was approved by the local ethics committee (Authorization 04827).

### Bion-M1 experiment: space conditions

Space conditions included a ~1.7 L cylindrical module habitat (3 mice/habitat, acclimatized during the 3 d before launch), and a paste food diet based on standard chow with water and a casein gelling agent. All mice were exposed to 12-h light/dark cycles with mean  $\pm$  SD temperatures of  $21.1 \pm 0.4^\circ\text{C}$  and  $21.3 \pm 0.8^\circ\text{C}$  for flown and ground control animals, respectively. During their recovery period, mice were housed in standard conditions with a standard chow diet.

### Bion-M1 experiment: animals and study design

C57BL/6 male mice (23 wk old) were launched on board the Bion-M1 biosatellite to be exposed to weightlessness during a 30 d spaceflight (~570 km orbit) (20). Proteomics analysis was performed on the right femur of 4 mice euthanized by cervical dislocation 13–16 h after landing (flight group), 4 mice euthanized after a 1-wk recovery period on Earth (recovery group), and 5 control mice retained on Earth under space housing and feeding conditions (ground control group). These femurs were dissected immediately after the mice were killed and were subsequently frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until proteome analysis was conducted. The right tibias of 4–6 other mice from each of these 3 groups were also dissected after the mice were killed, and were immediately flushed with Rosewell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium to collect bone marrow cells that were directly analyzed by flow cytometry. The same analysis was performed on the spleens of these mice.

### Hypergravity experiment: animals and study design

C57BL/6 male mice (8 wk old) with a mean body mass of 20 g were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA). Upon arrival, mice were acclimatized for 1 wk in groups of 4 in standard cages in a quiet room with constant temperature ( $22^\circ\text{C}$ ), 50% relative humidity, and 12-h light/dark cycles (dark period 8 PM–8 AM), and were provided with food and water *ad libitum*. Then, half of the cages were placed in the gondolas of the French Space Agency (CNES) large radius centrifuge for hypergravity exposure at 2 or 3 g ( $n = 12$  at 2 g;  $n = 8$  at 3 g), according to Guéguinou *et al.* (21). Mice were supplied with enough food and water for 3 wk, so that the centrifuge was operating continuously. Mice were left undisturbed during the 3 wk of chronic centrifugation. All environmental variables, except the gravity level, were the same as in standard housing. Half of the cages, containing control mice ( $n = 12$  for the control of the 2 g experiment;  $n = 8$  for the control of the 3 g experiment), were placed in the same gondolas in the same room than centrifuged mice, but in a static position. At the end of the 21 d of centrifugation, control and hypergravity mice were put to death by cervical dislocation, and the liver was collected and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until Western blotting analysis.

### Analysis of femur proteome from Bion-M1 mice

Sodium dodecyl sulfate (SDS) and acetonitrile (ACN) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). All other chemicals and reagents were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The femurs from flight ( $n = 4$ ),



recovery ( $n = 4$ ) and ground control ( $n = 5$ ) mice were analyzed individually. Frozen mid distal part of right femurs were weighed and ground using a ball mill ( $2 \times 30$  s at 25 Hz; MM400; Retsch, Haan, Germany) under liquid nitrogen and proteins were extracted using 10 volumes (*i.e.*, 10  $\mu$ l/mg of tissue) of extraction buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 2% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 2% DTT, 50 mM Tris pH 8.8, protease inhibitors). After solubilization for 30 min at 37°C, samples were centrifuged (5 min, 4°C, 15,000 g) to remove possible cell and tissue debris. After trichloroacetic acid precipitation of proteins overnight at 4°C followed by centrifugation (10 min, 4°C, 15,000 g), pelleted proteins were washed using cold acetone and resuspended in the extraction buffer without reducing agents or detergents. Protein concentration was then determined using a Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). At this stage, a sample pool comprising equal amounts of all protein extracts was made, to be repeatedly analyzed during the whole duration of nano liquid chromatography (LC)–tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments to allow quality control (QC)–related measurements. Reproducibility of protein electrophoretic profiles was checked for all protein extracts after diluting 30  $\mu$ g of proteins in Laemmli buffer (10 mM Tris pH 6.8, 1 mM EDTA, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 5% SDS, 10% glycerol, and bromophenol blue), denaturation at 95°C, and SDS–PAGE electrophoresis on 12% acrylamide gels.

Each protein extract (30  $\mu$ g) was mixed with 4 $\times$  concentrated SDS sample buffer (1 time: 50 mM Tris pH 6.8, 1 mM EDTA, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2.5% SDS and 10% glycerol), incubated at 95°C for 5 min and run for 15 min at 35 V into a 4% polyacrylamide stacking gel in order to let proteins enter ~12 mm into the gel. Electrophoresis was stopped at this point and gels were stained with colloidal Coomassie blue (Sigma Aldrich). Both the stacked protein band and the part of the gel above this band (separated into 3 slices) were excised, with the stacked band being afterwards divided into 4 pieces and the 3 slices into 8 pieces each before in-gel digestion using an automatic pipetting device (MassPrep; Waters, Milford, MA, USA). Following destaining, reduction (DTT), and alkylation (iodoacetamide), proteins were digested overnight at 37°C using trypsin (300 ng for the stacked band and 100 ng for slices coming from the upper part of the gel). Peptides were then extracted in 60% ACN and 0.1% formic acid in water for 1 h, then in 100% ACN for 10 min at 450 rpm on an orbital shaker, and the 3 peptide extracts coming from the upper part of the gel were subsequently pooled. At this stage, a set of reference peptides [Indexed Retention Time (iRT) Kit; Biognosys, Schlieren, Switzerland] was added to each sample to allow the stability of instrument performances to be measured for QC purposes. Just before LC–MS/MS analysis, the volume of peptide extracts was reduced in a speed-vac and sample volumes were adjusted to 60  $\mu$ l with 1% ACN and 0.1% formic acid in water.

Samples were analyzed on a nano ultra-performance LC system (nanoAcquity; Waters) coupled to a quadrupole–Orbitrap hybrid mass spectrometer (Q-Exactive plus; Thermo Fisher Scientific). Two microliters of each sample were concentrated/desalted on a trap column (Symmetry C18, 180  $\mu$ m  $\times$  20 mm, 5  $\mu$ m; Waters) using 99% of solvent A (0.1% formic acid in water) and 1% solvent B (0.1% formic acid in ACN) at a flow rate of 5  $\mu$ l/min for 3 min. Afterwards, peptides were transferred and eluted from the separation column (BEH130 C18, 250 mm  $\times$  75  $\mu$ m, 1.7  $\mu$ m; Waters) maintained at 60°C using a 150 min gradient from 1 to 40% of B. All samples were injected using a randomized and blocked injection sequence (1 biologic replicate of each group plus the pool in each block). To minimize carryover, a column wash (50% ACN for 20 min) was included between each block in addition to a solvent blank injection, which was performed after each sample.

The Q Exactive Plus instrument was operated in positive ion mode with source temperature set to 250°C and spray voltage set to 1.8 kV. Full scan MS spectra [mass-to-charge ratio ( $m/z$ )

300–1800] were acquired at a resolution of 140,000 at  $m/z$  200, a maximum injection time of 50 ms, and an automatic gain control target value of  $3 \times 10^6$  charges with the lock-mass option enabled ( $m/z$  445.12002). We isolated  $\leq 10$  of the most intense precursors per full scan using a  $m/z$  2 window and fragmented them using higher energy collisional dissociation (normalized collision energy of 27 eV). Dynamic exclusion of already-fragmented precursors was set to 60 s. MS/MS spectra were acquired with a resolution of 17,500 at  $m/z$  200, a maximum injection time of 100 ms, and an automatic gain control target value of  $1 \times 10^5$ . The system was fully controlled by XCalibur software (v. 3.0.63; Thermo Fisher Scientific).

MS raw data were processed using MaxQuant (v.1.5.3.30; Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany). Peak lists were created using default parameters and searched using the Andromeda search engine (revert mode) implemented in MaxQuant against a protein database created using the MSDBA software suite (22). The database contained mice protein sequences (Swiss-Prot; <https://www.uniprot.org/taxonomy/>; Taxonomy ID: 10090; 16,873 entries), which were downloaded in May 2017. Sequences of common contaminants like keratins and trypsin (247 entries) were finally added to the database (contaminants.fasta included in MaxQuant). The first search was performed using a precursor mass tolerance of 20 ppm and the main search with a tolerance of 4.5 ppm after recalibration. Fragment ion mass tolerance was set to 20 ppm. Carbamidomethylation of cysteine residues was considered as fixed and oxidation of methionine residues and acetylation of protein N termini as variable modifications during the search. A maximum number of 2 missed cleavages and a false discovery rate of 1% for both peptide spectrum matches (minimum length of 7 aa) and proteins was accepted during identification. Regarding quantification, data normalization and protein abundance estimation was performed using the label-free quantification (LFQ) option offered in MaxQuant (23) using a minimal ratio count of 1. “Match between runs” was enabled using a 3-min time window after retention time alignment. Both unmodified and modified (acetylation of protein N termini and oxidation of methionine residues) peptides were considered for quantification whereas shared peptides were excluded. All other MaxQuant parameters were set as default. Proteins identified with only 1 unique peptide were not considered for quantification. Only proteins with  $\geq 3$  of 4–5 valid values per group as well as the ones absent (*i.e.*, 0 valid values) in samples from a given group were kept for further analysis. Relative protein abundances (*i.e.*, normalized LFQ-values, see above) are expressed as means  $\pm$  SEM of 3–5 determinations per group (arbitrary units; values in the flight and recovery groups normalized to those in the ground control group, which were arbitrarily set to 1). The MS proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium *via* the Pride (24) partner repository with the dataset identifier PXD010114.

QC-related measurements showed that HPLC performance remained good and stable throughout the whole experiment, with a median coefficient of variation of 0.7% concerning retention times of all iRT peptides when considering all injections. The reproducibility of quantitative data was also satisfactory because we recorded low median coefficients of variation for the raw intensity of iRT peptides in all injections (13%) and for MaxQuant-derived LFQ values of all quantified proteins within each of the 3 experimental groups (18.6%) and in the sample pool of all samples injected repeatedly during the course of MS-based analyses (13%).

#### **Lymphocytes in the bone marrow and spleen of Bion-M1 mice**

Bone marrow was flushed from the right tibia of flight ( $n = 5$ ), recovery ( $n = 4$ ), and ground control ( $n = 6$ ) mice using 1 ml of complete RPMI-1640 medium. Spleens ( $n = 5$  for flight and



recovery mice and  $n = 6$  for ground control animals) were dissociated in the same medium. For immunophenotyping,  $10^5$  cells were incubated for 30 min at 4°C in the dark with fluorescence-labeled monoclonal antibodies (anti-CD19 PE; eBio 1D3), anti-CD3e FITC (145-2C11), anti-CD4 PE (GK1.5), anti-CD8a PerCy5.5 (53-6.7) purchased from Thermo Fisher Scientific and Mouse Seroblock FcR reagent (Bio-Rad). Then, erythrocytes were lysed using the OptiLyse C solution (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Labeled cells were washed twice with FACS buffer and resuspended in 500  $\mu$ l of 1% paraformaldehyde (in PBS + 0.1% sodium azide). A FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) was used to acquire  $\geq 10^4$  events per tube. Analysis was performed using the CellQuest software (Becton Dickinson). Data are presented as mean percentages  $\pm$  SEM of lymphocytes expressing relevant cell surface antigen markers.

#### Analysis of relative C3 levels in the liver of centrifuged mice

The livers of centrifuged ( $n = 11$  at 2 g;  $n = 7$  at 3 g) and control ( $n = 11$  for the control of the 2 g experiment;  $n = 7$  for the control of the 3 g experiment) mice were analyzed individually. Proteins were prepared by lysing a piece of mice liver in lysis buffer (15 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; and 1% Triton X-100). Total proteins (40  $\mu$ g) were heated at 95°C for 5 min, run on 8% SDS-PAGE gels and electrotransferred to PVDF membranes (GE Healthcare UK, Little Chalfont, United Kingdom). Membranes were incubated with antibodies against complement C3  $\alpha$ -chain (GTx101316; Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France), analyzed, stripped with stripping buffer (Thermo Fisher Scientific) and reprobed against  $\alpha$ -tubulin, used as a housekeeping protein for C3 level normalization (EP1332Y; Abcam, Cambridge, United Kingdom), and a horseradish peroxidase-conjugated rat anti-rabbit secondary antibody. Immunodetection was performed using Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific). Signals were visualized using chemiluminescence (FX7; Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) and analyzed using densitometry (ImageJ; NIH). Relative C3 level (normalized to  $\alpha$ -tubulin levels) is expressed as the mean  $\pm$  SEM of 7–11 determinations per group (arbitrary units; values in hypergravity groups normalized to those in the respective control groups, which were arbitrarily set to 1).

#### Bioinformatics analysis of proteomics data

Quantified proteins were functionally categorized on the basis of literature examination and their annotations in the Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <https://www.genome.jp/kegg/>), and HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC; <https://www.genenames.org/>) databases. We retrieved identifiers of human proteins homologous to the murine proteins quantified in the current study with Blast searches against Swiss-Prot-derived *Homo sapiens* protein sequences (TaxID 9606) using the FASTA program (v.36; <http://fasta.bioch.virginia.edu/>; only the best hits were retained). On the basis of these human protein identifiers, extraction of target tissue expression information from the neXtProt database (<https://www.nextprot.org/>) was performed using Sparkl requests provided by the neXtProt team (<https://sparql.nextprot.org/>).

