

# **Nouvelles méthodes d'imagerie des éléments traces en électrophorèse sur gel pour la spéciation multimodale des complexes métal-protéine**

Ryszard Lobinski<sup>1</sup>, Richard Ortega<sup>2</sup>, R. Grimaud<sup>3</sup>

<sup>1</sup>CNRS/UPPA, Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement, UMR5254, Hélioparc, 2, av. pr. Angot, 64053 Pau

<sup>2</sup>CNRS/Université Bordeaux 1, Laboratoire de Chimie Nucléaire Analytique Bio-environnementale, UMR 5084, Gradignan

<sup>3</sup>UPPA/CNRS, Equipe d'Ecologie Moléculaire, UMR 5254, av. de l'Université, 64012 Pau

## **Enjeux et problématique, état de l'art**

La spéciation des contaminants inorganiques est indispensable pour élucider les mécanismes contrôlant la toxicité des expositions chroniques à faibles doses. Le manque de méthodes analytiques adaptées est particulièrement flagrant pour l'étude des interactions des métaux à l'état de traces et d'ultratraces avec les protéines des systèmes vivants exposés aux contaminants.

L'introduction de radio-isotopes a été utilisée depuis longtemps pour visualiser les métalloprotéines dans les gels d'électrophorèse par l'autoradiographie. Une méthode d'analyse émergente permettant de s'affranchir de l'utilisation d'isotopes radioactifs est basée sur l'ablation de gel à des endroits souhaités par un faisceau laser et l'introduction de la matière ablatée en temps réel dans le plasma ICP MS. Il en résulte l'obtention d'un signal spécifique des hétéroéléments présents et qui est d'autant plus une fonction linéaire de leur concentration. Grâce à ce signal une protéine peut être quantifiée par calibration externe, idéalement en mélangeant l'aérosol du gel avec de l'aérosol contenant un isotope différent de l'élément déterminé. Le laser peut soit être dirigé vers un spot particulier (ex. pour la vérification de la présence d'un hétéroélément et/ou quantification de la protéine), soit balayer la piste d'un gel permettant ainsi d'obtenir un électrophérogramme 1D et détecter et quantifier les protéines inconnues. Cependant deux problèmes majeurs étaient clairement identifiés au moment du démarrage du projet. Il s'agit, d'un côté d'une faible quantité de gel ablaté en une unité de temps ce qui empêchait la détection sensible, et, de l'autre côté, de l'impossibilité d'analyse des gels non-colorés où les endroits de l'occurrence des métalloprotéines étaient inconnus.

Un autre problème est l'identification des métalloprotéines dans les gels. Le signal obtenu en ablation laser n'est pas spécifique de la protéine, et l'approche de protéomique permettant l'identification de la protéine après son extraction du gel et digestion trypsique ne tient pas compte de stoechiométrie et d'environnement de coordination du métal, le complexe métal-protéine n'ayant pas été préservé. D'où l'intérêt dans des techniques nouvelles, permettant l'analyse in situ de la coordination du métal dans le complexe métal-protéine, comme par exemple la spectrométrie d'absorption de rayons-X, dans les parties EXAFS et XANES du spectre.

Un problème à part est la séparation de métalloprotéines par électrophorèse sur gel, les méthodes conventionnelles étant basées sur la dénaturation des protéines et donc étant inadaptées aux séparations des métalloprotéines.

Le projet se proposait d'adresser tous ces problèmes par un consortium interdisciplinaire réunissant des spécialistes en biochimie de protéines, spectrométrie atomique et spectrométrie des rayons X.

## Matériel et méthodes

*Conditions d'électrophorèse non-dénaturante.* Mise en place des protocoles originaux de séparation des métalloprotéines sur gels polyacrylamide mono et bi-dimensionnels en conditions non-dénaturantes, sans modifier la liaison protéine-métal. Pour éviter la contamination des échantillons, notamment aux étapes de détection des protéines par coloration, nous avons mené nos analyses sur des gels non colorés. Le conditionnement des échantillons a été étudié en vue d'être compatible avec la préservation des degrés d'oxydation pour l'analyse XAS.

