

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7178

THÈSE

présentée par

Amandine BŒUF

soutenue le 13 mai 2013

pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline / Spécialité : Chimie Analytique

Développement d'approches protéomiques
pour l'étude des interactions
tique / *Borrelia* / peau

Directeur de thèse : Pr **SABATIER Laurence**, université de Strasbourg

Rapporteurs : Pr **LEMOINE Jérôme**, université de Lyon

Dr **BOURGOUIN Catherine**, Institut Pasteur, Paris

Examineur : Dr **TRIFILIEFF Elisabeth**, université de Strasbourg

Invité : Pr **JAULHAC Benoît**, université de Strasbourg





« La plus grande gloire n'est pas de ne jamais tomber, mais de se relever à chaque chute »

Confucius



Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu Laurence Sabatier pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour m'avoir fait confiance pendant ces trois années. Merci pour votre encadrement, votre porte toujours ouverte et pour tout ce que vous m'avez appris. Merci pour les conditions idéales dans lesquelles j'ai pu réaliser mes travaux et merci pour tous les congrès et autres manifestations auxquels j'ai pu participer.

Je remercie également Alain van Dorsselaer pour son accueil au sein du LSMBO. Un grand merci pour m'avoir fait confiance jusqu'au bout.

Je remercie vivement Catherine Bourgouin, Jérôme Lemoine, Elisabeth Trifilieff et Benoît Jaulhac pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Un grand merci à l'ensemble de nos collaborateurs à l'institut de Bactériologie. Merci à Nathalie Boulanger pour son soutien, sa disponibilité et tout ce que j'ai pu apprendre sur la maladie de Lyme à ses côtés. Merci à Aurélie, Frédéric, Elody et Cathy pour tous les échantillons qu'ils ont pu me fournir et tous les tests qu'ils ont réalisé. Merci pour l'ensemble des échanges que nous avons pu avoir et qui m'ont beaucoup apporté.

Je remercie très chaleureusement Philippe Bulet et Karim Arafah pour m'avoir initiée aux joies de l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI. Merci pour votre accueil à Archamps, pour le temps que vous m'avez consacré et pour votre confiance. Je remercie également Arnaud et Marie pour leur soutien et pour les bons moments passés en leur compagnie.

Un énorme merci à l'ensemble du LSMBO pour tous les échanges scientifiques et pour cette ambiance idéale.

Merci à l'ensemble du très select SRM club, avec en tête de liste Christinette, pour son soutien, sa bonne humeur, ses conseils, son intérêt et son implication dans mes travaux. Je remercie chaleureusement Agnès pour tous les bons moments passés devant le TSQ (et le TSQ pour tous les mauvais !). Merci à Diego pour son soutien à chaque fois qu'il entrait dans la salle du TSQ ! Merci pour ton aide et pour les bons moments passés à tes côtés. Merci à Marine et nos nombreux débats sur la justesse. Merci à François et tout ce qu'il a pu nous montrer dans les rues de Genève. Merci à Christine, Sebastian, Allison, Georg, Anna pour l'ensemble des discussions que nous avons pu avoir au cours de nos réunions.

Merci au barbecue club (encore plus select !) plus connu sous le nom de Farbrices' club. Merci au quality club Hélène, Véronique et Jennifer. Merci au Grrr club avec Jean-Marc, Danielle et leur compétition pour être le premier. Merci au Bio-info club Alexandre, Alexandre et Patrick. Merci au non cov club Sarah, François, Jean-Michel et Stéphanie. Merci à Kevin pour son aide au quotidien.

Merci à l'ensemble des nouveaux qui vont prendre la relève : Guillaume et ses 99 bouteilles, Johan, Nicolas, Luc, Elisa, Quentin.



Merci à l'ensemble des anciens LSMBO : Magali, Nicolas, Cyril, Guillaume, Cédric, Daniel, Thierry, Sébastien, Laetitia.

Merci à tous ceux avec qui j'ai partagé mon bureau : Elie, Séverine, Vanessa, Elsa, et à mes deux binômes de choc Bertrand et Joseph, Gillou et Shak Shak.

Un grand merci à tous mes soutiens ! Aux Strasbourgeois ! Merci à Sarah et tous les instruments à batterie qu'elle m'a prêtés...Merci à maitresse galette et Priskat pour la maison d'hôte ouverte spécialement pour moi, merci à Stefon dit le cadeau, à Tic et Tac et Euryale Jérôme et Karel. A l'orléannaise Hélène. Au parisien Pierre-Eymeric. Aux savoyards. Et plus particulièrement aux grenoblois, mes parents et mon frère, sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui pour tout leur amour et toutes les valeurs qu'ils m'ont inculquées, à Audrey, Quentin et Ambre. Un grand merci à Loïc et son soutien au quotidien.

Introduction générale.....	1
Chapitre I : La maladie de Lyme	5
I- Généralités.....	6
A/ Histoire	6
B/ Epidémiologie.....	6
C/ Les manifestations cliniques	7
D/ Le diagnostic.....	11
E/ Le traitement et la prévention	13
II- Les tiques du genre <i>Ixodes</i>	15
A/ Généralités	15
B/ Le cycle de développement de la tique.....	18
C/ La salive de tique.....	19
III- Les bactéries <i>Borrelia burgdorferi</i> sl.....	27
A/ Généralités	27
B/ Le génome de la bactérie	29
C/ La transmission de la bactérie.....	30
Chapitre II : Les outils et stratégies pour l'analyse protéomique	35
I- Les techniques séparatives de protéines et de peptides	36
A/ La séparation par électrophorèse sur gel.....	36
B/ La chromatographie liquide haute performance	39
II- La spectrométrie de masse.....	41
A/ La source d'ionisation.....	41
B/ L'analyseur de masse	44
C/ Le détecteur	51
D/ La spectrométrie de masse en tandem et la fragmentation peptidique	53
III- Les stratégies d'identification de protéines par spectrométrie de masse	58
A/ L'empreinte peptidique massique	58
B/ Les stratégies nanoLC-MS/MS.....	58
C/ Les banques de données	60
D/ Les moteurs de recherche.....	61
E/ L'évaluation des résultats	63
IV- Les stratégies de quantification des protéines par spectrométrie de masse.....	64
A/ Les stratégies basées sur l'électrophorèse sur gel.....	64
B/ Les stratégies basées sur la spectrométrie de masse	65

Chapitre III : Développement d'une méthode analytique HPLC-UV et nanoLC-MS/MS pour l'identification de protéines salivaires de tique 71

I- Introduction	72
II- Mise au point de la méthode.....	73
A/ Optimisations des conditions chromatographiques sur une chaîne Agilent	73
B/ Couplage microHPLC-UV-MS.....	77
C/ Mise au point de la stratégie d'identification par spectrométrie de masse des protéines salivaires de tiques.....	78
D/ Optimisation de la digestion enzymatique	79
E/ Transfert de la méthode chromatographique sur un système Thermo	85
F/ Conclusion.....	97
III- Tests de l'immunité innée cutanée	99
IV- Choix du statut des tiques	101
A/ Influence de la stase de développement de la tique	101
B/ Influence du repas sanguin	102
C/ Influence de la durée du repas sanguin	103
D/ Conclusion	105
V- Analyses différentielles d'extraits de glandes salivaires de tiques infectées ou non par la bactérie <i>Borrelia</i>	106
A/ Analyses différentielles	106
B/ Tests d'activité sur KCs.....	110
C/ Conclusion.....	113
VI- Analyses d'extraits de glandes salivaires de tiques non infectées	114
A/ Etude de la reproductibilité biologique	114
B/ Tests sur kératinocytes et sur fibroblastes	116
C/ Conclusion.....	122

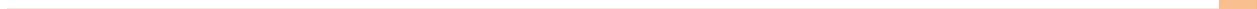
Chapitre IV : Développement d'une méthode diagnostique par spectrométrie de masse LC-SRM... 125