#### Statistical analyses

Statistical analysis of proteomic quantitative data of individual mice was performed in the R software environment v. 3.4.0 (25). Abundance values obtained for the 13 mice (flight,  $n = 4$ ; recovery,  $n = 4$ ; ground control,  $n = 5$ ) were considered

individually; no sample combination was made. Normality of MaxQuant LFQ value distribution and homoscedasticity was checked using Shapiro-Wilk and Bartlett tests ( $P > 0.01$ ), respectively. Changes in protein abundances among mice groups were tested using 1-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test, including adjustment of  $P$  values according to the Holm-Bonferroni method. Significance was set to  $P < 0.05$ .

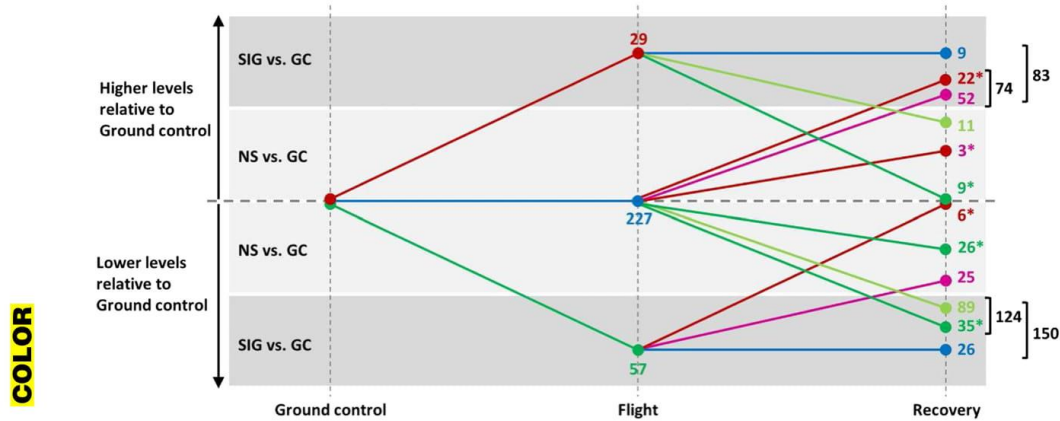
StatView software (SAS Institute, Cary, NC, USA) was used to perform statistical analyses of Western blot and flow cytometry data. Homogeneity of variance was determined using the Fisher test (2 groups) or Levene test (3 groups), and the normality of distribution was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. When homogenous variances and distributions were observed, we used a Student's *t* test (2 groups) or 1-way ANOVA (3 groups), followed by the Tukey-Kramer *post hoc* test. When the variance and distribution were not homogeneous, Mann-Whitney (2 groups) or Kruskal-Wallis (3 groups) nonparametric tests were performed. Significance was set to  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Overview of proteomics data

We robustly identified 3254 proteins, of which 3063 fulfilled the criteria (see the Materials and Methods) for MS1 intensity-based label-free quantification (Supplemental Table S1). Statistical analysis of individual mice data indicated that the abundance of 57 and 29 proteins was, respectively, significantly decreased and increased in flown *vs.* ground control mice (Fig. 1, see also Supplemental Tables S2, S3). When comparing the recovery group and the flight group, the abundance of 70 and 31 proteins was significantly lower and higher, respectively. Taking a closer look at the effects of the recovery period, we observed that abundance levels of 6 proteins down-regulated in the flight group were normalized in recovery animals. The restoration of abundance levels of 9 proteins up-regulated in flown mice was also observed in the recovery group. Additional changes in protein abundance were observed 1 wk after landing despite no change in flown mice compared with controls, with 26 down-regulated and 3 up-regulated proteins in recovery animals when compared with flight animals. Moreover, 150 and 83 proteins were significantly less and more abundant in recovery mice than in ground control mice, respectively. These proteins notably correspond to 26 proteins down-regulated in the flight condition and 9 proteins up-regulated in flown mice compared with ground control mice, the abundance of which was not restored after a week of recovery. The remaining 124 and 74 proteins correspond to proteins not significantly changed between flight and ground control conditions. The abundance levels of 35 and 22 of them were significantly lower and higher, respectively, in recovery mice compared with flight mice, thus indicating that these 57 proteins were specifically regulated during the week of recovery. In addition, of the proteins for which significance was not reached in flight *vs.* control and recovery *vs.* flight comparisons, 89 and 52 were down- and up-regulated, respectively, in recovery mice when compared with ground control mice.

Functional annotations (Nextprot) were available for 2425 of the 3063 quantified proteins (*i.e.*, 79%), of which 2331 were annotated as being detectable in the bone



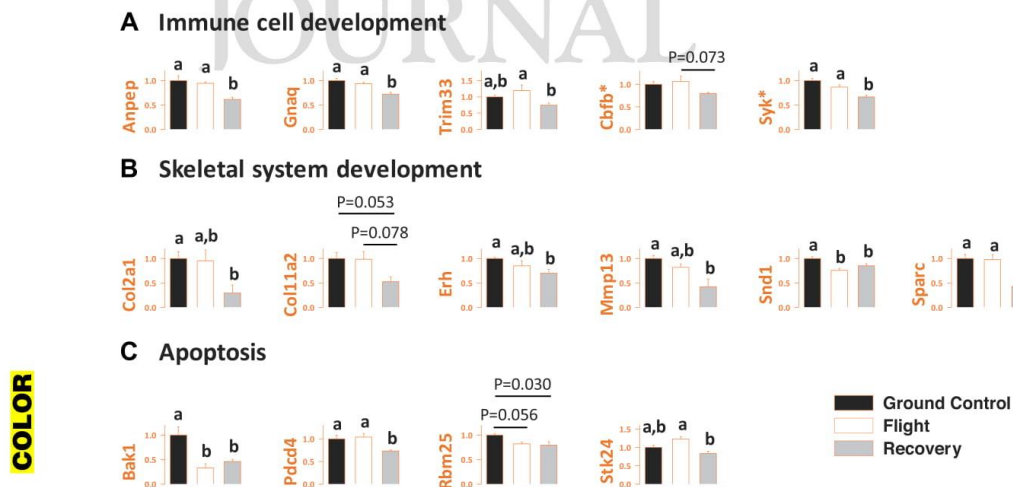
**Figure 1.** Expression profiles of differentially expressed proteins. From quantitative proteomics data, changes in the abundance of 284 differential proteins are schematized here into 10 different expression profiles (see Supplemental Table S1 for protein details). Numbers of proteins are given in the dark and bright gray boxes, which indicate significant (SIG,  $P < 0.05$ ) and nonsignificant (NS) changes in flight and recovery mice relative to ground control (GC) animals. \*Significance vs. flight,  $P < 0.05$ .

marrow and 94 in the bone only (see Supplemental Table S1). The proteome we analyzed is thus obviously mostly that of bone marrow, and that is why we hereafter discuss our results based on this assumption.

#### Proteins involved in the development of immune cells and skeletal system

Among differentially expressed proteins, several are known to be involved in the development of immune cells and skeletal system (Fig. 2). Interestingly, they followed very

similar regulations, with aminopeptidase N (Anpep), guanine nucleotide-binding protein G(q)- $\alpha$  (Gnaq), SPARC (or osteonectin), tyrosine-protein kinase SYK, and E3 ubiquitin-protein ligase Trim33 remaining unchanged after the 30 d flight compared with the control situation and then being 1.3–2.3-fold down-regulated after 1 wk of recovery postflight. In addition, the 1.3–3.2-fold decrease observed in recovery mice compared with flight mice in the abundances of core-binding factor  $\beta$  (Cbfb), collagen  $\alpha$ -1(II) chain (Col2a1), collagen  $\alpha$ -2(XI) chain (Col11a2), and collagenase 3 (Mmp13) was very close to significance.



**Figure 2.** Quantification of proteins involved in immune cell and skeletal system development, and in apoptosis using proteomics. From quantitative proteomics data, changes in the abundance (mean  $\pm$  SEM of 3–5 determinations/group) of 15 proteins known to be involved in immune cell development (A), skeletal system development (B), and apoptosis (C) were found to be significant ( $P < 0.05$  when bars do not share the same superior letter).  $P$  values are given when changes are close to significance (see Supplemental Table S1 for protein details). \*Proteins also involved in skeletal system development.



Finally, the levels of staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 (Snd1) were decreased 1.3-fold in flown mice and remained lowered in recovery animals, and those of enhancer of rudimentary homolog (Erh) were not significantly reduced by the flight and recovery period in a gradual manner, which resulted in a significant 1.4-fold decrease in recovery mice compared with ground control mice. Taken together, these data suggest that the development of immune cells could be reduced 1 wk after landing. To check this hypothesis, we determined the percentage of B cells in the bone marrow. B- and T-cell percentages were also determined in the spleen. As shown in Fig. 3, although the percentage of B cells was not affected at landing in bone marrow, a small but significant decrease was observed in the spleen. However, 1.8–2.5-fold reductions were observed in both tissues after 1 wk of recovery. The decrease in splenic B cells observed at that time point was compensated for by an increase in T cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>; Fig. 3).

### Proteins involved in apoptosis

Among differential proteins, we identified only 4 apoptosis-related factors (Fig. 2; see also Supplemental Table S1). The levels of Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak1) were significantly decreased (3-fold) in flown *vs.* control mice and were not restored after 1 wk of recovery. The

abundance of programmed cell death protein 4 (Pcd4) and serine/threonine-protein kinase 24 (Stk24) was not changed by the flight, but was significantly reduced (1.4-fold) in the recovery group compared with the flight group. Finally, we recorded a 1.2-fold decrease in the expression levels of RNA-binding protein 25 (Rbm25) in flown mice, which was close to but did not reach significance ( $P = 0.056$ ).

### Proteins involved in the coagulation and complement cascades

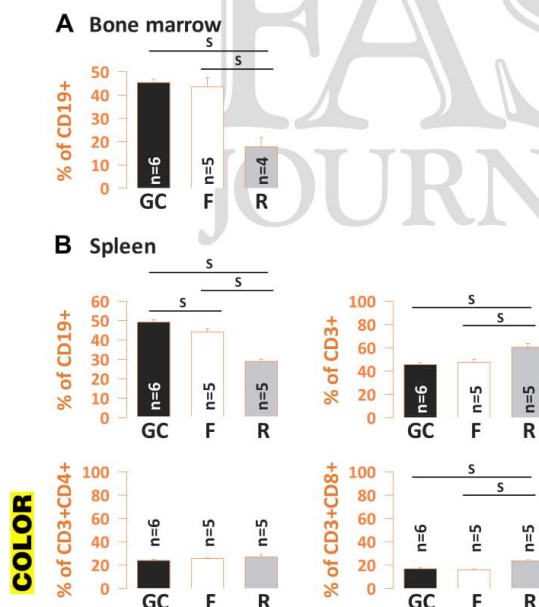
The abundance of 10 proteins of the coagulation cascade was found to be significantly changed in Bion-M1 mice, with essentially 2 different profiles (Fig. 4A). The levels of the first set of proteins, including coagulation factors X (F10), IX (F9), and VII (F7), as well as plasminogen (Plg), remained unchanged in flown *vs.* ground control mice, whereas they were decreased (1.6–2.1-fold) after the recovery period. The levels of the second set of proteins, including antithrombin-III (Serpinc1),  $\alpha$ -1-antitrypsin 1-2 (Serpina1b) and 1-4 (Serpina1d), and  $\alpha$ -2-antiplasmin (Serpinf2), were 1.3–1.4-fold higher in flight *vs.* ground control animals and were then restored by the recovery period. Finally, expression levels of  $\beta$ -2-glycoprotein 1 (ApoH) and vitamin K-dependent protein Z (Proz) tended to be increased 1.2–1.3-fold by the flight (nonsignificant), whereas they were decreased 1.6–2.1-fold during the recovery period.

We also observed changes in the abundance of 4 factors of the complement cascade (Fig. 4B). The levels of C1q subcomponent subunits A (C1qa) and B (C1qb) were significantly (1.6–2.2-fold) lower in flown *vs.* ground control mice; the levels of C1qa were then fully restored by the recovery period, while those of C1qb were only partially restored. Plasma protease C1 inhibitor (Serpin1) levels were unchanged by the flight but decreased 1.6-fold after 1 wk of recovery at 1 g. Finally, a 2-fold increase in complement C5 (C5) abundance was noted at landing; this change was not restored in recovery mice. Western blot experiments revealed a similar overexpression (1.4–1.8-fold increase) of complement C3 (C3) in mice subjected to increased g force during a 21 d period (Fig. 5), confirming that this cascade is sensitive to gravity changes.