*Analyses LA-ICP-MS.* Un dispositif d'ablation laser Cetac-200 (laser Nd-YAG à 266 nm) équipé d'une chambre d'ablation et couplé soit à un spectromètre de masse quadripolaire (Agilent 7500) ou à secteurs (ELEMENT 2) a été utilisé.

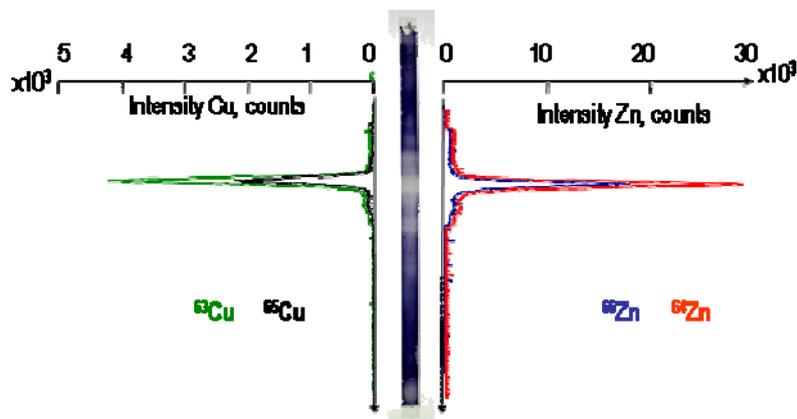
*Analyses fsLA-ICP MS.* Un dispositif d'ablation laser (Alfamet Novalase, France) intégrant une source laser femtoseconde (S-pulse, Amplitude) à 1030 nm à haute cadence de tir (10 kHz) avec une durée d'impulsion de 360 fs a été utilisé. L'énergie fournie est de 10  $\mu$ J par pulse. Un système de focalisation et de régulation de la puissance du faisceau laser ainsi qu'une chambre d'ablation ont été utilisés. Un arrangement optique utilisant un balayage galvanométrique permettait de déplacer le faisceau laser extrêmement rapidement (28 cm/s) dans le plan horizontal de l'échantillon avec une très grande précision de repositionnement (1  $\mu$ m environ).

*Analyses XANES et EXAFS.* Quatre campagnes de mesures ont été réalisées à l'ESRF sur les lignes ID26 et BM30b (FAME, CRG française à l'ESRF). Les premières expériences sur la ligne ID26 ont permis la spectroscopie XANES sur les isoformes de point isoélectrique (pI) de la superoxyde dismutase (SOD) humaine. Les spectroscopies XANES et EXAFS ont ensuite été mises en œuvre avec des limites de détection très basses (10  $\mu$ g/g) sur la ligne BM30b. Ces analyses ont requis une collaboration étroite avec le personnel de ces lignes pour définir l'environnement de l'échantillon (port échantillon cryogénique adapté) et les conditions d'électrophorèse compatibles en quantité de protéine avec les analyses.

## Résultats

### *La détection des métaux dans des gels 1D par ablation laser – ICP MS*

L'ablation laser – ICP MS a été mise au point pour la détection des isotopes du cuivre et du zinc dans la superoxyde dismutase après la focalisation isoélectrique (Fig. 1). La méthode se prouve pour l'analyse des protéines modèles mais a montré également la sensibilité insuffisante pour l'analyse des échantillons réels.