I- Introduction	126
II- La peau.....	127
III- Etapes cruciales du développement d'une méthode SRM.....	129
IV- Présentation du couplage.....	137
V- Evaluation des performances du système.....	140
A/ Evaluation de la répétabilité du système	140
B/ Evaluation de la sensibilité du système	146
C/ Optimisation des paramètres du spectromètre de masse.....	148
D/ Robustesse du système	150
VI- Extraction des protéines de biopsies cutanées	152
A/ Optimisation de la nature du tampon.....	152
B/ Optimisation du protocole d'extraction.....	154
C/ Conclusion	155
VII- Développement de méthode pour la détection d'OspC par LC-SRM.....	156
A/ Choix de la stratégie de détection, de quantification et de traitement des données .	156
B/ Choix de la protéine cible.....	156
C/ Choix des peptides	159

D/ Choix des transitions et validation	161
E/ Optimisation des transitions	164
F/ Effet de matrice.....	167
G/ Evaluation des performances de la méthode	169
H/ Conclusion	171
VIII-Analyse de biopsies cutanées infectées	172
A/ Application de la stratégie développée à des biopsies de peau infectée	172
B/ Ajout d'une étape de préfractionnement	174
C/ Conclusion.....	179
Chapitre V : Développement d'une méthode d'imagerie de biopsies cutanées par spectrométrie de masse.....	181
I- Introduction	182
II- Etapes cruciales de la préparation d'échantillon	185
III- Optimisation de la préparation de biopsie cutanée	189
A/ Optimisation de la découpe de biopsie de peau de souris	190
B/ Influence de l'étape de lavage avant le dépôt de matrice.....	191
C/ Optimisation de la composition de la solution de matrice	192
D/ Optimisation du dépôt de matrice par spray.....	194
E/ Conclusion	198
IV- Optimisation de la détection de la protéine OspC	199
V- Etude longitudinale d'une biopsie de peau	201
VI- Conclusion	202
Conclusion générale	203
Partie expérimentale.....	207
I- Origine des réactifs.....	208
II- Chapitre III	209
A/ Préparation des extraits de glandes salivaires.....	209
B/ Mise au point de la méthode chromatographique sur la chaîne Agilent Technologies 209	
C/ Analyse d'extraits de glandes salivaires sur la chaîne Agilent Technologies	210
D/ Transfert de la méthode sur la chaîne Thermo Fischer Scientific.....	211
E/ Analyse d'extraits de glandes salivaires sur la chaîne Thermo Fischer Scientific	213
F/ Couplage microHPLC-UV-MS.....	214
G/ Mise au point de la digestion enzymatique	215
H/ Analyses nanoLC-MS/MS des fractions digérées	215
I/ Identification des protéines	217
III- Chapitre IV	218
A/ Prélèvement des biopsies	218
B/ Evaluation des performances.....	218
C/ Extraction des protéines	220
D/ Digestion des extraits de biopsies cutanées	221
E/ Développement de la méthode LC-SRM pour la détection d'OspC.....	221



F/ Analyse des biopsies cutanées infectées	223
IV- Chapitre V	226
A/ Prélèvement des biopsies	226
B/ Optimisation de la préparation d'échantillon	226
C/ Application aux biopsies cutanées	228
Bibliographie.....	229





Abréviations

1DE : Electrophorèse monodimensionnelle

2DE : Electrophorèse bidimensionnelle

ACN : Acétonitrile

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMP : Peptide antimicrobien

APS : Persulfate d'ammonium

AQUA : Absolute quantification

ARN : Acide ribonucléique

BIP : *B cell inhibitory protein*

BLASTP : *Basic Local Alignment Search Tool for Protein*

BPC : *Base Peak Chromatogram* -

BSA : Albumine de serum bovin

CDC : *Centers for Disease Control and Prevention*

DDA : *Data Dependent Acquisition*

DHB : Acide 2,5-dihydroxybenzoïque

DIGE : *Difference Gel Electrophoresis*

DTT : Dithiothréitol

EUCALB : *European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis*

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ESI: Ionisation electrospray

FA: Acide formique

FB : Fibroblaste

FWHM : *Full Width at Half Maximum*

GS : Glandes Salivaires

HCCA : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

IAA : Iodoacétamide

ICAT : *Isotope-Coded Affinity Tag*

ICPL : *Isotope-Coded Protein Label*

IgM : immunoglobuline M

IgG : immunoglobuline G

IL-8 : Interleukine 8

IRS-2 : *Ixodes ricinus serpin-2*

Isac : *Ixodes scapularis salivary anticomplement protein*

IT : piège à ions

iTRAQ : *isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification*

KC : Kératinocyte

m/z : rapport masse sur charge

MALDI : *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*

min : minutes

MS : Spectrométrie de Masse

MS/MS : spectrométrie de masse en tandem

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

OMSSA : *Open Mass Spectrometry Search Algorithm*

Osp : *Outer Surface Protein*

PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

PAMP : *Pathogens Associated Molecular Patterns*

PBS : Phosphate buffer saline

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PFF : *Peptide Fragment Fingerprint*

PGE2 : Prostaglandine E2



PMF : *Peptide Mass Fingerprint*

Q : Quadripôle

RP : phase inverse

SA : Acide sinapinique

Salp : *Salivary Protein*

SAX/SCX : Chromatographie échangeuse d'ions

SDS : Dodécylsulfate de sodium

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique

SILAC : *Stable Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture*

SIMS : *Secondary Ion Mass Spectrometry*

SRM : *Selected Reaction Monitoring*

TAP : *Tick Anticoagulant Peptide*

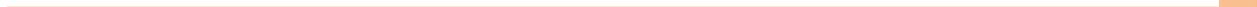
TFA: Acide trifluoroacétique

TLR : *Toll Like Receptor*

TOF : Temps de vol

UDP : *User Defined Programm*

UV : Ultraviolet







Introduction générale



Les maladies à transmission vectorielle, causées par des agents pathogènes (virus, bactéries, protozoaires, vers) transmis lors d'une piqûre d'arthropodes hématophages, sont aujourd'hui une question de santé publique mondiale. En effet, au cours des trente dernières années, certaines maladies ont émergé dans de nouvelles régions du monde, comme le virus du Nil occidental aux Etats-Unis ou le virus du Chikungunya sur l'île de la Réunion. D'autres ont montré une augmentation d'incidence dans des zones où elles étaient déjà établies, comme la maladie de Lyme aux Etats-Unis ou en Europe.

De nombreuses études se sont intéressées à la compréhension des mécanismes d'interaction entre les trois acteurs impliqués dans une maladie à transmission vectorielle : le vecteur, l'agent pathogène et l'hôte. Plus particulièrement, la salive d'arthropode, contenant un cocktail de molécules avec différentes activités pharmacologiques, a fait l'objet de nombreuses investigations. En majorité, il s'agit d'études transcriptomiques basées sur la construction de banques d'ADN complémentaire. Ces études ont permis d'établir des listes de transcrits et de proposer des fonctions liées aux produits de gènes correspondants. Parallèlement, l'avènement des stratégies protéomiques par spectrométrie de masse a permis d'obtenir des informations complémentaires sur le sialome des arthropodes.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis plus principalement focalisée sur le **développement méthodologique d'approches protéomiques** visant une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction entre les trois acteurs de la **maladie de Lyme**, à savoir la tique du genre *Ixodes*, la bactérie du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato et l'hôte mammifère (homme, souris). Ces travaux s'inscrivent dans le cadre du développement de **nouvelles stratégies vaccinales et diagnostiques** de la maladie de Lyme. Mon objectif était d'une part de caractériser les molécules de tique qui facilitent la transmission et la dissémination de la bactérie dans l'organisme hôte, et d'autre part de développer des méthodes de détection de la bactérie au niveau de la peau par spectrométrie de masse.

Les deux premiers chapitres de ce manuscrit, sont respectivement une introduction à la maladie de Lyme et une description des stratégies et des outils utilisés en analyse protéomique.