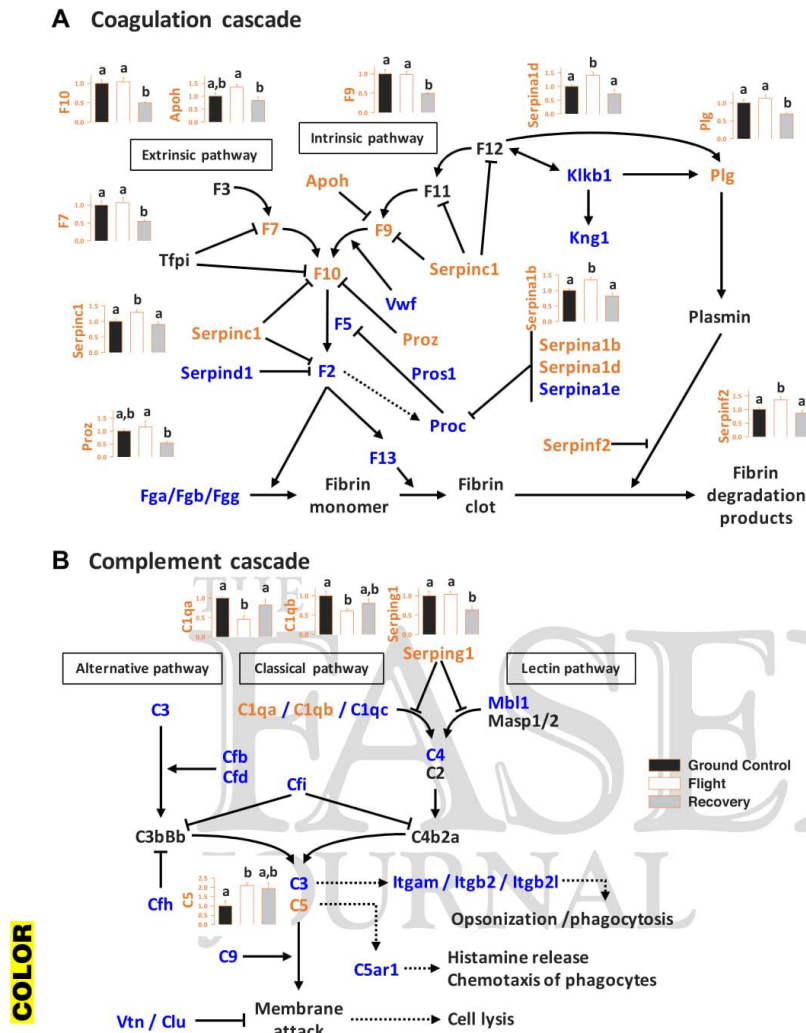
### Proteins involved in immune response

The abundance of several Ig peptides (Ig  $\kappa$  chain V-II region 7S34.1, Ig  $\kappa$  chain V-V region K2, Ig  $\kappa$  chain C region, and Ig  $\gamma$ -2A chain C region secreted form) was found to be increased (1.4–2.4 times) in flight *vs.* ground control mice, whereas it was restored in recovery animals (Fig. 6). We also observed that although the levels of Ig  $\gamma$ -2B chain C region were not affected by the flight, they were decreased 1.6-fold in recovery *vs.* flight mice (Fig. 6; see also Supplemental Table S1).

Changes in the abundance of other proteins involved in immune response were also recorded (Fig. 6). The levels of Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak1), probable ATP-dependent RNA helicase (DDX58), H-2 class I histocompatibility antigen (H2-D1 or H2-L), stomatin-like



**Figure 3.** Percentages of B lymphocytes in the bone marrow and of B and T cells in the spleen of Bion-M1 mice. Results obtained with bone marrow (A) and spleen (B) are shown as means  $\pm$  SEM. Statistically significant differences between groups, as revealed using an ANOVA test ( $P < 0.005$ , ANOVA) and the associated Tukey's *post hoc* test, are indicated by an "S." F, flight group; GC, ground control group; R, recovery group.



**Figure 4.** Quantification of proteins involved in the coagulation and complement cascades using proteomics. From quantitative proteomics data, changes in the abundance (mean  $\pm$  SEM of 3–5 determinations/group) of 14 proteins known to be involved in the coagulation (A) and complement (B) cascades were found to be significant ( $P < 0.05$  when bars do not share the same superior letter). Proteins that were detected but were not significantly changed are shown in blue, and those not detected are shown in black (see Supplemental Table S1 for protein details).

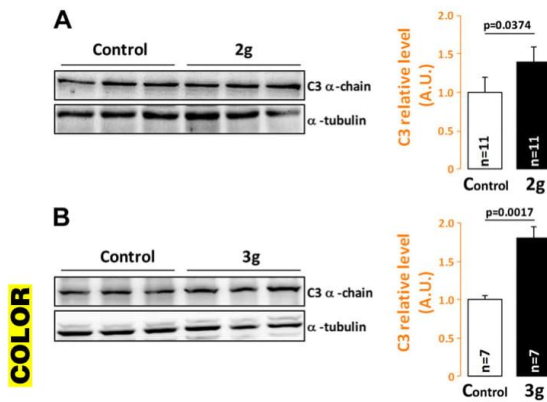
protein 2 (Stoml2), immunity-related GTPase family M protein 1 (Irgm1), and syntaxin-binding protein 2 (Stxbp2) dropped (1.3–3.0-fold) in flight *vs.* ground control mice and no or weak restoration was observed after the recovery period. The levels of Anpep, drebin-like protein (Dbnl1), exosome component 10 (Exosc10), Gnaq, nuclear factor NF- $\kappa$ B p105 subunit (Nfkb1), deoxynucleotide triphosphate triphosphohydrolase (Samhd1), signal transducer and transcription activator 6 (Stat6), tyrosine-protein kinase SYK, and tapasin (Tapbp) dropped (1.3–1.5-fold) only in recovery animals. The abundance of serine/threonine-protein kinase 10 (Stk10) and DNA mismatch repair protein (Msh2) was not significantly reduced by the flight and recovery period in a gradual manner, which resulted in significant 1.8- and 1.5-fold decreases in recovery compared with ground control

mice, respectively. Finally, expression levels of C-to-U-editing enzyme APOBEC-2 were increased 1.9-fold by the flight and remained at high levels after 1 wk of recovery, whereas those of UBX domain-containing protein 1 (Ubxn1) were increased only 1.6-fold in recovery animals.

#### Proteins involved in protein synthesis-related processes

A high number of the differential proteins found here are known to play a role in protein synthesis-related processes (Fig. 7 and Supplemental Table S1). Changes of few additional proteins that fall into this category were close to significance; they are not described or discussed here but can be seen in Supplemental Table S1.



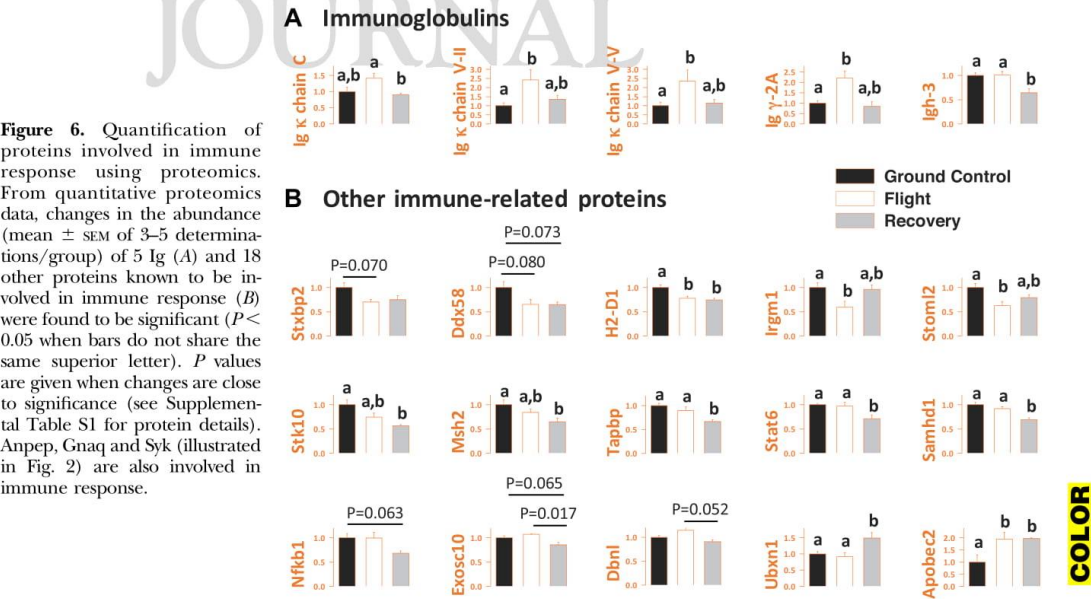


**Figure 5.** Quantification of complement C3  $\alpha$ -chain in the liver of mice exposed during a hypergravity of 2 (A) or 3 (B) g for 21 d. Complement C3 expression was studied using Western blot. Expression levels were normalized to  $\alpha$ -tubulin. Values obtained with control mice were set to 1. Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistically significant differences were revealed using an unpaired Student's *t* test (A) and a Mann–Whitney nonparametric test (B). A.U., arbitrary units.

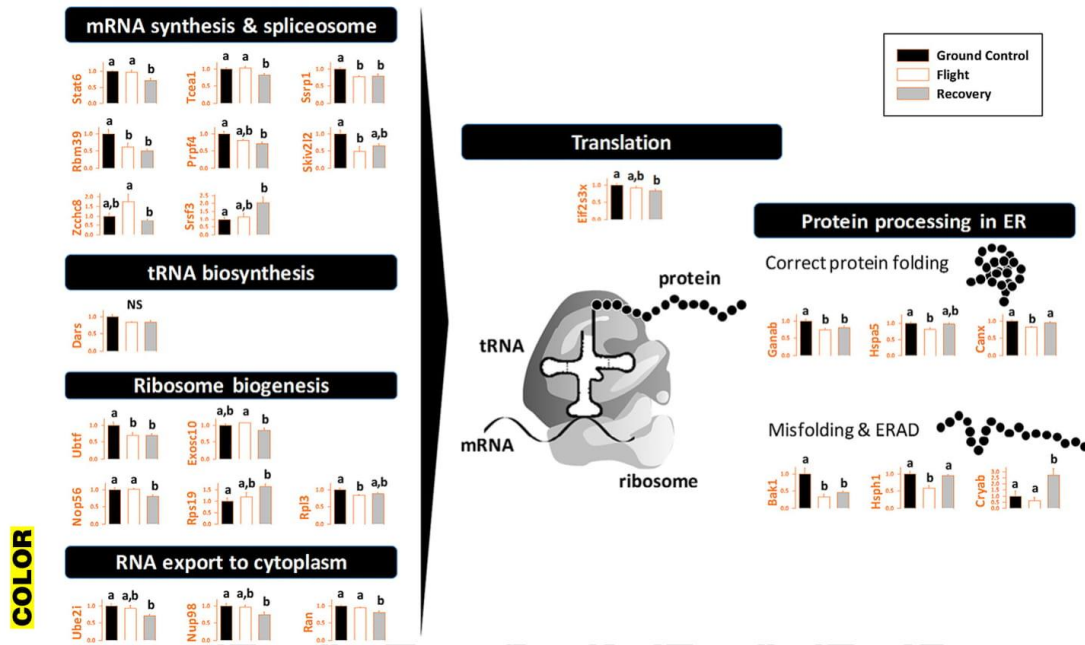
First, regarding mRNA synthesis and spliceosome, we observed a 1.3–1.4-fold down-regulation of Stat6 and transcription elongation factor A protein 1 (Tcea1) in recovery mice only. The levels of FACT complex subunit SSRP1, pre-mRNA splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15, pre-mRNA processing factor 19 (Prpf19), spliceosome RNA helicase Ddx39b, ATP-dependent RNA helicase DDX1, 116 kDa U5 small

nuclear RNP component (Eftud2), and RNA-binding proteins 25 (Rbm25) and 39 (Rbm39) were reduced (1.3–1.9-fold) in both flight and recovery mice *vs.* ground control animals. The down-regulation (1.3–1.8-fold) of U4/U6 small nuclear RNP (Prpf4), U5 small nuclear RNP 40 kDa protein (Snrnp40), small nuclear RNP F (Snrpf), serine/arginine-rich splicing factor 1 (Srsf1), nuclear cap-binding protein subunit 1 (Ncbp1), ATP-dependent RNA helicase DDX39A, and heterogeneous nuclear RNP U (Hnrnpu) and M (Hnrnmp) in flight and recovery mice *vs.* ground control animals was more gradual, reaching significance only after the recovery period. The 2-fold decrease in the levels of superkiller viralicidal activity 2-like 2 (Skiv2l2) in flown mice was only partially restored after 1 wk of recovery, contrary to the 1.8-fold increase in the levels of zinc finger CCHC domain-containing protein 8 (Zcch8), which fully recovered. In addition, serine/arginine-rich splicing factor 3 (Srsf3) levels were 2-fold higher in recovery than in control mice, and those of transcription factor BTF3 homolog 4 (Btf3l4) were 1.8-fold higher in both flight and recovery mice compared with control animals.

Regarding tRNA biosynthesis, the trend toward lower (1.2 times) levels of cytoplasmic aspartate-tRNA ligase (Dars) in flight and recovery *vs.* control mice was close to reaching significance ( $P = 0.06–0.07$ ). Among proteins involved in ribosome biogenesis, decreased levels ( $\leq 1.4$ -fold) of nucleolar protein 56 (Nop56), 60S ribosomal protein L15 (Rpl15), casein kinase II subunit  $\alpha$  (Csnk2a2), and exosome component 10 (Exosc10) were observed, especially in recovery mice. The 1.4-fold drop in the abundance of nucleolar transcription factor 1 (Ubt1) was significant both in flight and



**Figure 6.** Quantification of proteins involved in immune response using proteomics. From quantitative proteomics data, changes in the abundance (mean  $\pm$  SEM of 3–5 determinations/group) of 5 Ig (A) and 18 other proteins known to be involved in immune response (B) were found to be significant ( $P < 0.05$  when bars do not share the same superior letter). *P* values are given when changes are close to significance (see Supplemental Table S1 for protein details). Anpep, Gnaq and Syk (illustrated in Fig. 2) are also involved in immune response.