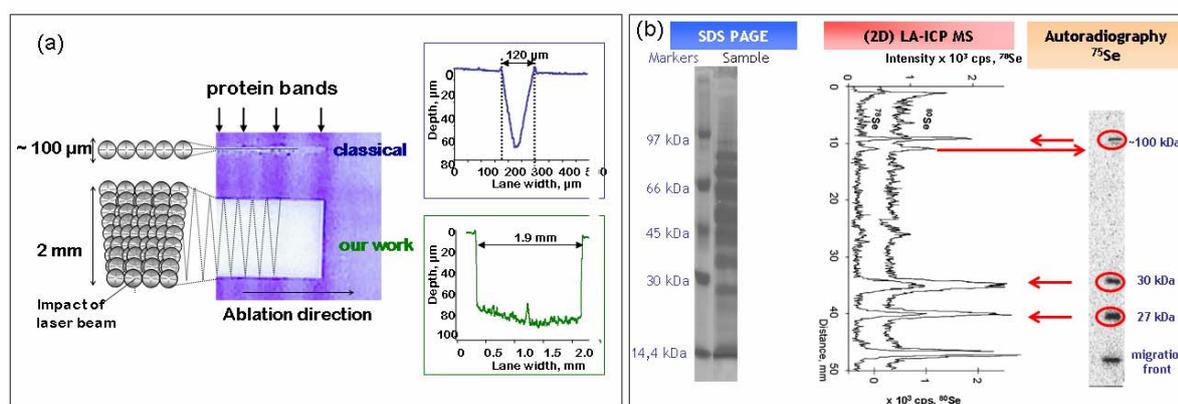


**Fig. 1.** Détection des isotopes du cuivre et du zinc dans la superoxyde dismutase après la focalisation isoélectrique par l'ablation laser ICP MS

## L'augmentation de la sensibilité de l'ablation laser ICP MS pour la détection de protéines séparées par l'électrophorèse sur gel

Le problème du manque de sensibilité dans ablation laser –ICP MS conventionnel a été résolu par un concept original et innovant dont le principe a été présenté dans la **Fig. 1b**. En effet, un laser typiquement utilisé (213 ou 266 nm à impulsion nanoseconde) permet d'ablater un trait de 100  $\mu\text{m}$  de largeur environ et donc une quantité de matière relativement faible. L'approche développée est basée sur l'utilisation d'un laser à haute cadence du tir (laser femtoseconde) associé à un scanner ultra-rapide. Un gain en sensibilité de détection de l'ordre d'un facteur 40 (allant au-delà de l'estimation théorique en raison de l'amélioration du transport de l'aérosol) a été démontré. Le développement de la méthode a été accompagné par une étude fondamentale de l'aérosol produit afin de comprendre les processus physico-chimiques responsables en partie pour ce gain exceptionnel de sensibilité.

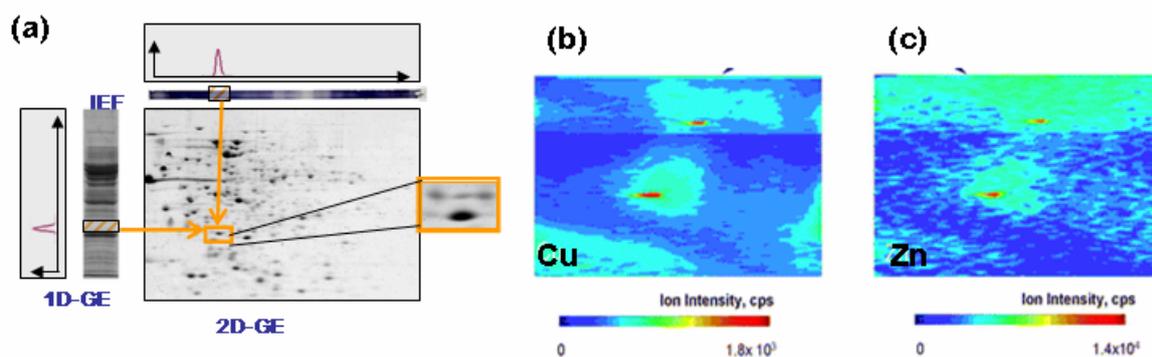
La méthode développée permet d'obtenir les limites de détection similaires aux celles offertes par l'autoradiographie. Ceci a été démontré dans une étude de sélénoprotéome dans la bactérie *Desulfococcus multivorans* (Fig.1c).



**Fig. 2.** a) Comparaison des mode de balayage en ablation laser –ICP MS classique (laser UV 266 nm nanoseconde) et mise en place dans le projet (laser IR 1063 nm femtoseconde) avec les exemples des profils en profondeur des gels obtenus ; b) comparaison visuelle des limites de détection obtenues avec celles d'autographie pour l'analyse des sélénoprotéines dans un extrait de *Desulfococcus multivorans*.