Les chapitres suivants présentent les résultats obtenus durant ma thèse :

Le troisième chapitre porte sur la mise en œuvre d'une méthode de séparation adaptée à des **extraits de glandes salivaires de tique** et d'une méthode de caractérisation des protéines contenues dans ces extraits. Les optimisations ont été axées sur les conditions chromatographiques, les conditions de digestion enzymatique et sur le transfert de méthode d'une chaîne HPLC à une autre. Ces développements ont ensuite été appliqués à l'identification de molécules présentes dans les glandes salivaires de tiques, infectées ou non par *Borrelia burgdorferi*, et dotées d'une activité liée à la réponse immunitaire innée de l'hôte.

Le quatrième chapitre porte sur le développement d'une méthode diagnostique de la maladie de Lyme, par la détection de protéines de *Borrelia* par **spectrométrie de masse ciblée (Selected**



Reaction Monitoring, SRM) dans des biopsies cutanées. Dans un premier temps, les performances d'un couplage LC-SRM, nouvellement installé dans notre laboratoire, ont été évaluées. Puis, après avoir mis au point les conditions de préparation d'échantillon, une méthode a été développée pour la détection et la quantification d'une protéine de *Borrelia*, OspC, dans des biopsies cutanées de souris. Enfin, cette méthode a été mise en œuvre pour la détection de la protéine d'intérêt dans des échantillons de peau infectée.

Le cinquième chapitre porte sur l'étude préliminaire du développement d'une méthode diagnostique pour la détection de la bactérie directement sur le tissu par **imagerie par spectrométrie de masse MALDI**. Dans le cadre de cette étude, de nombreuses optimisations de préparation d'échantillon ont été réalisées pour l'analyse de biopsies cutanées.

Enfin, une conclusion générale fait la synthèse des principaux résultats et décrit les perspectives de mes travaux.



Chapitre I : La maladie de Lyme

La maladie de Lyme, ou borréliose de Lyme, est une maladie vectorielle causée par la bactérie *Borrelia burgdorferi* sensu lato et transmise à l'hôte (homme, animal) par piqûre de tique du genre *Ixodes*. Les premières descriptions cliniques de cette maladie datent du début du 20^{ème} siècle, mais il a fallu attendre la fin des années 1980, pour découvrir l'agent pathogène responsable de cette maladie.

I- Généralités

A/ Histoire

L'histoire de la maladie de Lyme débute en Europe, plus particulièrement en Suède et en Allemagne, au début du 20^{ème} siècle avec la première description de l'érythème migrant (Lipschütz, 1913 ; Afzelius, 1921), lésion cutanée apparaissant à la suite d'une piqûre de tique. En 1922, les français Garin et Bujadoux rapportent, à leur tour, une maladie consécutive à une piqûre de tique se manifestant par une paralysie, évoquant ainsi la première description d'une atteinte neurologique. Le cas étudié présente également une auréole inflammatoire rouge au niveau du point de piqûre de la tique rappelant l'érythème migrant (Garin *et al.*, 1922). Au cours des années suivantes, quelques études ont également décrit l'érythème migrant. En 1951, Hollström démontre l'efficacité de la pénicilline contre les érythèmes décrits précédemment (Hollström, 1951).

L'étude de la maladie se poursuit aux Etats-Unis dans les années 1970, avec la première description sur le continent américain de l'érythème migrant observé sur un patient à la suite d'une piqûre de tique (Scrimenti, 1970). Puis, en 1977, le rhumatologue Allen Steere attire l'attention sur une épidémie d'arthrites qui touche particulièrement les enfants du comté de Lyme dans le Connecticut aux Etats-Unis, d'où la maladie tire son nom (Steere *et al.*, 1977). Dans 25 % des cas, une lésion inflammatoire est observée à la surface de la peau, quatre mois en moyenne avant de développer une arthrite, faisant ainsi penser à une piqûre d'insecte. La transmission de la maladie par un vecteur (arthropode) est alors évoquée. En 1978, cette même équipe propose la tique *Ixodes scapularis* comme vecteur de cette maladie (Steere *et al.*, 1978).

Quelques années plus tard, W. Burgdorfer met en évidence la présence de spirochètes dans l'intestin de tiques *Ixodes dammini* (également appelées *I. scapularis*) récoltées dans une zone endémique de la maladie de Lyme (Burgdorfer *et al.*, 1982). Il suggère le lien entre cette bactérie et la maladie de Lyme après observation de l'apparition d'érythèmes migrants sur des lapins 10 à 12 semaines après les avoir mis au contact de tiques infectées. Cette bactérie est identifiée comme étant une nouvelle espèce de *Borrelia* par Johnson *et al.* et sera baptisée *Borrelia burgdorferi* (Johnson *et al.*, 1984a, 1984b).

B/ Epidémiologie

La borréliose de Lyme est la maladie vectorielle à tiques la plus répandue dans l'hémisphère nord (Hubálek, 2009 ; Stanek *et al.*, 2012). Elle est présente aussi bien aux Etats-Unis, où elle se répand de la frontière Nord du Mexique jusqu'au sud du Canada, qu'en Europe, où elle s'étend sur la quasi-

totalité du continent, de la mer méditerranée jusqu'à la mer baltique. Elle est également présente en Asie du nord, principalement en Russie, et en Afrique du nord avec quelques cas dans le Maghreb (Hubálek, 2009).

Aux Etats-Unis, l'incidence de cette maladie est relativement bien renseignée. En effet les différents cas sont centralisés au CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, <http://www.cdc.gov/lyme>). En 2011, 24 300 cas sont répertoriés, soit un taux d'incidence de 7,8 cas par 100 000 habitants.

En Europe, le système de surveillance de la maladie de Lyme n'est pas centralisé comme il l'est aux Etats-Unis, et la notification de la maladie n'est pas systématique. C'est notamment le cas dans les pays où seules quelques régions sont particulièrement touchées, comme en France. Les taux d'incidence sont donc souvent estimés en se basant sur des études épidémiologiques restreintes à des zones particulières. Cela implique des variations de plusieurs dizaines de milliers de cas entre différentes études. Par exemple, une étude de 2006 annonce un nombre de 85 000 infections par an en Europe (Lindgren *et al.*, 2006) alors qu'une autre étude, plus prudente, estime l'incidence à 65 500 nouveaux cas par an (Hubálek, 2009). En France, une des rares études épidémiologiques nationales, réalisée entre mai 1999 et avril 2000, rapporte un taux d'incidence de 6,4 cas par 100 000 habitants, soit environ 5 500 nouveaux cas (Letriliart *et al.*, 2005). En Alsace, plus de 3 000 cas par an sont répertoriés d'après le bulletin épidémiologique hebdomadaire du 04 juillet 2006.

Il a été montré à plusieurs reprises que les estimations du taux d'incidence de la maladie de Lyme reflètent globalement une sous-évaluation, de l'ordre de 2 à 3 fois, du nombre de cas réel (Campbell *et al.*, 1998 ; Naleway *et al.*, 2002). De plus, l'estimation au niveau européen est difficile car d'une part les définitions des cas avérés et des cas probables peuvent être différentes, et d'autre part les tests diagnostiques ne sont pas appliqués de la même manière ou diffèrent selon les pays (Santino *et al.*, 1997).

Dans l'hémisphère sud, le nombre d'études sur la maladie de Lyme est assez faible en comparaison à celui de l'hémisphère nord, mais augmente depuis une quinzaine d'années, notamment au Brésil (Mantovani *et al.*, 2007 ; Santos *et al.*, 2010) ou en Australie (Storer *et al.*, 2003 ; Mayne, 2011).

C/ Les manifestations cliniques

La borréliose de Lyme est une maladie multisystémique. Elle est caractérisée par un polymorphisme clinique important, se manifestant par des atteintes cutanées, neurologiques, articulaires ou cardiaques, et pouvant être espacées de quelques jours à quelques années. Cette grande variété des manifestations cliniques est également accentuée par la diversité des espèces de *Borrelia* pathogènes pour l'homme, comme nous le verrons plus tard.