**Figure 7.** Quantification of proteins involved in protein synthesis-related processes using proteomics. From quantitative proteomics data, changes in the abundance (mean  $\pm$  SEM of 3–5 determinations/group) of 54 proteins known to be involved in protein synthesis-related processes were found to be significant ( $P < 0.05$  when bars do not share the same superscript letter). Only a few of these proteins are illustrated here to show the different expression profiles that were observed (see the main text and Supplemental Table S1 for details on all 54 proteins). ER, endoplasmic reticulum.

recovery mice *vs.* ground control animals, and the mild 1.2-fold reduction in 60S ribosomal protein L3 (Rpl3) levels in flown mice was partially restored at the end of the recovery period. Expression levels of 3 proteins only, namely 60S ribosomal protein L17 (Rpl17), 40S ribosomal protein S17 (Rps17) and S19 (Rps19), were increased ( $\leq 1.6$ -fold) in the recovery *vs.* control condition. Of the proteins involved in RNA export from the nucleus to the cytoplasm, the levels of GTP-binding nuclear protein Ran, SUMO-conjugating enzyme UBC9 (Ube2i), and nuclear pore complex protein Nup98-Nup96 (Nup98) were essentially reduced (1.2–1.4-fold) only after the recovery period.

Concerning factors involved in posttranscriptional events, we observed a significant 1.2-fold reduction in the level of eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, X-linked (Eif2s3x), in recovery compared with ground control mice. Main alterations were found with regard to factors involved in protein processing within the endoplasmic reticulum. Among folding proteins, the levels of neutral  $\alpha$ -glucosidase AB (Ganab), cytoskeleton-associated protein 4 (Ckap4), and dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit (Ddost) were similarly reduced (1.2–1.4-fold) in flight and recovery mice compared with control animals. The levels of calnexin (Canx), 78 kDa glucose-regulated protein (Hspa5), endoplasmic

(Hsp90b1), and vesicular integral-membrane protein VIP36 (Lman2) were also reduced (1.2–1.4-fold) by the flight but then were restored after the recovery period. Most of the factors that contribute to eliminating misfolded proteins, including Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak1), heat shock protein 105 kDa (Hsp11), heat shock cognate 71 kDa protein (Hspa8), and heat shock protein HSP 90- $\alpha$  (Hsp90aa1) and - $\beta$  (Hsp90ab1), were down-regulated by the flight ( $\leq 3$ -fold) with all of them except Bak1 being normalized to control values 1 wk postflight at 1 g. Finally, the abundance of  $\alpha$ -crystallin B chain (Cryab) was found to be increased (3–4-fold) in recovery *vs.* flight and ground control animals.

## DISCUSSION

Our proteomics studies suggested a reduction of immune cell development after 1 wk of recovery post-flight (Fig. 2), which was confirmed at the cellular level for B cells. Given that the expression of only 4 apoptosis-related factors was affected and that no increase in their expression was noted after the flight or recovery period, we do not believe that the decrease in the production of immune cells, including B cells, in the bone marrow is due to this process. Our flow



cytometry data also revealed a decrease in the percentage of B cells in the spleen after the recovery period and suggested the occurrence of an inflight infection.

In support of the reduction of immune cell development, it was previously shown that Bion-M1 flight induced a 64% reduction in femur trabecular volume of the same mice, which was not restored by the recovery period (26), and that their ankle bone volume loss is aggravated after 1 wk of reambulation on Earth (27). From our previous studies showing that 21 d of HU causes bone remodeling and a concomitant decrease in B lymphocyte maturation in the bone marrow of the same mouse strain (15), we expected that immune cell development would already be affected at landing because it has been established that spaceflight induces bone loss (28); however, this was not the case. This could be due to differences in bone alteration kinetics between HU and real spaceflight, or the age of animals because HU mice (15) were younger (3 mo) than Bion-M1 mice. Impaired B lymphopoiesis could also result from differences in the imbalance between bone formation and resorption because it has been shown that bone loss results from reduced bone formation during HU (29) and from increased osteoclastic resorption during spaceflight (26). Despite this remark, however, these 2 studies clearly demonstrate that spaceflight conditions have a negative effect on B lymphopoiesis. This conclusion, combined with studies having shown that myelopoiesis is reduced under spaceflight conditions (30–33) and data about T lymphopoiesis presented in the introduction of this manuscript, demonstrate that spaceflight negatively affects the development of most immune cells.

Our study also revealed a 41% reduction of B-cell content in the spleen. A 59% decrease in B cells was also observed in the spleens of HU mice (34). This stronger reduction could be due to the stronger or more rapid effect of HU in comparison to spaceflight, or to other assumptions made above. The lower number of B cells in the spleen could contribute, at least partially, to explaining the higher susceptibility to infection described in astronauts (2) and mice subjected to HU (35, 36).

Statistical analysis of proteomics data from individual mice highlighted changes in Ig abundances suggesting that an inflight infection may have induced the production of plasma cells secreting IgG2 containing  $\kappa$  light chains made from 2 different  $V_{\kappa}$  segments. Indeed, peptides Ig  $\kappa$  chain V-II region 7S34.1 and Ig  $\kappa$  chain V-V region K2 correspond to the IGKV2-137 and IGKV12-41 gene segments, respectively. This infection could perhaps result from injuries (bites or cuts) that occurred during this automatized mission as decreases in or normalizations of expression levels of 10 proteins from the coagulation cascade were noted 1 wk after landing. Whatever the origin of this infection, this observation confirms that a humoral immune response can be mounted in space, as previously shown in an amphibian species (5–7). We could not evaluate its quality, however, because the nature of the antigen (or

antigens) that induced this response is unknown. Recovery after landing indicates healing facilitated by normal housing conditions and readaptation to Earth gravity following deconditioning. We believe that this infection is unlikely to be responsible for changes in immune cells development at the end of the recovery period because the mobilization of these cells in response to infection should be followed by a new synthesis and therefore an increase in lymphopoiesis or myelopoiesis in the bone marrow.

Many other proteins involved in immune response were affected (Fig. 6), demonstrating that the negative effects of spaceflight on the immune system persist  $\geq 1$  wk after return to Earth. In the same way, changes in amphibian immune response were still observed 10 d after landing (5–7). Note, however, that this inhibition was not complete because mice and amphibians were still able to produce antibodies in response to an antigen challenge.

Besides, proteomics data revealed that changes in C5 levels, a major inflammation mediator, were not exclusively linked to the potential inflight infection. Indeed, we noted similar changes in C3 expression, another mediator of inflammation acting upstream of C5, in response to hypergravity. Taken together, these data suggest that hypergravity associated with landing modulates the expression of complement molecules and could explain why Baqai *et al.* (37) reported that exposure to a spaceflight environment can increase anti-inflammatory mechanisms in mice.

Finally, a high number of proteins known to play a role in protein synthesis-related processes, from mRNA synthesis to the processing of proteins in the endoplasmic reticulum, were expressed at reduced levels after the recovery. These data are in accordance with previous studies showing that immune cell signal transduction and transcription are disturbed by spaceflight conditions (38–40), and demonstrate that these processes require more than 1 wk to return to homeostasis.

In summary, this study demonstrates that spaceflight negatively affects B-cell development in the bone marrow. Combined with previous studies on T-cell maturation and myelopoiesis, it thus appears that spaceflight impairs the maturation of a vast array of immune cells. This reduction in B-cell production, coupled with the 41% reduction in splenic B-cell content, could help to explain higher susceptibility to infection despite the fact that a humoral immune response can still be mounted in space, because our data suggests a possible inflight infection. In addition, we noted that the effects of spaceflight persist for  $\geq 1$  wk after returning to Earth. In the future, it would be important to conduct kinetics studies to determine the time required for the immune system to fully recover. It would also be interesting to determine whether immune alterations are worsening as a function of mission duration and ensure that the quality of antibodies produced by mammals in response to an infection is not affected. Finally, this study illustrates the importance of considering connections between physiologic systems—here, the skeletal and immune systems. FJ

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French Space Agency (CNES), the French National Center for Scientific Research, Strasbourg University (H2E projEx; IdEx), the French Proteomic Infrastructure (ProFI; ANR-10-INSB-08-03), the French Ministry of Higher Education and Research, the Université de Lorraine, the Région Lorraine, and the Program of Fundamental Research (Theme 65.1) of the Institute for Biomedical Problems. Members of the Stress Immunity Pathogens Laboratory acknowledge support from the Impact Biomolecules Project of the Lorraine Université d'Excellence (Investissements d'Avenir—ANR 15-004). The authors are also grateful to the neXtProt team, who helped extract target tissue expression information. The authors declare no conflicts of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

G. Gauquelin-Koch, L. Vico, J.-P. Fripiat, and F. Bertile conceived the study; F. Bertile supervised proteomics analyses; G. Tascher, P. Maes, and B. Chazarin conducted MS-based analyses; M. Gerbaix critically assisted in data analysis; S. Ghislin and N. Ouzren-Zarhloul performed Western blot analyses; E. Antropova and G. Vasslieva performed flow cytometry analyses; J.-P. Fripiat and F. Bertile interpreted data and drafted the manuscript; and all authors made comments and gave final approval for publication.

## REFERENCES

- Vernikos, J. (1996) Human physiology in space. *BioEssays* **18**, 1029–1037
- Crucian, B., Babiak-Vazquez, A., Johnston, S., Pierson, D. L., Ott, C. M., and Sams, C. (2016) Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. *Int. J. Gen. Med.* **9**, 383–391
- Fripiat, J.-P., Crucian, B. E., de Quervain, D. J.-F., Grimm, D., Montano, N., Praun, S., Roozendaal, B., Schelling, G., Thiel, M., Ullrich, O., and Choukèr, A. (2016) Towards human exploration of space: The THESEUS review series on immunology research priorities. *NPJ Microgravity* **2**, 16040
- Guéguinou, N., Huin-Schohn, C., Bascove, M., Bueb, J. L., Tschirhart, E., Legrand-Frossi, C., and Fripiat, J. P. (2009) Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1027–1038
- Boxio, R., Dourmon, C., and Fripiat, J. P. (2005) Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J. Appl. Physiol.* **98**, 905–910
- Bascove, M., Huin-Schohn, C., Guéguinou, N., Tschirhart, E., and Fripiat, J. P. (2009) Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB J.* **23**, 1607–1615
- Bascove, M., Guéguinou, N., Schaeferling, B., Gauquelin-Koch, G., and Fripiat, J. P. (2011) Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB J.* **25**, 2947–2955
- Cooper, M. D., and Alder, M. N. (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124**, 815–822
- Fonte, C., Gruez, A., Ghislin, S., and Fripiat, J. P. (2015) The urodele amphibian *Pleurodeles waltl* has a diverse repertoire of immunoglobulin heavy chains with polyreactive and species-specific features. *Dev. Comp. Immunol.* **53**, 371–384
- Fripiat, J. P. (2013) Contribution of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* to the analysis of spaceflight-associated immune system deregulation. *Mol. Immunol.* **56**, 434–441
- Schaeferling, B., Bascove, M., and Fripiat, J. P. (2008) A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian

- Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae. *Mol. Immunol.* **45**, 776–786
- Woods, C. C., Banks, K. E., Gruener, R., and DeLuca, D. (2003) Loss of T cell precursors after spaceflight and exposure to vector-averaged gravity. *FASEB J.* **17**, 1526–1528
  - Ghislin, S., Ouzren-Zarhloul, N., Kaminski, S., and Fripiat, J. P. (2015) Hypergravity exposure during gestation modifies the TCR $\beta$  repertoire of newborn mice. *Sci. Rep.* **5**, 9318
  - Huin-Schohn, C., Guéguinou, N., Schenten, V., Bascove, M., Koch, G. G., Baatout, S., Tschirhart, E., and Fripiat, J. P. (2013) Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. *FASEB J.* **27**, 333–341
  - Lescale, C., Schenten, V., Djeghloul, D., Bennabi, M., Gagnier, F., Vandamme, K., Strazielle, C., Kuzniak, I., Petite, H., Dosquet, C., Fripiat, J. P., and Goodhardt, M. (2015) Hind limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging. *FASEB J.* **29**, 455–463
  - Mercier, F. E., Ragu, C., and Scadden, D. T. (2011) The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 49–60
  - Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F. R., Milner, L. A., Kronenberg, H. M., and Scadden, D. T. (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841–846
  - Wang, L. D., and Wagers, A. J. (2011) Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 643–655
  - Xie, Y., Yin, T., Wiegand, W., He, X. C., Miller, D., Stark, D., Perko, K., Alexander, R., Schwartz, J., Grindley, J. C., Park, J., Haug, J. S., Wunderlich, J. P., Li, H., Zhang, S., Johnson, T., Feldman, R. A., and Li, L. (2009) Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* **457**, 97–101
  - Andreev-Andrievskiy, A., Popova, A., Boyle, R., Alberts, J., Shinkman, B., Vinogradova, O., Dolgov, O., Anokhin, K., Tsvirkun, D., Soldatov, P., Nemirovskaya, T., Ilyin, E., and Sychev, V. (2014) Mice in Bion-M 1 space mission: training and selection. *PLoS One* **9**, e104830
  - Guéguinou, N., Bojados, M., Jamon, M., Derradji, H., Baatout, S., Tschirhart, E., Fripiat, J. P., and Legrand-Frossi, C. (2012) Stress response and humoral immune system alterations related to chronic hypergravity in mice. *Psychoneuroendocrinology* **37**, 137–147
  - Carapito, C., Burel, A., Guterl, P., Walter, A., Varrier, F., Bertile, F., and Van Dorsselaer, A. (2014) MSDA, a proteomics software suite for in-depth mass spectrometry data analysis using grid computing. *Proteomics* **14**, 1014–1019
  - Cox, J., Hein, M. Y., Lubner, C. A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014) Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 2513–2526
  - Vizcaino, J. A., Csordas, A., del-Toro, N., Dianas, J. A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T., Xu, Q. W., Wang, R., and Hermjakob, H. (2016) 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* **44**, D447–D456
  - R Development Core Team. (2008) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
  - Gerbaix, M., Gnyubkin, V., Farlay, D., Olivier, C., Ammann, P., Courbon, G., Laroche, N., Genthial, R., Follet, H., Peyrin, F., Shinkman, B., Gauquelin-Koch, G., and Vico, L. (2017) One-month spaceflight compromises the bone microstructure, tissue-level mechanical properties, osteocyte survival and lacunae volume in mature mice skeletons. *Sci. Rep.* **7**, 2659
  - Gerbaix, M., White, H., Courbon, G., Shinkman, B., Gauquelin-Koch, G., and Vico, L. (2018) Eight days of Earth reambulation worsen bone loss induced by 1-month spaceflight in the major weight-bearing ankle bones of mature mice. *Front. Physiol.* **9**, 746
  - Vico, L., and Hargens, A. (2018) Skeletal changes during and after spaceflight. *Nat. Rev. Rheumatol.* **14**, 229–245
  - Gerbaix, M., Vico, L., Ferrari, S. L., and Bonnet, N. (2015) Periostin expression contributes to cortical bone loss during unloading. *Bone* **71**, 94–100



30. Ichiki, A. T., Gibson, L. A., Jago, T. L., Strickland, K. M., Johnson, D. L., Lange, R. D., and Allebban, Z. (1996) Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 37–43
31. Ortega, M. T., Pecaut, M. J., Gridley, D. S., Stodieck, L. S., Ferguson, V., and Chapes, S. K. (2009) Shifts in bone marrow cell phenotypes caused by spaceflight. *J. Appl. Physiol.* (1985) **106**, 548–555
32. Sotnezova, E. V., Markina, E. A., Andreeva, E. R., and Buravkova, L. B. (2017) Myeloid precursors in the bone marrow of mice after a 30-day space mission on a Bion-M1 biosatellite. *Bull. Exp. Biol. Med.* **162**, 496–500
33. Vacek, A., Michurina, T. V., Serova, L. V., Rotkovská, D., and Bartonicková, A. (1991) Decrease in the number of progenitors of erythrocytes (BFUe, CFUe), granulocytes and macrophages (GM-CFC) in bone marrow of rats after a 14-day flight onboard the Cosmos-2044 Biosatellite. *Folia Biol. (Praha)* **37**, 35–41
34. Gaignier, F., Schenten, V., De Carvalho Bittencourt, M., Gauquelin-Koch, G., Fripiat, J. P., and Legrand-Frossi, C. (2014) Three weeks of murine hindlimb unloading induces shifts from B to T and from th to tc splenic lymphocytes in absence of stress and differentially reduces cell-specific mitogenic responses. *PLoS One* **9**, e92664
35. Aviles, H., Belay, T., Fountain, K., Vance, M., and Sonnenfeld, G. (2003) Increased susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infection under hindlimb-unloading conditions. *J. Appl. Physiol.* (1985) **95**, 73–80
36. Belay, T., Aviles, H., Vance, M., Fountain, K., and Sonnenfeld, G. (2002) Effects of the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions on resistance of mice to infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, 262–268
37. Baqai, F. P., Gridley, D. S., Slater, J. M., Luo-Owen, X., Stodieck, L. S., Ferguson, V., Chapes, S. K., and Pecaut, M. J. (2009) Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. *J. Appl. Physiol.* (1985) **106**, 1935–1942
38. Boonyaratanakornkit, J. B., Cogoli, A., Li, C. F., Schopper, T., Pippia, P., Galleri, G., Meloni, M. A., and Hughes-Fulford, M. (2005) Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *FASEB J.* **19**, 2020–2022
39. Chang, T. T., Walther, I., Li, C. F., Boonyaratanakornkit, J., Galleri, G., Meloni, M. A., Pippia, P., Cogoli, A., and Hughes-Fulford, M. (2012) The Rel/NF-κB pathway and transcription of immediate early genes in T cell activation are inhibited by microgravity. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 1133–1145
40. Thiel, C. S., Hauschild, S., Hüge, A., Tauber, S., Lauber, B. A., Polzer, J., Paulsen, K., Lier, H., Engelmann, F., Schmitz, B., Schütte, A., Leyer, L. E., and Ullrich, O. (2017) Dynamic gene expression response to altered gravity in human T cells. *Sci. Rep.* **7**, 5204

Received for publication July 16, 2018.  
Accepted for publication October 29, 2018.

# THE FASEB JOURNAL

## Références bibliographiques

## Références bibliographiques

1. Whitesides GM: **Bioinspiration: something for everyone**. *Interface Focus* 2015, **5**(4):20150031.
2. Bolker J: **Model organisms: There's more to life than rats and flies**. *Nature* 2012, **491**(7422):31-33.
3. Diz AP, Martinez-Fernandez M, Rolan-Alvarez E: **Proteomics in evolutionary ecology: linking the genotype with the phenotype**. *Mol Ecol* 2012, **21**(5):1060-1080.
4. Aebersold R, Mann M: **Mass spectrometry-based proteomics**. *Nature* 2003, **422**(6928):198-207.
5. Nilsson T, Mann M, Aebersold R, Yates JR, 3rd, Bairoch A, Bergeron JJ: **Mass spectrometry in high-throughput proteomics: ready for the big time**. *Nat Methods* 2010, **7**(9):681-685.
6. Stenvinkel P, Frobert O, Anderstam B, Palm F, Eriksson M, Bragfors-Helin AC, Qureshi AR, Larsson T, Friebe A, Zedrosser A *et al*: **Metabolic changes in summer active and anuric hibernating free-ranging brown bears (*Ursus arctos*)**. *PLoS One* 2013, **8**(9):e72934.
7. Berg von Linde M, Arevstrom L, Frobert O: **Insights from the Den: How Hibernating Bears May Help Us Understand and Treat Human Disease**. *Clin Transl Sci* 2015, **8**(5):601-605.
8. Chanon S, Chazarin B, Toubhans B, Durand C, Chery I, Robert M, Vieille-Marchiset A, Swenson JE, Zedrosser A, Evans AL *et al*: **Proteolysis inhibition by hibernating bear serum leads to increased protein content in human muscle cells**. *Sci Rep* 2018, **8**(1):5525.
9. Hartley H: **Origin of the word 'protein'**. *Nature* 1951, **168**(4267):244.
10. Unwin RD, Evans CA, Whetton AD: **Relative quantification in proteomics: new approaches for biochemistry**. *Trends Biochem Sci* 2006, **31**(8):473-484.
11. Kar UK, Simonian M, Whitelegge JP: **Integral membrane proteins: bottom-up, top-down and structural proteomics**. *Expert Rev Proteomics* 2017, **14**(8):715-723.
12. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR, 3rd: **Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics**. *Chem Rev* 2013, **113**(4):2343-2394.
13. Allison TM, Bechara C: **Structural mass spectrometry comes of age: new insight into protein structure, function and interactions**. *Biochem Soc Trans* 2019, **47**(1):317-327.
14. Sidoli S, Garcia BA: **Middle-down proteomics: a still unexploited resource for chromatin biology**. *Expert Rev Proteomics* 2017, **14**(7):617-626.



15. Peach M, Marsh N, Miskiewicz EI, MacPhee DJ: **Solubilization of proteins: the importance of lysis buffer choice.** *Methods Mol Biol* 2015, **1312**:49-60.
16. Fic E, Kedracka-Krok S, Jankowska U, Pirog A, Dziedzicka-Wasylewska M: **Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis.** *Electrophoresis* 2010, **31**(21):3573-3579.
17. Simpson DM, Beynon RJ: **Acetone precipitation of proteins and the modification of peptides.** *J Proteome Res* 2010, **9**(1):444-450.
18. Nejadi N. SMM, Mostafa Rezaei Tavirani, Taghi Golmohammadi: **Comparison of three routine protein precipitation methods: acetone, TCA/acetone wash and TCA/acetone.** *Journal of Paramedical Sciences (JPS)* 2014, **5**(4):58-60.
19. Chevallet M, Diemer H, Van Dorsselaer A, Villiers C, Rabilloud T: **Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome.** *Proteomics* 2007, **7**(11):1757-1770.
20. LeStourgeon WM, Beyer AL: **The rapid isolation, high-resolution electrophoretic characterization, and purification of nuclear proteins.** *Methods Cell Biol* 1977, **16**:387-406.
21. Li L: **Dynamic range compression with ProteoMiner: principles and examples.** *Methods Mol Biol* 2015, **1295**:99-107.
22. Anderson NL, Anderson NG: **The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects.** *Mol Cell Proteomics* 2002, **1**(11):845-867.
23. Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV, Jr.: **Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.** *Biochem Biophys Res Commun* 1967, **28**(5):815-820.
24. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**(5259):680-685.
25. Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M: **Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome.** *Genome Res* 2002, **12**(8):1231-1245.
26. Rabilloud T: **The whereabouts of 2D gels in quantitative proteomics.** *Methods Mol Biol* 2012, **893**:25-35.
27. Lu X, Zhu H: **Tube-gel digestion: a novel proteomic approach for high throughput analysis of membrane proteins.** *Mol Cell Proteomics* 2005, **4**(12):1948-1958.
28. Muller L, Fornecker L, Van Dorsselaer A, Cianferani S, Carapito C: **Benchmarking sample preparation/digestion protocols reveals tube-gel being a fast and repeatable method for quantitative proteomics.** *Proteomics* 2016, **16**(23):2953-2961.
29. Kumar N, Shahjaman M, Mollah MNH, Islam SMS, Hoque MA: **Serum and Plasma Metabolomic Biomarkers for Lung Cancer.** *Bioinformation* 2017, **13**(6):202-208.

30. Pernemalm M, Lehtio J: **Mass spectrometry-based plasma proteomics: state of the art and future outlook.** *Expert Rev Proteomics* 2014, **11**(4):431-448.
31. Bhosale SD, Moulder R, Kouvonen P, Lahesmaa R, Goodlett DR: **Mass Spectrometry-Based Serum Proteomics for Biomarker Discovery and Validation.** *Methods Mol Biol* 2017, **1619**:451-466.
32. Busher JT: **Serum Albumin and Globulin.** In: *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations.* Edited by rd, Walker HK, Hall WD, Hurst JW. Boston; 1990.
33. Fu Q, Garnham CP, Elliott ST, Bovenkamp DE, Van Eyk JE: **A robust, streamlined, and reproducible method for proteomic analysis of serum by delipidation, albumin and IgG depletion, and two-dimensional gel electrophoresis.** *Proteomics* 2005, **5**(10):2656-2664.
34. Polaskova V, Kapur A, Khan A, Molloy MP, Baker MS: **High-abundance protein depletion: comparison of methods for human plasma biomarker discovery.** *Electrophoresis* 2010, **31**(3):471-482.
35. Tan SH, Mohamedali A, Kapur A, Baker MS: **Ultradepletion of human plasma using chicken antibodies: a proof of concept study.** *J Proteome Res* 2013, **12**(6):2399-2413.
36. Boschetti E, Righetti PG: **The ProteoMiner in the proteomic arena: a non-depleting tool for discovering low-abundance species.** *J Proteomics* 2008, **71**(3):255-264.
37. Freije JR, Mulder PP, Werkman W, Rieux L, Niederlander HA, Verpoorte E, Bischoff R: **Chemically modified, immobilized trypsin reactor with improved digestion efficiency.** *J Proteome Res* 2005, **4**(5):1805-1813.
38. Brownridge P, Beynon RJ: **The importance of the digest: proteolysis and absolute quantification in proteomics.** *Methods* 2011, **54**(4):351-360.
39. Burkhardt JM, Schumbrutzki C, Wortelkamp S, Sickmann A, Zahedi RP: **Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics.** *J Proteomics* 2012, **75**(4):1454-1462.
40. Vandermarliere E, Mueller M, Martens L: **Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics.** *Mass Spectrom Rev* 2013, **32**(6):453-465.
41. Giansanti P, Tsiatsiani L, Low TY, Heck AJ: **Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin.** *Nat Protoc* 2016, **11**(5):993-1006.
42. Tsiatsiani L, Heck AJ: **Proteomics beyond trypsin.** *FEBS J* 2015, **282**(14):2612-2626.
43. Naldi M, Tramarin A, Bartolini M: **Immobilized enzyme-based analytical tools in the -omics era: Recent advances.** *J Pharm Biomed Anal* 2018, **160**:222-237.
44. Levene PA, Beatty WA: **On the Phosphotungstates of Certain Aminoacids.** *J Exp Med* 1906, **8**(3):463-466.

45. Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Lo Muzio L: **The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review).** *Int J Mol Med* 2017, **40**(2):271-280.
46. Hunter T: **Why nature chose phosphate to modify proteins.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012, **367**(1602):2513-2516.
47. Robles MS, Humphrey SJ, Mann M: **Phosphorylation Is a Central Mechanism for Circadian Control of Metabolism and Physiology.** *Cell Metab* 2017, **25**(1):118-127.
48. Ubersax JA, Ferrell JE, Jr.: **Mechanisms of specificity in protein phosphorylation.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(7):530-541.
49. Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR: **Analytical strategies for phosphoproteomics.** *Proteomics* 2009, **9**(6):1451-1468.
50. Reinders J, Sickmann A: **State-of-the-art in phosphoproteomics.** *Proteomics* 2005, **5**(16):4052-4061.
51. Salovska BT, A.; Fabrik, M.; Rezacova, M.: **Enrichment strategies for phosphoproteomics: State-of-the-art.** *Reviews in analytical chemistry* 2012:29-41.
52. Muszynska G, Dobrowolska G, Medin A, Ekman P, Porath JO: **Model studies on iron(III) ion affinity chromatography. II. Interaction of immobilized iron(III) ions with phosphorylated amino acids, peptides and proteins.** *J Chromatogr* 1992, **604**(1):19-28.
53. Watts JD, Affolter M, Krebs DL, Wange RL, Samelson LE, Aebersold R: **Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70.** *J Biol Chem* 1994, **269**(47):29520-29529.
54. Sano A, Nakamura H: **Titania as a chemo-affinity support for the column-switching HPLC analysis of phosphopeptides: application to the characterization of phosphorylation sites in proteins by combination with protease digestion and electrospray ionization mass spectrometry.** *Anal Sci* 2004, **20**(5):861-864.
55. Pinkse MW, Uitto PM, Hilhorst MJ, Ooms B, Heck AJ: **Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns.** *Anal Chem* 2004, **76**(14):3935-3943.
56. Negroni L, Claverol S, Rosenbaum J, Chevet E, Bonneau M, Schmitter JM: **Comparison of IMAC and MOAC for phosphopeptide enrichment by column chromatography.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012, **891-892**:109-112.
57. Bodenmiller B, Mueller LN, Mueller M, Domon B, Aebersold R: **Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome.** *Nat Methods* 2007, **4**(3):231-237.

58. Bergstrom Lind S, Molin M, Savitski MM, Emilsson L, Astrom J, Hedberg L, Adams C, Nielsen ML, Engstrom A, Elfineh L *et al*: **Immunoaffinity enrichments followed by mass spectrometric detection for studying global protein tyrosine phosphorylation.** *J Proteome Res* 2008, **7**(7):2897-2910.
59. Gao M, Qi D, Zhang P, Deng C, Zhang X: **Development of multidimensional liquid chromatography and application in proteomic analysis.** *Expert Rev Proteomics* 2010, **7**(5):665-678.
60. Capriotti AL, Cavaliere C, Cavazzini A, Gasparrini F, Pierri G, Piovesana S, Lagana A: **A multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry platform to improve protein identification in high-throughput shotgun proteomics.** *J Chromatogr A* 2017, **1498**:176-182.
61. Wang X, Stoll DR, Schellinger AP, Carr PW: **Peak capacity optimization of peptide separations in reversed-phase gradient elution chromatography: fixed column format.** *Anal Chem* 2006, **78**(10):3406-3416.
62. Fekete S, Beck A, Veuthey JL, Guilleme D: **Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates.** *J Pharm Biomed Anal* 2014, **101**:161-173.
63. Karas M, Hillenkamp F: **Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.** *Anal Chem* 1988, **60**(20):2299-2301.
64. Gessel MM, Norris JL, Caprioli RM: **MALDI imaging mass spectrometry: spatial molecular analysis to enable a new age of discovery.** *J Proteomics* 2014, **107**:71-82.
65. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM: **Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.** *Science* 1989, **246**(4926):64-71.
66. Miller PED, B. M.: **The Quadrupole Mass Filter: Basic Operating Concepts.** *Journal of Chemical Education* 1986, **63**(7):617-622.
67. Cotter RJ: **Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research.** *Journal of the American Chemical Society* 1997, **120**(17):4256-4257.
68. Cornish TJ, Cotter RJ: **High-order kinetic energy focusing in an end cap reflectron time-of-flight mass spectrometer.** *Anal Chem* 1997, **69**(22):4615-4618.
69. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R: **The Orbitrap: a new mass spectrometer.** *J Mass Spectrom* 2005, **40**(4):430-443.
70. Hardman M, Makarov AA: **Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source.** *Anal Chem* 2003, **75**(7):1699-1705.
71. Makarov A: **Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis.** *Anal Chem* 2000, **72**(6):1156-1162.

72. Eliuk S, Makarov A: **Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation**. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 2015, **8**:61-80.
73. Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA: **An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry**. *J Mass Spectrom* 2001, **36**(8):849-865.
74. Kurz EA: **Effects of high-current input pulses upon Channeltrons**. *Rev Sci Instrum* 1979, **50**(11):1492.
75. Audier MD, J. C.; Boutot, J. P.: **Multiplicateur à galette de microcanaux : amélioration des performances de gain et de dynamique de détection**. *Revue de Physique Appliquée* 1978, **13**(4):188-194.
76. Roepstorff P, Fohlman J: **Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides**. *Biomed Mass Spectrom* 1984, **11**(11):601.
77. Mitchell Wells JM, S. A. : **Collision-Induced Dissociation (CID) of Peptides and Proteins**. *METHODS IN ENZYMOLOGY* 2005, **402**(5):148-185.
78. McAlister GC, Phanstiel DH, Brumbaugh J, Westphall MS, Coon JJ: **Higher-energy collision-activated dissociation without a dedicated collision cell**. *Mol Cell Proteomics* 2011, **10**(5):O111 009456.
79. Zubarev RA, Horn DM, Fridriksson EK, Kelleher NL, Kruger NA, Lewis MA, Carpenter BK, McLafferty FW: **Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations**. *Anal Chem* 2000, **72**(3):563-573.
80. Syka JE, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF: **Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(26):9528-9533.
81. Miladinovic SM, Fornelli L, Lu Y, Piech KM, Girault HH, Tsybin YO: **In-spray supercharging of peptides and proteins in electrospray ionization mass spectrometry**. *Anal Chem* 2012, **84**(11):4647-4651.
82. Kjeldsen F, Giessing AM, Ingrell CR, Jensen ON: **Peptide sequencing and characterization of post-translational modifications by enhanced ion-charging and liquid chromatography electron-transfer dissociation tandem mass spectrometry**. *Anal Chem* 2007, **79**(24):9243-9252.
83. Venable JD, Dong MQ, Wohlschlegel J, Dillin A, Yates JR: **Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra**. *Nat Methods* 2004, **1**(1):39-45.
84. Picotti P, Aebersold R: **Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions**. *Nat Methods* 2012, **9**(6):555-566.
85. Gallien S, Duriez E, Crone C, Kellmann M, Moehring T, Domon B: **Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer**. *Mol Cell Proteomics* 2012, **11**(12):1709-1723.

86. Eng JK, McCormack AL, Yates JR: **An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database.** *J Am Soc Mass Spectrom* 1994, **5**(11):976-989.
87. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS: **Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.** *Electrophoresis* 1999, **20**(18):3551-3567.
88. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M: **Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment.** *J Proteome Res* 2011, **10**(4):1794-1805.
89. Chalkley RJ, Clauser KR: **Modification site localization scoring: strategies and performance.** *Mol Cell Proteomics* 2012, **11**(5):3-14.
90. Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, Martin MJ, Michoud K, O'Donovan C, Phan I *et al*: **The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(1):365-370.
91. Coordinators NR: **Database resources of the National Center for Biotechnology Information.** *Nucleic Acids Res* 2018, **46**(D1):D8-D13.
92. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D, McVeigh R, Rajput B, Robbertse B, Smith-White B, Ako-Adjei D *et al*: **Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation.** *Nucleic Acids Res* 2016, **44**(D1):D733-745.
93. Elias JE, Gygi SP: **Target-decoy search strategy for mass spectrometry-based proteomics.** *Methods Mol Biol* 2010, **604**:55-71.
94. Seidler J, Zinn N, Boehm ME, Lehmann WD: **De novo sequencing of peptides by MS/MS.** *Proteomics* 2010, **10**(4):634-649.
95. Carapito C, Burel A, Guterl P, Walter A, Varrier F, Bertile F, Van Dorsselaer A: **MSDA, a proteomics software suite for in-depth Mass Spectrometry Data Analysis using grid computing.** *Proteomics* 2014, **14**(9):1014-1019.
96. Frank A, Pevzner P: **PepNovo: de novo peptide sequencing via probabilistic network modeling.** *Anal Chem* 2005, **77**(4):964-973.
97. Shevchenko A, Sunyaev S, Loboda A, Shevchenko A, Bork P, Ens W, Standing KG: **Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching.** *Anal Chem* 2001, **73**(9):1917-1926.
98. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M: **Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.** *Mol Cell Proteomics* 2002, **1**(5):376-386.

99. Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, Kuster B: **Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present.** *Anal Bioanal Chem* 2012, **404**(4):939-965.
100. Meleady P: **Two-Dimensional Gel Electrophoresis and 2D-DIGE.** *Methods Mol Biol* 2018, **1664**:3-14.
101. Tannu NS, Hemby SE: **Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling.** *Nat Protoc* 2006, **1**(4):1732-1742.
102. Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, Lee A, van Sluyter SC, Haynes PA: **Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry.** *Proteomics* 2011, **11**(4):535-553.
103. Bubis JA, Levitsky LI, Ivanov MV, Tarasova IA, Gorshkov MV: **Comparative evaluation of label-free quantification methods for shotgun proteomics.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2017, **31**(7):606-612.
104. Tyanova S, Temu T, Cox J: **The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics.** *Nat Protoc* 2016, **11**(12):2301-2319.
105. Zhu W, Smith JW, Huang CM: **Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics.** *J Biomed Biotechnol* 2010, **2010**:840518.
106. Escher C, Reiter L, MacLean B, Ossola R, Herzog F, Chilton J, MacCoss MJ, Rinner O: **Using iRT, a normalized retention time for more targeted measurement of peptides.** *Proteomics* 2012, **12**(8):1111-1121.
107. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, Kern R, Tabb DL, Liebler DC, MacCoss MJ: **Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments.** *Bioinformatics* 2010, **26**(7):966-968.
108. Kohl HW, 3rd, Craig CL, Lambert EV, Inoue S, Alkandari JR, Leetongin G, Kahlmeier S, Lancet Physical Activity Series Working G: **The pandemic of physical inactivity: global action for public health.** *Lancet* 2012, **380**(9838):294-305.
109. Vandenburg H, Chromiak J, Shansky J, Del Tatto M, Lemaire J: **Space travel directly induces skeletal muscle atrophy.** *FASEB J* 1999, **13**(9):1031-1038.
110. Arentson-Lantz EJ, English KL, Paddon-Jones D, Fry CS: **Fourteen days of bed rest induces a decline in satellite cell content and robust atrophy of skeletal muscle fibers in middle-aged adults.** *J Appl Physiol (1985)* 2016, **120**(8):965-975.
111. Marzetti E, Calvani R, Tosato M, Cesari M, Di Bari M, Cherubini A, Collamati A, D'Angelo E, Pahor M, Bernabei R *et al*: **Sarcopenia: an overview.** *Aging Clin Exp Res* 2017, **29**(1):11-17.
112. Argiles JM, Busquets S, Stemmler B, Lopez-Soriano FJ: **Cancer cachexia: understanding the molecular basis.** *Nat Rev Cancer* 2014, **14**(11):754-762.



113. Echeverria P, Bonjoch A, Puig J, Estany C, Ornelas A, Clotet B, Negredo E: **High Prevalence of Sarcopenia in HIV-Infected Individuals.** *Biomed Res Int* 2018, **2018**:5074923.
114. Bonaldo P, Sandri M: **Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy.** *Dis Model Mech* 2013, **6**(1):25-39.
115. Clément G: **The musculo-skeletal system in space.** In: *Fundamentals of Space Medicine*. Edited by Library ST, vol. 23; 2011.
116. LeBlanc A, Schneider V, Shackelford L, West S, Oganov V, Bakulin A, Voronin L: **Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight.** *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2000, **1**(2):157-160.
117. Schmitt DA, Schaffar L, Taylor GR, Loftin KC, Schneider VS, Koebel A, Abbal M, Sonnenfeld G, Lewis DE, Reuben JR *et al*: **Use of bed rest and head-down tilt to simulate spaceflight-induce immune system changes.** *J Interferon Cytokine Res* 1996, **16**(2):151-157.
118. Schmitt DA, Schwarzenberg M, Tkaczuk J, Hebrard S, Brandenberger G, Mauco G, Cogoli-Greuter M, Abbal M: **Head-down tilt bed rest and immune responses.** *Pflugers Arch* 2000, **441**(2-3 Suppl):R79-84.
119. Vico L, Collet P, Guignandon A, Lafage-Proust MH, Thomas T, Rehaillia M, Alexandre C: **Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts.** *Lancet* 2000, **355**(9215):1607-1611.
120. Vico L, Hinsenkamp M, Jones D, Marie PJ, Zallone A, Cancedda R: **Osteobiology, strain, and microgravity. Part II: studies at the tissue level.** *Calcif Tissue Int* 2001, **68**(1):1-10.
121. Heer M, Paloski WH: **Space motion sickness: incidence, etiology, and countermeasures.** *Auton Neurosci* 2006, **129**(1-2):77-79.
122. Homick JL: **Space motion sickness.** *Acta Astronaut* 1979, **6**(10):1259-1272.
123. Vernikos J: **Human physiology in space.** *Bioessays* 1996, **18**(12):1029-1037.
124. Leach CS, Inners LD, Charles JB: **Changes in total body water during spaceflight.** *J Clin Pharmacol* 1991, **31**(10):1001-1006.
125. LeBlanc AD, Spector ER, Evans HJ, Sibonga JD: **Skeletal responses to space flight and the bed rest analog: a review.** *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007, **7**(1):33-47.
126. Stein TP: **Weight, muscle and bone loss during space flight: another perspective.** *Eur J Appl Physiol* 2013, **113**(9):2171-2181.
127. Adams GR, Caiozzo VJ, Baldwin KM: **Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models.** *J Appl Physiol (1985)* 2003, **95**(6):2185-2201.