## Imagerie de métalloprotéines

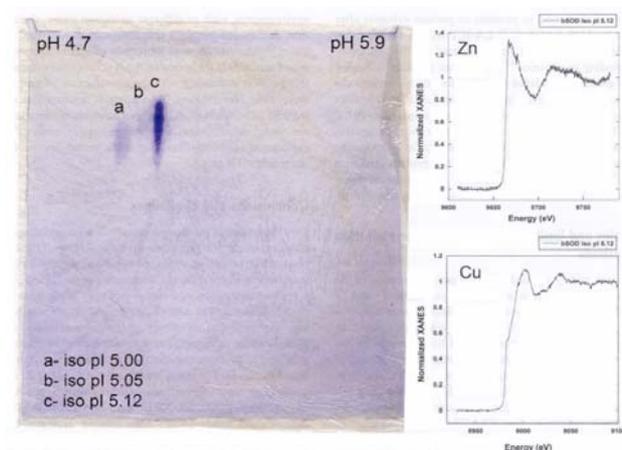
Un défi important a été la mise en place d'une méthode permettant l'analyse des gels bidimensionnel. Il a été relevé par le développement d'un protocole dans lequel le gel est systématiquement ablaté ligne par ligne et les mesures de l'intensité des différents ions sont transposé dans une carte bidimensionnelle de distribution en utilisant un logiciel de cartographie. Les trajectoires de balayage, répétées tous les 100  $\mu\text{m}$  pour couvrir l'ensemble ou une section d'un gel permettent de construire une image des métaux visualisant toute les métalloprotéines présentes, et cela sans l'utilisation d'isotopes radioactifs et de l'autoradiographie. Un exemple d'une telle image est présenté dans la **Fig. 3a** [6]. Elle montre une protéine stable contenant à la fois le Cu et le Zn dans la section du gel analysé.



**Fig.3.** Principe de l'imagerie élémentaire par l'ablation laser – ICP MS. a) les gels 1D sont analysés afin d'identifier des secteurs d'un gel 2D avec des concentrations élevées en métaux ; b,c) le secteur du gel d'une dizaine de cm<sup>2</sup> environ est ensuite analysés dans le mode imagerie (ablation chaque 100 µm et reconstruction de l'image : l'intensité de l'élément donnée en fonction de sa position dans le gel)

### *Analyse in situ des métaux dans les gels d'électrophorèse*

Nous avons réalisé avec succès, et de manière totalement inédite, la spectroscopie XANES sur gels d'électrophorèse mono et bidimensionnels puis EXAFS, aux seuils du Cu et du Zn de la SOD humaine. Nous avons d'autre part étudié l'état de métallation de cette protéine, et de SOD mutantes impliquées dans la sclérose latérale amyotrophique, par LA-ICP-MS à Pau, et par PIXE à Bordeaux-Gradignan. Ces travaux ont permis de prouver la faisabilité des spectroscopies XAS sur des protéines séparées sur gels ouvrant de larges perspectives d'application en analyse métalloprotéomique. Les résultats obtenus pour la SOD montrent une hétérogénéité d'état redox et d'état de métallation des isoformes de pI jusqu'alors impossible à étudier. Ces différences fines d'état redox et de métallation pourraient jouer un rôle dans les processus neuropathologiques d'agrégation protéique.



**Fig. 4.** A gauche : un gel 2D de la superoxydase dissmutase bovine obtenu sous les conditions non-dénaturantes montrant les trois isoformes au pI 5.00, 5.05 et 5.12. Les spectres XANES ont été obtenus pour un gel non-coloré préparé en parallèle avec le gel montré. Les spectres d'absorption de Zn et Cu (K-edge) sont ceux de l'isoforme pI 5.12.

### *Discussion*

Les objectifs premiers du projet ont été largement atteints. Nous n'avons pas eu recours à l'analyse IR-TF, initialement prévue, car l'identification des bandes protéiques a été réalisée

plus simplement, et avec succès, par comparaison des gels non colorés avec les gels colorés soit au bleu de Coomassie, soit par des tests d'activité enzymatique.