Au cours de l'évolution de la maladie chez l'hôte vertébré, deux phases se distinguent : une phase précoce qui peut être localisée ou disséminée et une phase tardive. Chacune de ces phases est caractérisée par des manifestations cliniques propres.

Phase précoce

La phase **précoce localisée**, survient quelques jours à quelques semaines après la piqûre de tique. Les *Borrelia* transmises par la tique se développent et se disséminent localement. La première manifestation clinique est une atteinte cutanée caractérisée par l'apparition d'un érythème migrant (Afzelius, 1921) autour du point de piqûre dans 60 à 80 % des cas (Steere, 1989 ; Lipsker, 2007). Celui-ci est en général circulaire, de couleur rouge et homogène au cours des premiers jours (Figure 1). Puis, il s'éclaircit au centre au fur et à mesure qu'il s'étend de quelques millimètres par jour autour du point de piqûre. Il en résulte une lésion annulaire pouvant atteindre plus de trente centimètres de diamètre (Lipsker, 2007). La forme de l'érythème peut différer, notamment en fonction de la localisation : il est triangulaire dans les plis ou linéaire sur la tête. S'il n'est pas traité, l'érythème peut persister jusqu'à trois semaines après la piqûre de tique (Strle *et al.*, 2009) avant de se résorber naturellement. Dans certains cas, l'érythème migrant peut être accompagné d'autres symptômes : fièvre, maux de tête, fatigue, myalgie, arthralgie.

Quelques différences dans l'aspect clinique de l'érythème migrant sont constatées entre les Etats-Unis et l'Europe. Par exemple, l'érythème migrant s'étend et disparaît plus lentement en Europe qu'aux Etats-Unis, où l'inflammation est plus vive (Strle *et al.*, 1999). Il est également plus fréquent d'observer un érythème migrant homogène ou avec une auréole rouge au centre plutôt qu'un éclaircissement aux Etats-Unis (Smith *et al.*, 2002).



Figure 1 : Erythème migrant.

Collection D. Lipsker, clinique de dermatologie de Strasbourg

La phase **précoce disséminée** se manifeste quelques semaines à quelques mois après la piqûre de tique. Cette phase marque le début de la dissémination de la bactérie dans l'organisme hôte, non seulement au niveau cutané mais également par voie sanguine, et le début du polymorphisme clinique avec des atteintes dermatologiques, neurologiques, rhumatologiques ou cardiaques.

Les atteintes rhumatologiques et neurologiques sont les manifestations les plus répandues.

Les atteintes neurologiques, ou neuroborrélioses, surviennent dans 15 % des cas non traités et sont caractérisées par des méningo-radicalites, des encéphalites, des névrites ou des myélites. Les méningo-radicalites, plus fréquentes, sont des atteintes radiculaires accompagnées d'une méningite.

Lorsqu'elles sont localisées au niveau crânien, des paralysies faciales uni- ou bilatérales peuvent survenir (Ackermann *et al.*, 1984). Ces atteintes sont plus répandues en Europe qu'aux Etats-Unis.

L'arthrite observée par Steere *et al.* en 1977 est l'atteinte rhumatologique majeure. Elle est plus fréquente aux Etats-Unis, où elle survient dans plus de la moitié des cas non traités. L'arthrite se développe au niveau de grosses articulations (genou, épaule, coude, cheville), le plus souvent au genou (Strle *et al.*, 2009) (Figure 2).

Parmi les atteintes dermatologiques on retrouve les érythèmes migrants multiples et les lymphocytomes (Figure 2). Les érythèmes migrants multiples sont plus répandus aux Etats-Unis (50 % des cas), qu'en Europe (quelques %) (Berglund *et al.*, 1995 ; Lipsker *et al.*, 2002). L'érythème migrant multiple présente au moins deux lésions cutanées caractéristiques, de plus petite taille par rapport à l'érythème migrant initial, et ne se manifeste pas forcément autour du point de piqûre de la tique (Åsbrink *et al.*, 1988). Les lymphocytomes sont, quant à eux, une manifestation plus rare (de l'ordre de quelques %), et présents uniquement en Europe (Berglund *et al.*, 1995). Ils se manifestent par l'apparition d'un nodule violacé au niveau du lobe de l'oreille, du nez ou de l'aréole (Strle *et al.*, 1992), pouvant persister plusieurs mois.

Enfin, les manifestations cardiaques sont rares. Elles surviennent dans moins de 5 % des cas non traités en Europe et entre 5 et 10 % des cas non traités aux USA (Strle *et al.*, 2009) et se manifestent généralement par une atteinte du bloc auriculo-ventriculaire ou par une myocardite.



Figure 2 : Manifestations cliniques de la deuxième phase de la maladie de Lyme.

De la gauche vers la droite : arthrite, érythème migrant multiplie. Collection D. Lipsker, clinique de dermatologie de Strasbourg

Phase tardive

La deuxième phase de la maladie est **tardive et disséminée** et peut survenir quelques mois à quelques années après l'infection initiale. Elle se manifeste par des atteintes chroniques des manifestations précédemment citées.

L'acrodermatite chronique atrophiante (Figure 3) est la manifestation dermatologique majeure au cours de cette deuxième phase (Åsbrink *et al.*, 1988). Elle est présente en Europe mais pas aux Etats-Unis (Stanek *et al.*, 2012). Elle débute par un érythème violacé et œdémateux au niveau des pieds, des genoux ou des mains. Peu à peu cette lésion grandit puis évolue vers une atrophie cutanée. La peau devient de plus en plus fine, fripée et laisse apparaître les vaisseaux sanguins.

Les atteintes chroniques neurologiques sont caractérisées par des neuropathies, des encéphalites ou des encéphalomyélites. Quant aux manifestations rhumatologiques, elles se présentent sous forme d'arthrites chroniques.



Figure 3 : Acrodermatite chronique atrophiante.
www.dermis.net.

Le déroulement global de la maladie de Lyme est très similaire en Europe et aux Etats-Unis. Cependant, comme cela a été évoqué à différentes reprises, les atteintes propres à chacune des phases présentées diffèrent entre les continents européen et américain. Comme nous le verrons plus tard, une seule espèce du complexe *B. burgdorferi* sensu lato est présente aux Etats-Unis (*B. burgdorferi* sensu stricto), alors que deux supplémentaires le sont en Europe (*B. garinii*, *B. afzelii*). Ces différentes espèces ont un pouvoir pathogène différent, expliquant ainsi les variations de symptômes.

Localisation	Manifestations cliniques majoritaires
Europe	<ul style="list-style-type: none"> - Apparition lente d'un érythème migrant avec un éclaircissement au centre - Lymphocytome - Neuroborréliose
Etats-Unis	<ul style="list-style-type: none"> - Erythème migrant avec inflammation vive et aspect homogène - Erythèmes migrants multiples - Arthrite

Tableau 1 : Manifestations cliniques majoritaires en Europe et aux Etats-Unis.

D/ Le diagnostic

Le polymorphisme de la borréliose de Lyme, la déclaration non systématique des manifestations cliniques, la différence entre les atteintes européennes et américaines, l'expression antigénique différente selon la souche ou l'espèce de *Borrelia* et la non-spécificité de certaines manifestations cliniques pour la maladie de Lyme augmentent la difficulté de diagnostic de la maladie. Un autre aspect pouvant mener à une erreur de diagnostic est l'utilisation par certains laboratoires de méthodes ou de kits de diagnostic non standardisés, de spécificité et de sensibilité variables (Robertson *et al.*, 2000 ; Stanek *et al.*, 2011b) et l'établissement de différents critères et différents seuils de détection entre les pays.

Ces différents points ont naturellement mené à l'élaboration de définitions de cas avérés de la borréliose de Lyme, tant aux Etats-Unis qu'en Europe. Aux Etats-Unis, ces définitions sont gérées par le CDC, en Europe par l'EUCALB (*European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis*) (Stanek *et al.*, 2011b). En France, une conférence de consensus sur la borréliose de Lyme a été menée en décembre 2006 et a abouti à des propositions sur les démarches diagnostiques, thérapeutiques et préventives¹.