128. Narici MV, de Boer MD: **Disuse of the musculo-skeletal system in space and on earth.** *Eur J Appl Physiol* 2011, **111**(3):403-420.
129. LeBlanc A, Lin C, Shackelford L, Sinitsyn V, Evans H, Belichenko O, Schenkman B, Kozlovskaya I, Oganov V, Bakulin A *et al*: **Muscle volume, MRI relaxation times (T2), and body composition after spaceflight.** *J Appl Physiol (1985)* 2000, **89**(6):2158-2164.
130. Rudwill F: **Conséquences d'une simulation d'impesanteur de 21 jours chez l'homme sur le métabolisme des lipides et effets d'une supplémentation en protéines testée comme contre mesure.**: Université de Strasbourg; 2015.
131. Savary-Auzeloux I, Magne H, Migne C, Oberli M, Breuille D, Faure M, Vidal K, Perrot M, Remond D, Combaret L *et al*: **A dietary supplementation with leucine and antioxidants is capable to accelerate muscle mass recovery after immobilization in adult rats.** *PLoS One* 2013, **8**(11):e81495.
132. Freiburger E, Sieber C, Pfeifer K: **Physical activity, exercise, and sarcopenia - future challenges.** *Wien Med Wochenschr* 2011, **161**(17-18):416-425.
133. Ferrando AA, Paddon-Jones D, Wolfe RR: **Alterations in protein metabolism during space flight and inactivity.** *Nutrition* 2002, **18**(10):837-841.
134. Ferrando AA, Paddon-Jones D, Hays NP, Kortebein P, Ronsen O, Williams RH, McComb A, Symons TB, Wolfe RR, Evans W: **EAA supplementation to increase nitrogen intake improves muscle function during bed rest in the elderly.** *Clin Nutr* 2010, **29**(1):18-23.
135. Carter JR, West JB: **Space physiology within an exercise physiology curriculum.** *Adv Physiol Educ* 2013, **37**(3):220-226.
136. Bamman MM, Clarke MS, Feeback DL, Talmadge RJ, Stevens BR, Lieberman SA, Greenisen MC: **Impact of resistance exercise during bed rest on skeletal muscle sarcopenia and myosin isoform distribution.** *J Appl Physiol (1985)* 1998, **84**(1):157-163.
137. Symons TB, Sheffield-Moore M, Chinkes DL, Ferrando AA, Paddon-Jones D: **Artificial gravity maintains skeletal muscle protein synthesis during 21 days of simulated microgravity.** *J Appl Physiol (1985)* 2009, **107**(1):34-38.
138. Williams D, Kuipers A, Mukai C, Thirsk R: **Acclimation during space flight: effects on human physiology.** *CMAJ* 2009, **180**(13):1317-1323.
139. Carey HV, Andrews MT, Martin SL: **Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature.** *Physiol Rev* 2003, **83**(4):1153-1181.
140. Ruf T, Geiser F: **Daily torpor and hibernation in birds and mammals.** *Biol Rev Camb Philos Soc* 2015, **90**(3):891-926.

141. Giroud S: **Différences saisonnières des mécanismes d'économie d'énergie d'un primate malgache hétérotherme : le microcèbe.** *Sciences du vivant*. Université Louis Pasteur Strasbourg; 2008.
142. Evans AL, Singh NJ, Friebe A, Arnemo JM, Laske TG, Frobert O, Swenson JE, Blanc S: **Drivers of hibernation in the brown bear.** *Front Zool* 2016, **13**:7.
143. Toien O, Blake J, Edgar DM, Grahn DA, Heller HC, Barnes BM: **Hibernation in black bears: independence of metabolic suppression from body temperature.** *Science* 2011, **331**(6019):906-909.
144. Tinker DB, Harlow HJ, Beck TD: **Protein use and muscle-fiber changes in free-ranging, hibernating black bears.** *Physiol Zool* 1998, **71**(4):414-424.
145. Harlow HJ, Lohuis T, Beck TD, Iaizzo PA: **Muscle strength in overwintering bears.** *Nature* 2001, **409**(6823):997.
146. Lohuis TD, Harlow HJ, Beck TD: **Hibernating black bears (*Ursus americanus*) experience skeletal muscle protein balance during winter anorexia.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2007, **147**(1):20-28.
147. Forreider B, Pozivilko D, Kawaji Q, Geng X, Ding Y: **Hibernation-like neuroprotection in stroke by attenuating brain metabolic dysfunction.** *Prog Neurobiol* 2017, **157**:174-187.
148. Dave KR, Prado R, Raval AP, Drew KL, Perez-Pinzon MA: **The arctic ground squirrel brain is resistant to injury from cardiac arrest during euthermia.** *Stroke* 2006, **37**(5):1261-1265.
149. Shores KS, Udugamasooriya DG, Kodadek T, Knapp DR: **Use of peptide analogue diversity library beads for increased depth of proteomic analysis: application to cerebrospinal fluid.** *J Proteome Res* 2008, **7**(5):1922-1931.
150. Thouvenot E, Urbach S, Dantec C, Poncet J, Seveno M, Demettré E, Jouin P, Touchon J, Bockaert J, Marin P: **Enhanced detection of CNS cell secretome in plasma protein-depleted cerebrospinal fluid.** *J Proteome Res* 2008, **7**(10):4409-4421.
151. Martin AI, Priego T, Lopez-Calderon A: **Hormones and Muscle Atrophy.** *Adv Exp Med Biol* 2018, **1088**:207-233.
152. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S: **Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function.** *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2015, **13**(1):17-24.
153. Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, Schneider M, Bansal P, Bridge AJ, Poux S, Bougueleret L, Xenarios I: **UniProtKB/Swiss-Prot, the Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to Use the Entry View.** *Methods Mol Biol* 2016, **1374**:23-54.

154. Berg JM TJ, Stryer L.: **Biochemistry. 5th edition**, vol. Section 7.1 - Homologs Are Descended from a Common Ancestor; 2002.
155. Lipman DJ, Pearson WR: **Rapid and sensitive protein similarity searches**. *Science* 1985, **227**(4693):1435-1441.
156. Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD *et al*: **The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019**. *Nucleic Acids Res* 2019, **47**(W1):W636-W641.
157. Pearson WR, Lipman DJ: **Improved tools for biological sequence comparison**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**(8):2444-2448.
158. Afgan E, Baker D, van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Cech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Eberhard C *et al*: **The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update**. *Nucleic Acids Res* 2016, **44**(W1):W3-W10.
159. Gene Ontology C: **Gene Ontology Consortium: going forward**. *Nucleic Acids Res* 2015, **43**(Database issue):D1049-1056.
160. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT *et al*: **Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium**. *Nat Genet* 2000, **25**(1):25-29.
161. Gaudet P, Skunca N, Hu JC, Dessimoz C: **Primer on the Gene Ontology**. *Methods Mol Biol* 2017, **1446**:25-37.
162. Hosack DA, Dennis G, Jr., Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA: **Identifying biological themes within lists of genes with EASE**. *Genome Biol* 2003, **4**(10):R70.
163. Kanehisa M, Goto S, Furumichi M, Tanabe M, Hirakawa M: **KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs**. *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(Database issue):D355-360.
164. Gaudet P, Argoud-Puy G, Cusin I, Duek P, Evalet O, Gateau A, Gleizes A, Pereira M, Zahn-Zabal M, Zwahlen C *et al*: **neXtProt: organizing protein knowledge in the context of human proteome projects**. *J Proteome Res* 2013, **12**(1):293-298.
165. Desiere F, Deutsch EW, King NL, Nesvizhskii AI, Mallick P, Eng J, Chen S, Eddes J, Loevenich SN, Aebersold R: **The PeptideAtlas project**. *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(Database issue):D655-658.
166. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, Zwahlen M, Kampf C, Wester K, Hober S *et al*: **Towards a knowledge-based Human Protein Atlas**. *Nat Biotechnol* 2010, **28**(12):1248-1250.
167. Tascher G, Gerbaix M, Maes P, Chazarin B, Ghislin S, Antropova E, Vassilieva G, Ouzren-Zarhloul N, Gauquelin-Koch G, Vico L *et al*: **Analysis of femurs from mice embarked on**

- board BION-M1 biosatellite reveals a decrease in immune cell development, including B cells, after 1 wk of recovery on Earth. *FASEB J* 2019, **33**(3):3772-3783.**
168. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR: **NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(Database issue):D501-504.**
  169. Terrien J, Gaudubois M, Champeval D, Zaninotto V, Roger L, Riou JF, Aujard F: **Metabolic and genomic adaptations to winter fattening in a primate species, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Int J Obes (Lond)* 2018, **42**(2):221-230.**
  170. Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI: **Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2017, **13**(10):572-587.**
  171. Amanchy R, Periaswamy B, Mathivanan S, Reddy R, Tattikota SG, Pandey A: **A curated compendium of phosphorylation motifs. *Nat Biotechnol* 2007, **25**(3):285-286.**
  172. Dinkel H, Chica C, Via A, Gould CM, Jensen LJ, Gibson TJ, Diella F: **Phospho.ELM: a database of phosphorylation sites--update 2011. *Nucleic Acids Res* 2011, **39**(Database issue):D261-267.**
  173. Gnad F, Gunawardena J, Mann M: **PHOSIDA 2011: the posttranslational modification database. *Nucleic Acids Res* 2011, **39**(Database issue):D253-260.**
  174. Hornbeck PV, Kornhauser JM, Tkachev S, Zhang B, Skrzypek E, Murray B, Latham V, Sullivan M: **PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res* 2012, **40**(Database issue):D261-270.**
  175. Miranda FF, Thorolfsson M, Teigen K, Sanchez-Ruiz JM, Martinez A: **Structural and stability effects of phosphorylation: Localized structural changes in phenylalanine hydroxylase. *Protein Sci* 2004, **13**(5):1219-1226.**
  176. Nishi H, Hashimoto K, Panchenko AR: **Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function. *Structure* 2011, **19**(12):1807-1815.**
  177. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994, **22**(22):4673-4680.**
  178. Ahlquist DAN, R.A.; Steiger, D.L.; Jones, J.D.; Ellefson, R.D.: **Glycerol metabolism in the hibernating black bear. *Journal of comparative physiology B* 1984, **155**:75-79.**
  179. Fedorov VB, Goropashnaya AV, Toien O, Stewart NC, Gracey AY, Chang C, Qin S, Perteau G, Quackenbush J, Showe LC *et al*: **Elevated expression of protein biosynthesis genes in liver and muscle of hibernating black bears (*Ursus americanus*). *Physiol Genomics* 2009, **37**(2):108-118.**

180. Shimozuru M, Nagashima A, Tanaka J, Tsubota T: **Seasonal changes in the expression of energy metabolism-related genes in white adipose tissue and skeletal muscle in female Japanese black bears.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2016, **196**:38-47.
181. Aebersold R, Mann M: **Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function.** *Nature* 2016, **537**(7620):347-355.
182. Zhang Z, Wu S, Stenoien DL, Pasa-Tolic L: **High-throughput proteomics.** *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 2014, **7**:427-454.
183. Chazarin B, Storey KB, Ziemianin A, Chanon S, Plumel M, Chery I, Durand C, Evans AL, Arnemo JM, Zedrosser A *et al*: **Metabolic reprogramming involving glycolysis in the hibernating brown bear skeletal muscle.** *Front Zool* 2019, **16**:12.
184. Shimozuru M, Kamine A, Tsubota T: **Changes in expression of hepatic genes involved in energy metabolism during hibernation in captive, adult, female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*).** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2012, **163**(2):254-261.
185. Deval C, Capel F, Laillet B, Polge C, Bechet D, Taillandier D, Attaix D, Combaret L: **Docosahexaenoic acid-supplementation prior to fasting prevents muscle atrophy in mice.** *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2016, **7**(5):587-603.
186. Kim J, Carlson ME, Kuchel GA, Newman JW, Watkins BA: **Dietary DHA reduces downstream endocannabinoid and inflammatory gene expression and epididymal fat mass while improving aspects of glucose use in muscle in C57BL/6J mice.** *Int J Obes (Lond)* 2016, **40**(1):129-137.
187. Powers SK, Morton AB, Ahn B, Smuder AJ: **Redox control of skeletal muscle atrophy.** *Free Radic Biol Med* 2016, **98**:208-217.
188. Havel PJ: **Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin.** *Curr Opin Lipidol* 2002, **13**(1):51-59.
189. Qiao L, Kinney B, Schaack J, Shao J: **Adiponectin inhibits lipolysis in mouse adipocytes.** *Diabetes* 2011, **60**(5):1519-1527.
190. Lee BS, J.: **Adiponectin and lipid metabolism in skeletal muscle.** *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2012, **2**(4):335-340.
191. Krause MP, Milne KJ, Hawke TJ: **Adiponectin-Consideration for its Role in Skeletal Muscle Health.** *Int J Mol Sci* 2019, **20**(7).
192. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K *et al*: **Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **257**(1):79-83.