L'approche développée est assez générique. Le verrou principal a été déplacé de la détection vers l'optimisation des conditions permettant la séparation des complexes intacts métal-protéine par l'électrophorèse su gel. Les méthodes analytiques sont à présent opérationnelles ce qui permettra de nouvelles analyses dans des conditions optimisées. Deux nouvelles collaborations ont été structurées : avec l'équipe de la ligne BM30b (FAME, CRG française à l'ESRF) et avec l'équipe du prof. Sun à l'Université de Hongkong (programme Procope). La méthode développée a été la base d'un nouveau projet ANR-blanc (Sélenoprotéomique) avec l'accent et les objectifs déplacés vers des défis biochimiques.

## Conclusions

Le projet a débouché sur quelques nouvelles méthodes analytiques qui sont en passe de devenir l'un des fondements des recherches en une nouvelle discipline, la métallomique. Le résultat du projet est 10 publications dans des revues de rang A ayant un facteur d'impact moyen de 4 environ, ce qui est supérieur à la moyenne de revues de chimie analytique. Même si d'apparences complexes, l'électrophorèse sur gel avec détection par l'ICP MS rentre progressivement dans la routine analytique et permet d'obtenir de l'information *in vivo* sur les complexes de protéines avec des métaux en milieux biologiques. Sa maturité croissante commence à permettre des études interdisciplinaires dans les différents domaines, telles que la toxicologie environnementale, bio- et plus particulièrement phytoremédiation, production des aliments fortifiés, ou pharmacologie et toxicologie clinique.

## Les principales publications

1. Lobinski, R., Moulin, C., Ortega, R., Imaging and speciation of trace elements in biological environment (2006) *Biochimie*, 88 (11), pp. 1591-1604.
2. Ballihaut, G., Claverie, F., Pécheyran, C., Mounicou, S., Grimaud, R., Lobinski, R., Sensitive detection of selenoproteins in gel electrophoresis by high repetition rate femtosecond laser ablation – inductively coupled plasma mass spectrometry (2007) *Analytical Chemistry*, 79 (17), pp. 6874-6880.
3. Ballihaut, G., Pécheyran, C., Mounicou, S., Preud'homme, H., Grimaud, R., Lobinski, R., Ballihaut, G., Grimaud, R., Lobinski, R., Multimode detection (LA-ICP-MS, MALDI-MS and nanoHPLC-ESI-MS2) in 1D and 2D gel electrophoresis for selenium-containing proteins, (2007) *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26 (3), pp. 183-190.
4. Chevreux, S., Roudeau, S., Fraysse, A., Carmona, A., Devès, G., Solari, P.L., Weng, T.C., Ortega, R., Direct speciation of metals in copper-zinc superoxide dismutase isoforms on electrophoresis gels using X-ray absorption near edge structure (2008) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (8), pp. 1117-1120.
5. Becker, J.Su., Mounicou, S., Zoriy, M.V., Becker, J.S., Lobinski, R., Analysis of metal-binding proteins separated by non-denaturing gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) (2008) *Talanta*, 76 (5), pp. 1183-1188.
6. Becker, J.Su., Pozebon, D., Dressler, V.L., Lobinski, R., Becker, J.S., LA-ICP-MS studies of zinc exchange by copper in bovine serum albumin using an isotopic enriched copper tracer (2008) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (8), pp. 1076-1082.

7. Becker, J. Su., Lobinski, R., Becker, J.S., Metal imaging in non-denaturing 2D electrophoresis gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the detection of metalloproteins (2009) *Metallomics*, 1(3), 312-316.
8. Ortega R., Chevreux S., Roudeau S., Fraysse A., Carmona A., Devès G., Solari P.L., Mounicou S. and Lobinski R., Multimodal analysis of metals in copper-zinc superoxide dismutase isoforms separated on electrophoresis gels, (2009) *Biochimie*, 91, 1324-1327.
9. Claverie, F., Pécheyran, C., Mounicou, S., Ballihaut, GT., Fernandez, B., Alexis, J., Lobinski, R., Donard, O.F.X., Characterization of the aerosol produced by infrared femtosecond laser ablation of polyacrylamide gels for the sensitive inductively coupled plasma mass spectrometric detection of sélénoprotéines, (2009) *Spectrochimica Acta*, 64, 649-658.
10. Ortega, R., Synchrotron radiation for direct analysis of metalloproteins onelectrophoresis gels (2009) *Metallomics*, 1, 137-141.