Le diagnostic le plus précoce de la maladie repose sur l'observation clinique du patient, avec l'observation ou non de l'érythème migrant, et sur l'analyse de l'exposition potentielle aux tiques. Si l'érythème migrant a un diamètre supérieur à 5 cm, il est considéré comme caractéristique de la maladie. Des tests biologiques peuvent cependant s'avérer nécessaires à l'établissement du diagnostic, notamment lors de manifestations plus tardives non spécifiques à la maladie.

Les tests diagnostiques de l'infection par *B. burgdorferi* peuvent être classés en deux types de techniques : la recherche directe de la bactérie et la recherche indirecte basée sur la détection d'anticorps. La recherche directe de la bactérie, réservée à des laboratoires spécialisés (Nau *et al.*, 2009 ; Stanek *et al.*, 2011b), regroupe la culture de la bactérie et l'amplification de l'ADN par PCR (*Polymerase Chain Reaction*). La recherche indirecte de la bactérie regroupe les techniques immuno-enzymatiques (*Enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) et les techniques de détection par immuno-empreintes (Western-blot).

Culture

Dès les années 1980, la culture de la bactérie a permis d'isoler des spirochètes à partir de biopsies de peau, de sang ou de liquide céphalo-rachidien, tant en Europe qu'aux Etats-Unis (Benach *et al.*, 1983 ; Steere *et al.*, 1983 ; Asbrink *et al.*, 1985). Cependant, la culture n'est pas utilisée en routine pour la détection de l'infection bactérienne du fait de sa variabilité en fonction de la nature de l'échantillon biologique. Cette technique donne des résultats positifs sur des biopsies de peau d'érythème migrant

¹ *Borréliose de Lyme : démarches diagnostiques, thérapeutiques et préventives*
http://www.infectiologie.com/site/medias/_documents/consensus/2006-lyme-long.pdf

dans 50 à 80 % des cas (Nowakowski *et al.*, 2001 ; Liveris *et al.*, 2002). Cependant, dans le cas d'érythème migrant, le diagnostic clinique reste suffisant et les tests diagnostiques ne sont pas nécessaires. Pour le liquide céphalo-rachidien, la culture est peu adaptée, avec une détection dans 10 à 20 % des cas (Jaulhac *et al.*, 1991 ; Strle *et al.*, 2006). De plus la multiplication de la bactérie est lente, ce qui induit un délai de réponse conséquent : 8 à 12 semaines pour conclure à la négativité de la culture (Marques, 2010 ; Bhate *et al.*, 2011).

PCR

L'amplification génique *in vitro* par PCR est une technique permettant d'obtenir une séquence d'ADN en grand nombre à partir d'une faible quantité d'ADN. Le diagnostic par PCR est particulièrement adapté pour la détection de *Borrelia* dans le liquide synovial dans le cas d'arthrite de Lyme (détection dans 60 à 85 % des cas (Nocton *et al.*, 1994 ; Jaulhac *et al.*, 1996)). Sur le liquide céphalo-rachidien, la détection par PCR est peu sensible dans le cas de neuroborrelioses (détection dans moins de 40 % des cas (Nocton *et al.*, 1994 ; Wilske *et al.*, 2007)). Pour des prélèvements de peau dans le cas d'érythèmes migrants ou d'acrodermatites chroniques atrophiantes, elle est très variable (20 à 90 % des cas) (Nowakowski *et al.*, 2001).

Tests sérologiques : ELISA et Western-blot

Ces tests indirects, réalisés sur du sérum ou du liquide céphalo-rachidien, reposent sur la recherche des anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* s.l. Au stade précoce de l'érythème migrant, les tests sérologiques ne sont pas adaptés pour la détection de la maladie (détection dans environ 50% des cas non traités). En effet, comme pour tous les tests basés sur la détection d'anticorps, la sensibilité augmente avec la durée de l'infection. La détection de l'infection se déroule en deux étapes. Tout d'abord un test immuno-enzymatique ELISA est réalisé. Ce test permet de détecter la présence des anticorps immunoglobulines M et G (IgM et IgG) réagissant avec des antigènes du complexe *B. burgdorferi* s.l. Cependant il n'est pas totalement spécifique (Marques, 2010). Alors qu'un test ELISA négatif n'a pas besoin d'être confirmé, un test ambigu ou un test positif doit être confirmé avec un second test par Western-blot. Ce test est basé sur la séparation préalable des antigènes en fonction de leur poids moléculaire, permettant ainsi d'évaluer la spécificité des anticorps développés par les patients. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane qui sera mise en contact avec l'échantillon du patient. Au niveau européen, l'interprétation du Western-blot repose sur des critères standardisés recommandés par l'EUCALB et publiés par Robertson en 2000. Dans cette étude, une cohorte de 227 sérums de patients européens a été testée dans 6 laboratoires européens sur différentes espèces de *Borrelia* dans le but de déterminer des critères d'interprétation pouvant être utilisés communément dans toute l'Europe (Robertson *et al.*, 2000). Différentes règles ont été établies, dont cinq ont été retenues pour leur spécificité et sensibilité acceptables. Ces règles sont présentées dans le Tableau 2 et impliquent la présence d'un certain nombre d'antigènes dans un ensemble de huit : les IgM p41 et OspC et les IgG p83/100, p39, p41, p17, OspC.

Règles établies	Nombre de bandes requises	Antigènes	
		IgM	IgG
1	2 ou 3	p41, OspC,	p83/100, p49, p41
2	2 ou 3	p41, OspC,	p83/100, p49, p17
3	2 ou 3	p41, OspC,	p83/100, p49, p41, p17
4	2 ou 3	p41, OspC,	p83/100, p49, p17, OspC
5	2, 3 ou 4	p41, OspC,	p83/100, p49, p41, p17, OspC

Tableau 2 : Critères retenus et recommandés par l'EUCALB pour l'interprétation de Western-blot (Robertson *et al.*, 2000).

L'étude de Robertson a mis en évidence et pris en compte l'utilisation de différents kits de diagnostic : différentes préparations d'antigènes provenant de différentes espèces de *B. burgdorferi* sI, différentes préparations de gel de polyacrylamide, différents protocoles d'immuno-blot. Ces variations conduisent à des variations en termes de spécificité et de sensibilité entre les différents kits utilisés. Au vu de ces résultats, L'EUCALB recommande l'utilisation préférentielle de kits avec une spécificité minimum de 90% pour les tests ELISA et de 95% pour le Western-blot.

E/ Le traitement et la prévention

Dès 1951, Hollström a démontré l'efficacité de la pénicilline contre les érythèmes migrants décrits par Afzelius. Au cours des 30 dernières années, de nombreuses études ont montré l'efficacité d'un traitement antibiotique contre les différents symptômes de la maladie de Lyme (Weber *et al.*, 1990 ; Wormser *et al.*, 2003 ; Kowalski *et al.*, 2010). La nature de l'antibiotique, la posologie, la voie d'administration et la durée du traitement antibiotique sont différentes selon le stade de la maladie et des symptômes du patient (Tableau 3).

Les principales molécules actives administrées sont les β -lactamines (amoxicilline, céfuroxime-axétil ou ceftriaxone), les cyclines (doxycycline) ou les macrolides (azithromycine). L'amoxicilline, la doxycycline ou la ceftriaxone sont des traitements de première ligne par voie orale ou par intraveineuse, respectivement. L'amoxicilline présente l'avantage de pouvoir être prescrite aux enfants de moins de 8 ans et aux femmes enceintes. La céfuroxime-axétil, légèrement plus onéreuse, est un traitement de deuxième ligne. Enfin, étant donnée leur efficacité plus faible par rapport aux β -lactamines ou aux cyclines, les macrolides sont des traitements oraux de troisième ligne.