193. Swenson JE, Adamic M, Huber D, Stokke S: **Brown bear body mass and growth in northern and southern Europe.** *Oecologia* 2007, **153**(1):37-47.
194. Manchi SS, J.E.: **Denning behaviour of Scandinavian brown bears *Ursus arctos*.** *Wildlife biology* 2005, **11**:123-132.
195. Feizollahzadeh S, Rasuli J, Kheirouri S, Alizadeh M: **Augmented plasma adiponectin after prolonged fasting during ramadan in men.** *Health Promot Perspect* 2014, **4**(1):77-81.
196. Wei Q, Lee JH, Wang H, Bongmba OYN, Wu CS, Pradhan G, Sun Z, Chew L, Bajaj M, Chan L *et al*: **Adiponectin is required for maintaining normal body temperature in a cold environment.** *BMC Physiol* 2017, **17**(1):8.
197. Ziemke F, Mantzoros CS: **Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research.** *Am J Clin Nutr* 2010, **91**(1):258S-261S.
198. Rigano KS, Gehring JL, Evans Hutzenbiler BD, Chen AV, Nelson OL, Vella CA, Robbins CT, Jansen HT: **Life in the fat lane: seasonal regulation of insulin sensitivity, food intake, and adipose biology in brown bears.** *J Comp Physiol B* 2017, **187**(4):649-676.
199. Hill ME: **Seasonal Changes in White Adipose Tissue in American Black Bears (*Ursus americanus*).** University of Tennessee; 2013.
200. Fortin T, Salvador A, Charrier JP, Lenz C, Lacoux X, Morla A, Choquet-Kastylevsky G, Lemoine J: **Clinical quantitation of prostate-specific antigen biomarker in the low nanogram/milliliter range by conventional bore liquid chromatography-tandem mass spectrometry (multiple reaction monitoring) coupling and correlation with ELISA tests.** *Mol Cell Proteomics* 2009, **8**(5):1006-1015.
201. Le MT, Hamar P, Guo C, Basar E, Perdigao-Henriques R, Balaj L, Lieberman J: **miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis.** *J Clin Invest* 2014, **124**(12):5109-5128.
202. Hudson MB, Woodworth-Hobbs ME, Zheng B, Rahnert JA, Blount MA, Gooch JL, Searles CD, Price SR: **miR-23a is decreased during muscle atrophy by a mechanism that includes calcineurin signaling and exosome-mediated export.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2014, **306**(6):C551-558.
203. Hudson MB, Rahnert JA, Zheng B, Woodworth-Hobbs ME, Franch HA, Price SR: **miR-182 attenuates atrophy-related gene expression by targeting FoxO3 in skeletal muscle.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2014, **307**(4):C314-319.
204. An M, Wu J, Zhu J, Lubman DM: **Comparison of an Optimized Ultracentrifugation Method versus Size-Exclusion Chromatography for Isolation of Exosomes from Human Serum.** *J Proteome Res* 2018, **17**(10):3599-3605.



205. Takov K, Yellon DM, Davidson SM: **Comparison of small extracellular vesicles isolated from plasma by ultracentrifugation or size-exclusion chromatography: yield, purity and functional potential.** *J Extracell Vesicles* 2019, **8**(1):1560809.
206. Mermelekas G, Zoidakis J: **Mass spectrometry-based membrane proteomics in cancer biomarker discovery.** *Expert Rev Mol Diagn* 2014, **14**(5):549-563.
207. Hu S, Loo JA, Wong DT: **Human body fluid proteome analysis.** *Proteomics* 2006, **6**(23):6326-6353.
208. Angilletta MJ, Jr., Youngblood JP, Neel LK, VandenBrooks JM: **The neuroscience of adaptive thermoregulation.** *Neurosci Lett* 2019, **692**:127-136.
209. Zhou F, Zhu X, Castellani RJ, Stimmelmayer R, Perry G, Smith MA, Drew KL: **Hibernation, a model of neuroprotection.** *Am J Pathol* 2001, **158**(6):2145-2151.
210. Kondo N, Kondo J: **Identification of novel blood proteins specific for mammalian hibernation.** *J Biol Chem* 1992, **267**(1):473-478.
211. Kondo N, Sekijima T, Kondo J, Takamatsu N, Tohya K, Ohtsu T: **Circannual control of hibernation by HP complex in the brain.** *Cell* 2006, **125**(1):161-172.
212. Hasselgren PO: **Ubiquitination, phosphorylation, and acetylation--triple threat in muscle wasting.** *J Cell Physiol* 2007, **213**(3):679-689.
213. Gannon J, Staunton L, O'Connell K, Doran P, Ohlendieck K: **Phosphoproteomic analysis of aged skeletal muscle.** *Int J Mol Med* 2008, **22**(1):33-42.
214. Zarei M, Sprenger A, Metzger F, Gretzmeier C, Dengjel J: **Comparison of ERLIC-TiO<sub>2</sub>, HILIC-TiO<sub>2</sub>, and SCX-TiO<sub>2</sub> for global phosphoproteomics approaches.** *J Proteome Res* 2011, **10**(8):3474-3483.
215. Wu SWL: **Human Breast Cancer Cell Line Phosphoproteome Revealed by an Automated and Highly Selective Enrichment Workflow.** *Application Note, Agilent* 2018:1-10.
216. Lin DC, Hershey JD, Mattoon JS, Robbins CT: **Skeletal muscles of hibernating brown bears are unusually resistant to effects of denervation.** *J Exp Biol* 2012, **215**(Pt 12):2081-2087.
217. Fuster G, Busquets S, Almendro V, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM: **Antiproteolytic effects of plasma from hibernating bears: a new approach for muscle wasting therapy?** *Clin Nutr* 2007, **26**(5):658-661.
218. Cham BE, Knowles BR: **A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation.** *J Lipid Res* 1976, **17**(2):176-181.
219. Vazquez R, Larson DF: **Plasma protein denaturation with graded heat exposure.** *Perfusion* 2013, **28**(6):557-559.

220. Owen OE, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GF, Jr.: **Brain metabolism during fasting.** *J Clin Invest* 1967, **46**(10):1589-1595.
221. **How ketones spare protein in starvation.** *Nutr Rev* 1989, **47**(3):80-81.
222. Thompson JR, Wu G: **The effect of ketone bodies on nitrogen metabolism in skeletal muscle.** *Comp Biochem Physiol B* 1991, **100**(2):209-216.
223. Sherwin RS: **The effect of ketone bodies and dietary carbohydrate intake on protein metabolism.** *Acta Chir Scand Suppl* 1981, **507**:30-40.
224. Newman JC, Verdin E: **beta-hydroxybutyrate: much more than a metabolite.** *Diabetes Res Clin Pract* 2014, **106**(2):173-181.
225. Parker BA, Walton CM, Carr ST, Andrus JL, Cheung ECK, Duplisea MJ, Wilson EK, Draney C, Lathen DR, Kenner KB *et al*: **beta-Hydroxybutyrate Elicits Favorable Mitochondrial Changes in Skeletal Muscle.** *Int J Mol Sci* 2018, **19**(8).
226. Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H: **Proteinase K from Tritirachium album Limber.** *Eur J Biochem* 1974, **47**(1):91-97.
227. Gold AM: **Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. 3. Identification of Serine as the Site of Sulfonylation in Phenylmethanesulfonyl Alpha-Chymotrypsin.** *Biochemistry* 1965, **4**:897-901.
228. James GT: **Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers.** *Anal Biochem* 1978, **86**(2):574-579.
229. Zolotarjova N, Martosella J, Nicol G, Bailey J, Boyes BE, Barrett WC: **Differences among techniques for high-abundant protein depletion.** *Proteomics* 2005, **5**(13):3304-3313.
230. Hao Y: **A simple method for the preparation of human serum albumin.** *Vox Sang* 1979, **36**(5):313-320.
231. Easterday RL, Easterday IM: **Affinity chromatography of kinases and dehydrogenases on Sephadex and Sepharose dye derivatives.** *Adv Exp Med Biol* 1974, **42**(0):123-133.
232. Biotech AP: **Affinity Chromatography:** Edition AC; 2001.
233. Whiteaker JR, Zhao L, Zhang HY, Feng LC, Piening BD, Anderson L, Paulovich AG: **Antibody-based enrichment of peptides on magnetic beads for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers.** *Anal Biochem* 2007, **362**(1):44-54.
234. Greening DW, Simpson RJ: **A centrifugal ultrafiltration strategy for isolating the low-molecular weight (<or=25K) component of human plasma proteome.** *J Proteomics* 2010, **73**(3):637-648.
235. Greening DW, Simpson RJ: **Low-molecular weight plasma proteome analysis using centrifugal ultrafiltration.** *Methods Mol Biol* 2011, **728**:109-124.

236. Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD: **Characterization of the low molecular weight human serum proteome.** *Mol Cell Proteomics* 2003, **2**(10):1096-1103.
237. Zheng X, Baker H, Hancock WS: **Analysis of the low molecular weight serum peptidome using ultrafiltration and a hybrid ion trap-Fourier transform mass spectrometer.** *J Chromatogr A* 2006, **1120**(1-2):173-184.
238. Georgiou HM, Rice GE, Baker MS: **Proteomic analysis of human plasma: failure of centrifugal ultrafiltration to remove albumin and other high molecular weight proteins.** *Proteomics* 2001, **1**(12):1503-1506.
239. Chazarin B, Ziemianin A, Evans AL, Meugnier E, Loizon E, Chery I, Arnemo JM, Swenson JE, Gauquelin-Koch G, Simon C *et al*: **Limited Oxidative Stress Favors Resistance to Skeletal Muscle Atrophy in Hibernating Brown Bears (Ursus Arctos).** *Antioxidants (Basel)* 2019, **8**(9).
240. Nazaret C, Heiske M, Thurley K, Mazat JP: **Mitochondrial energetic metabolism: a simplified model of TCA cycle with ATP production.** *J Theor Biol* 2009, **258**(3):455-464.
241. Brand MD: **Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling.** *Free Radic Biol Med* 2016, **100**:14-31.
242. Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S: **Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting.** *Int J Biochem Cell Biol* 2013, **45**(10):2191-2199.





## Blandine CHAZARIN

Développements en protéomique pour mieux comprendre la physiologie de l'ours brun hibernant et ouvrir la voie vers de nouvelles thérapies contre l'atrophie musculaire humaine

### Résumé

Appliquer les stratégies d'analyse protéomique à des échantillons d'organismes « exotiques » requiert des développements, que nous avons réalisés pour étudier les mécanismes d'épargne protéique chez l'ours brun hibernant. La complémentarité des approches protéomiques (SDS PaGE-XIC, 2D-DIGE-MS, LC-SRM-MS) et des développements bioinformatiques (e.g. utilisation de données d'assemblage du génome, extraction d'annotations fonctionnelles [*Gene Ontology*, *neXtProt*, *KEGG*]) ont montré que la beta-oxydation est préférentielle dans le muscle, la glycolyse étant maintenue. Les niveaux élevés en acides gras omega 3, le stress oxydant diminué, et l'existence de composés anti-protéolytiques dans le sérum des ours hibernants contribuent à l'épargne des muscles. Pour identifier ces composés, nous avons développé le fractionnement du sérum d'ours (chromatographie, protéolyse, déplétion des protéines majoritaires) et montré que les corps cétoniques pourraient être impliqués. Ces résultats suggèrent de nouvelles solutions thérapeutiques contre l'atrophie musculaire des personnes immobilisées, âgées ou encore des astronautes.

**Mots clefs** : protéomique quantitative, spectrométrie de masse, ours brun, hibernation, développements bioinformatiques

### Abstract

To analyze samples from "exotic" organisms using proteomics, analytical developments are required. Our developments were made to study protein saving mechanisms in hibernating brown bears. The complementarity of proteomics approaches (SDS PaGE-XIC, 2D-DIGE-MS, LC-SRM-MS) and bioinformatics developments (e.g. use of genome assembly data, extraction of functional annotations [*Gene Ontology*, *neXtProt*, *KEGG*]) have led to show that muscle beta-oxidation is preferential, glycolysis being maintained. High levels of omega 3 fatty acids, decreased oxidative stress, and the existence of anti-proteolytic compounds in the serum of hibernating bears contribute to muscle sparing. To identify these compounds, we developed fractionation of the bear serum (chromatography, proteolysis, high abundance protein depletion) and showed that ketone bodies could be involved. These results suggest new therapeutic solutions against muscle atrophy in immobilized people, the elderly or astronauts.

**Keywords**: quantitative proteomics, mass spectrometry, brown bear, hibernation, bioinformatic developments