Manifestation clinique	Traitement	Posologie chez l'adulte	Durée du traitement
Erythèmes migrants ou Lymphocytomes	Amoxicilline (o)	500mg, 3x/j	14 jours
	Doxycycline (o)	100mg, 2x/j	
	céfuroxime-axétil (o)	500mg, 2x/j	10 jours
	Azithromycine (o)	500mg, 1x/j	
Erythèmes migrants multiples	Amoxicilline (o)	500mg, 3x/j	21 jours
	Doxycycline (o)	100mg, 2x/j	
	céfuroxime-axétil (o)	500mg, 2x/j	10 jours
	Azithromycine (o)	500mg, 1x/j	
Paralysies faciales isolées ou Atteintes cardiaques	Amoxicilline (o)	500mg, 3x/j	14 à 21 jours
	Doxycycline (o)	100mg, 2x/j	
	Ceftriaxone (iv)	2g/j	
Méningo-radiculites, méningites	Ceftriaxone (iv)	2g/j	21 à 28 jours
Arthrites aiguës	Doxycycline (o)	100mg, 2x/j	21 à 28 jours
Arthrites récidivantes ou chroniques	Doxycycline (o)	100mg, 2x/j	28 jours
	Ceftriaxone (iv)	2g/j	14 à 28 jours

Tableau 3 : Recommandations thérapeutiques pour le traitement de la maladie de Lyme chez l'adulte.

D'après (Marques, 2010 ; Stanek *et al.*, 2012); 16^{ème} conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse, Borréliose de Lyme : démarches diagnostiques, thérapeutiques et préventive. (o) : traitement par voie orale. (iv) : traitement par intraveineuse. Les recommandations pour le traitement chez l'enfant peuvent être consultées dans les deux revues citées.

Même s'il peut se résorber de lui-même, il est important de traiter l'érythème migrant avec des antibiotiques afin d'éviter la dissémination des bactéries, et donc le développement d'autres manifestations cliniques. La lésion cutanée disparaît généralement entre 7 et 14 jours après le début du traitement, cependant une fatigue et une arthralgie peut persister jusqu'à 3 mois dans 10 à 25% des cas.

En 1998, un vaccin basé sur la protéine de surface OspA de la bactérie *Borrelia* a été commercialisé aux Etats-Unis par la société GlaxoSmithKline : LYMERixTM (Steere *et al.*, 1998). Cependant, il a été retiré du marché seulement quatre ans après sa commercialisation, d'une part à cause d'une faible réussite commerciale, principalement due à un coût élevé et une efficacité limitée dans le temps impliquant plusieurs injections, d'autre part à cause de possibles effets secondaires induisant une arthrite auto-immune.

Aujourd'hui aucun vaccin n'est disponible et la prévention de la maladie de Lyme consiste à éviter au maximum de fréquenter des zones à risques. Dans ces zones, il faut couvrir au maximum la peau par les vêtements et utiliser des répulsifs. Il est également important d'inspecter toute la surface de la peau, incluant le cuir chevelu, après avoir été potentiellement au contact de tiques et de retirer la(les) tique(s) rapidement en cas de piqûres.

II- Les tiques du genre *Ixodes*

La tique est un ectoparasite hémaphage obligatoire. Elle ne peut donc pas exister indépendamment d'un hôte vertébré sur lequel elle va effectuer des repas sanguins. Au cours de ces repas, la tique va alternativement procéder à une ingestion de sang de l'hôte et à une injection de salive au niveau de la peau de l'hôte. La salive de tique est donc capitale au bon déroulement de ce repas.

A/ Généralités

Taxonomie

Les tiques sont des arthropodes appartenant à la classe des arachnides et à l'ordre des acariens (Figure 4).

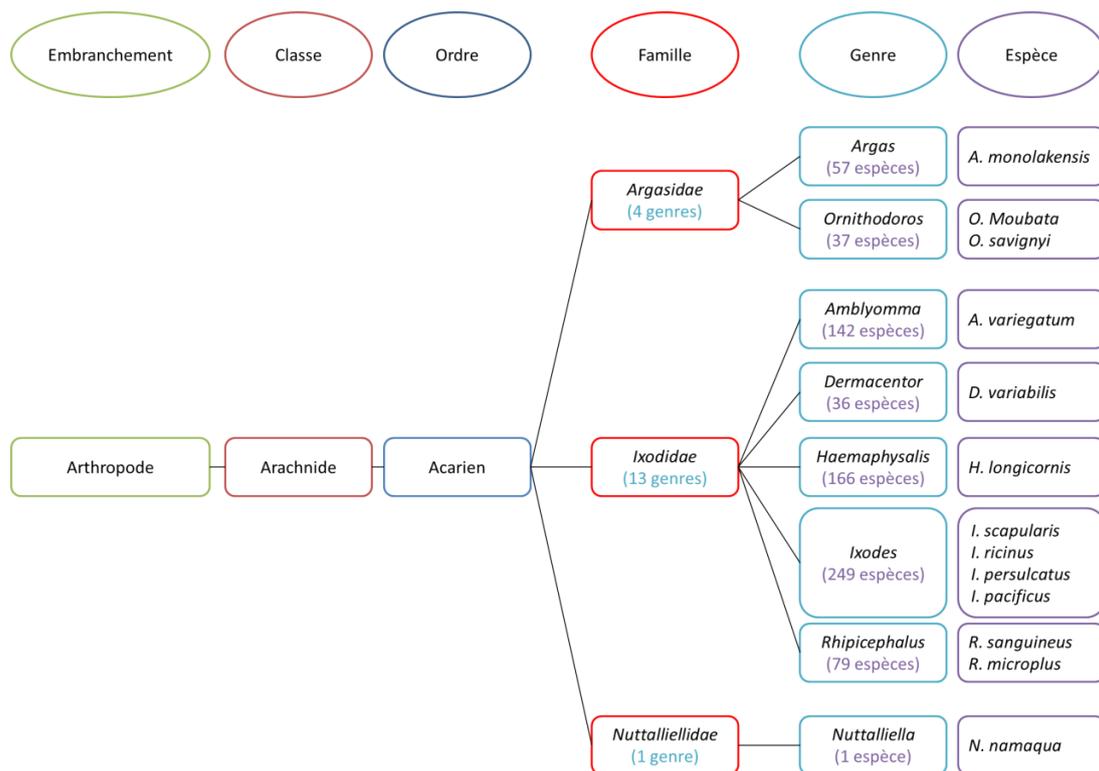


Figure 4 : Taxonomie des trois familles de tiques.

Les principales espèces de tique du genre *Ixodes* sont présentées, ainsi que des exemples d'autres espèces de la famille *Ixodidae* et des familles *Argasidae* et *Nuttalliellidae* citées dans ce manuscrit. D'après (Barker *et al.*, 2004).

Il existe près de 900 espèces de tiques à travers le monde (Barker *et al.*, 2004 ; Jongejan *et al.*, 2004) réparties en trois familles : *Ixodidae* (~700 espèces), *Argasidae* (~180 espèces) et *Nuttalliellidae* (1 espèce, *N. namaqua*). Parmi l'ensemble de ces espèces, une centaine est responsable de maladies à transmission vectorielle causée par des bactéries, des virus ou des parasites. On peut par exemple citer les rickettsioses ou l'anaplasmose causées par des bactéries du genre *Rickettsia* et *Anaplasma* respectivement, la babésiose causée par des parasites du genre *Babesia*, ou encore l'encéphalite à tiques causée par l'arbovirus TBEV (*Tick-borne encephalitis virus*). Les tiques vectrices de *Borrelia* appartiennent au genre *Ixodes*, un des 13 genres de la famille des *Ixodidae*. Le genre *Ixodes* comprend quant à lui 249 espèces, dont les espèces *I. ricinus* et *I. scapularis* (Barker *et al.*, 2004 ; Jongejan *et al.*, 2004).

Morphologie

Les *Ixodidae* sont également appelées tiques dures. Ceci est dû à la rigidité de leur corps (tégument sclérifié), contrairement aux *Argasidae* qui ont un corps mou. Le corps des tiques dures se distingue en deux parties : le capitulum et l'idiosome (Figure 5).

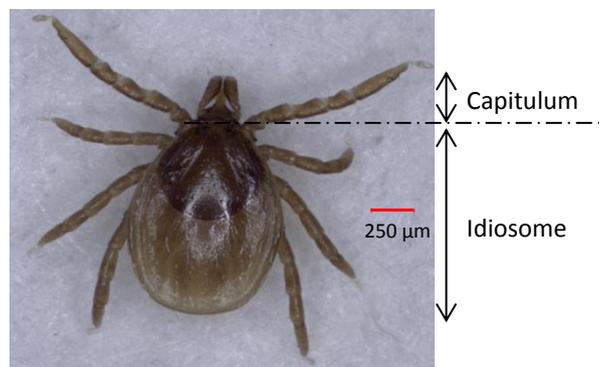


Figure 5 : Tique nymphe *Ixodes ricinus*.
Collection N. Boulanger.

Le capitulum correspond à la partie de la tique en contact avec la peau de l'hôte. Il est composé de trois éléments (Figure 6) :

- L'hypostome, permettant à la tique de s'ancrer solidement dans la peau. Il possède un ensemble de dents rendant son retrait plus difficile.
- Les chélicères, permettant la dilacération des tissus.
- Les pédipalpes, jouant le rôle de pièces sensorielles.

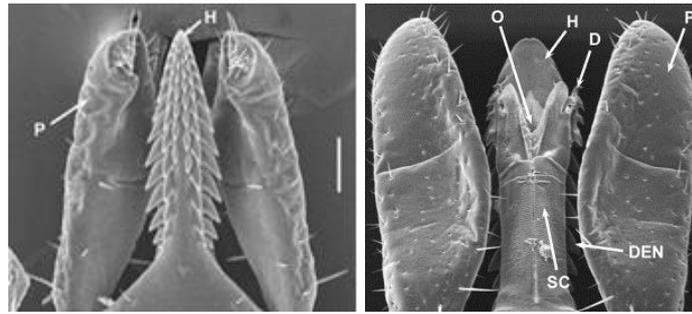


Figure 6 : Images de microscopie électronique à balayage (MEB) du capitulum de tique adulte femelle *Ixodes scapularis*. D'après (Anderson *et al.*, 2008). Vue ventrale (1). P : pédipalpe, H : hypostome, et dorsale (2). D et SC : chelicères, O : extrémité de la voie d'alimentation sanguine, DEN : dents de l'hypostome. Barre de mesure = 500 μm .

L'idiosome correspond au reste du corps de la tique. Il peut être distingué en deux parties : une partie rigide du côté antérieur (vers le capitulum) et une partie plus souple et extensible permettant la prise de repas sanguin.

La tique possède également plusieurs paires de pattes : quatre paires de pattes chez les tiques nymphes et adultes, trois paires de pattes chez les tiques larves. La paire de pattes la plus proche du capitulum possède un autre organe sensoriel en son extrémité : l'organe de Haller. Cet organe sensible à l'humidité et aux phéromones permet à la tique de repérer sa cible.

Répartition géographique et biotope

Selon la localisation, différentes espèces de tiques *Ixodes* sont vectrices de la bactérie *Borrelia*. On retrouve, par exemple, *I. scapularis* sur la côte est des Etats-Unis, *I. pacificus* sur la côte ouest des Etats-Unis, *I. ricinus* en Europe occidentale et *I. persulcatus* en Europe centrale et en Asie (Figure 7).

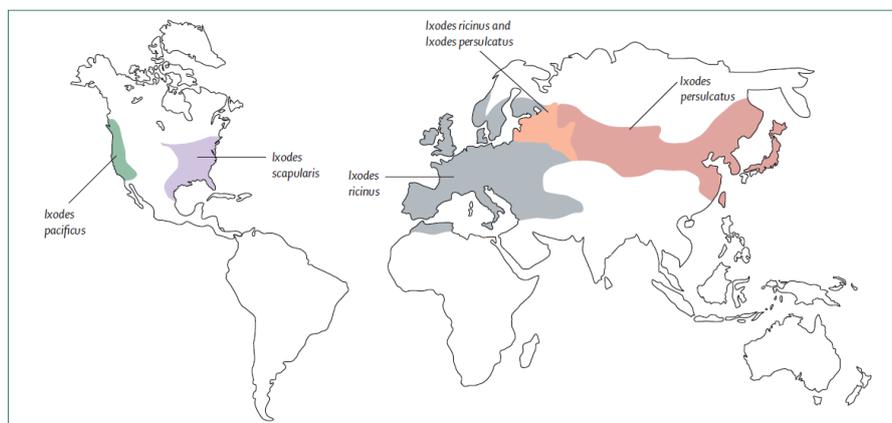


Figure 7 : Répartition géographique de la tique *Ixodes*. D'après (Staneek *et al.*, 2012).

différencient en mâle et femelle et la reproduction peut avoir lieu. Cinq à onze mois après le deuxième repas, les tiques femelles vont prendre un dernier repas sanguin d'environ sept jours sur des mammifères de grosse taille avant de pondre quelques milliers d'œufs et mourir. Les adultes mâles, quant à eux, ne se nourrissent que très rarement. (Piesman *et al.*, 2004 ; Stanek *et al.*, 2012)



Figure 9 : Stages de développement de la tique *Ixodes ricinus*.

D'après Stanek *et al.*, 2012. De la gauche vers la droite : larve, nymphe, adulte femelle, adulte mâle. La partie foncée du corps des tiques larve, nymphe et adulte femelle correspond à la partie rigide de l'idiosome : le scutum. Chez la tique adulte mâle, cette partie recouvre tout l'idiosome.

Au cours du cycle de développement, la tique consacre très peu de temps aux repas sanguins (environ 15 jours), par rapport au temps passé au sol à muer ou sur la végétation à rechercher un hôte (tique à l'affût). Durant cette période de quête, la tique reste immobile à l'extrémité d'un brin d'herbe ou d'une feuille, prête à s'agripper lorsqu'un hôte est assez proche.

Ce cycle de vie dure en moyenne deux à trois ans, mais cette durée peut être augmentée jusqu'à six ans lorsque les conditions d'humidité et de température ne sont pas adéquates (Piesman *et al.*, 2004).

C/ La salive de tique

Contrairement à d'autres espèces hématophages, comme les moustiques ou les tiques *Argasidae*, les tiques dures *Ixodidae*, réalisent au cours de leur cycle de développement trois repas sanguins de plusieurs jours chacun. Au cours de ses repas, la tique doit faire face à de nombreux obstacles. Tout d'abord elle est confrontée à l'hémostase, première réponse immunitaire lors d'une perte de sang. Ensuite, elle doit faire face aux réactions inflammatoires qui vont empêcher la prise de sang ou alerter l'hôte de sa présence. Enfin, elle doit empêcher son rejet par le système immunitaire.

Pour mener à terme son repas sanguin, la tique va utiliser sa salive. Cette salive, comme celle d'autres espèces hématophages telles que le moustique, contient de nombreuses molécules possédant des activités antihémostatique, anti-inflammatoire et immunosuppressive (Ribeiro *et al.*, 1985).

Activité antihémostatique

L'hémostase est un processus qui commence au moment d'une blessure et qui a pour but d'arrêter le saignement provoqué. L'hémostase comprend la vasoconstriction, l'agrégation plaquettaire et la coagulation sanguine. La salive de tique contient des molécules qui vont agir sur ces trois éléments. La **vasoconstriction** consiste en la diminution de la section des vaisseaux sanguins afin de restreindre la perte sanguine. L'**agrégation plaquettaire** est activée par différentes molécules libérées lors d'une blessure, par exemple le collagène, la thrombine, la cathepsine G, l'ATP ou l'ADP. Les récepteurs fibrinogènes des plaquettes vont alors avoir une forte affinité avec la fibrine, résultant en la formation d'un caillot fibrine/plaquette. La **coagulation** est responsable de la production de fibrine pour la formation du caillot précédent. Le processus de coagulation consiste en une cascade de réactions enzymatiques avec deux voies d'activation : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Figure 10).

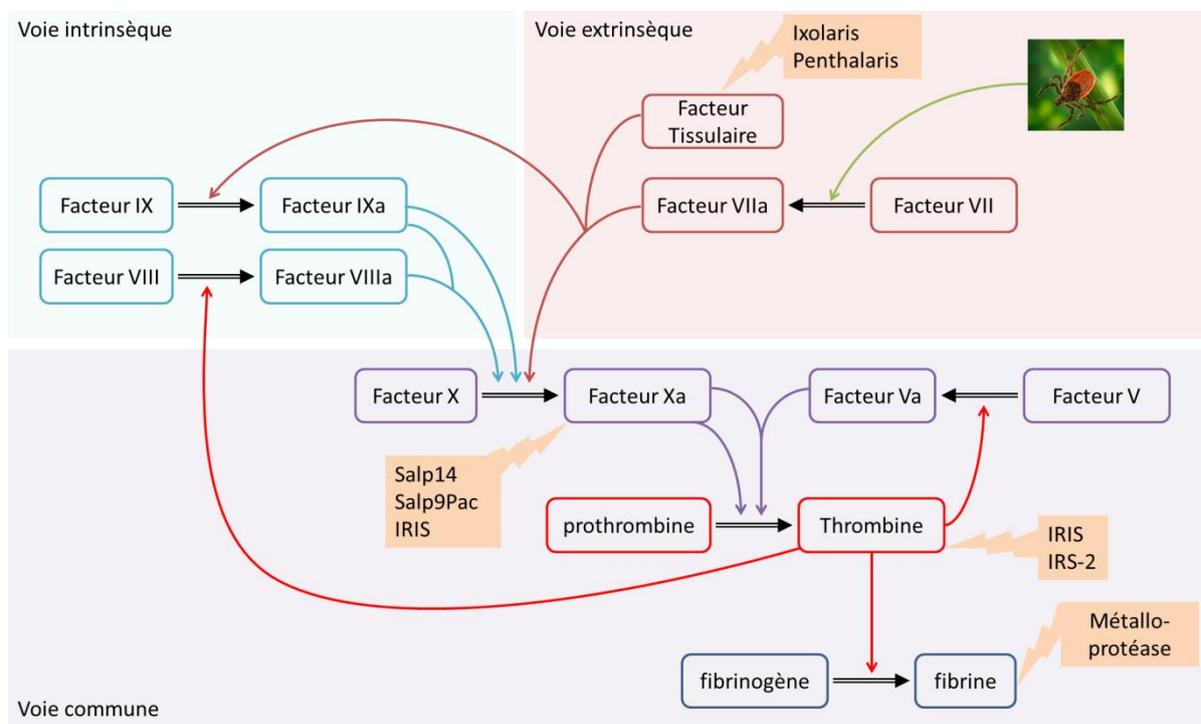


Figure 10 : Cascade de coagulation et influence de certaines molécules de salive de tique.

La voie extrinsèque de cascade de coagulation est activée après blessure d'un vaisseau sanguin par une piqûre de tique, impliquant l'activation du facteur VII (FVII), qui circule normalement à l'intérieur des vaisseaux sanguins, en FVIIa. Ce FVIIa entre en contact avec le facteur tissulaire (TF) et le complexe activé TF/FVIIa ainsi formé active le facteur X (FX) en FXa et facteur IX (FIX) en FIXa. Le FIXa active lui aussi le FX en FXa. Le facteur FXa active la thrombine qui produit la fibrine à partir du fibrinogène ou active les facteurs V (FV) et VIII (FVIII) en FVa et FVIIIa. Le FVIIIa se lie au facteur IXa (FIXa). Ensemble, ils activent le FX en FXa. Le FXa ainsi formé se lie au FVa précédemment formé et le complexe ainsi formé active, lui aussi, la thrombine. Mis à part les FV et FVIII, qui sont des glycoprotéines, les facteurs de cette cascade sont généralement des protéases à sérine. L'action de certaines protéines de salive de tique à différents niveaux de cette cascade de coagulation est représentée.

La **prostaglandine E2** (PGE2), qui a été mise en évidence chez *I. scapularis*, est un exemple de molécule ayant une fonction antiplaquettaire (Ribeiro *et al.*, 1985). Une fonction vasodilatatrice de la PGE2 a également été mise en évidence chez les tiques dures *Rhipicephalus microplus* (Dickinson *et al.*, 1976 ; Bowman *et al.*, 1996) et *Amblyomma americanum* (Ribeiro *et al.*, 1992), montrant ainsi une influence sur la vasoconstriction. Les enzymes de la famille des **apyrases** ou **adénosines diphosphatases**, sont également antiplaquettaires. Elles dégradent l'ADP et l'ATP, antagonistes de l'agrégation plaquettaire. La présence de ces enzymes a été montrée chez *I. scapularis* (Ribeiro *et al.*, 1985) mais également chez *R. sanguineus* (Liyou *et al.*, 1999) ou chez les tiques *Argasidae* (Mans *et al.*, 1998).

Les molécules ayant une fonction anticoagulante sont le troisième type de molécules à activité antihémostatique. Ce sont généralement des protéines contenant des domaines d'inhibiteur de protéase, qui interviennent à différents niveaux de la cascade de coagulation. Francischetti *et al.* ont mis en évidence la présence, chez *I. scapularis*, des molécules **Ixolaris** et **Penthalaris** possédant un et cinq domaines de Kunitz respectivement (Francischetti *et al.*, 2002, 2004). Ces molécules inhibent l'activation du FX par l'intermédiaire de l'inhibition du complexe TF/FVIIa (voie extrinsèque de la coagulation).

Au début des années 2000, Narasimhan *et al.* ont montré l'existence chez *I. scapularis* d'une famille de protéines, possédant un domaine basique en C-ter, parmi lesquelles **Salp14** (*salivary protein 14*), ayant un effet anticoagulant (Narasimhan *et al.*, 2002, 2004). Ces molécules vont empêcher la coagulation en inhibant le FX ou FXa. Dans cette famille, Narasimhan *et al.* ont également mis en évidence **une protéine de 9,8 kDa**, ayant une fonction anticoagulante. Cette protéine présente une séquence N-terminale homologue à Salp14 et à la protéine **Salp9Pac** (Salp9 putative anticoagulant) isolée d'une banque d'ADN complémentaire d'extrait de glandes salivaires de tiques *I. scapularis*, dont la fonction anticoagulante n'a pas été établie. D'autres molécules ont été identifiées comme inhibitrices du FXa chez d'autres espèces de tiques, notamment chez les tiques *Argasidae*. Ainsi nous pouvons citer le peptide TAP (*tick anticoagulant peptide*) chez *Ornithodoros moubata* (Waxman *et al.*, 1990) ou l'inhibiteur FXaI chez *O. savignyi* (Gaspar *et al.*, 1996).

Certaines molécules inhibent la cascade de coagulation en inhibant la production de thrombine. Chez *I. ricinus*, deux protéines appartenant à la famille des Serpines (*Serine Protease Inhibitor*) peuvent être citées : IRIS et IRS-2. **IRIS** (*I. ricinus immunosuppressor*) augmente à la fois les durées d'agrégation plaquettaire et de coagulation. Ces deux actions ne sont pas uniquement causées par l'effet sur la production de thrombine, mais également par l'inhibition du FXa (Prevot *et al.*, 2006). **IRS-2** (*I. ricinus serpin-2*) joue elle aussi un rôle sur différents éléments de l'hémostase : la coagulation, en affectant la production de thrombine à forte concentration, et l'agrégation plaquettaire, en inhibant la cathepsine G (Chmelar *et al.*, 2011). De nombreuses autres molécules inhibitrices de la thrombine ont été mises en évidence chez *O. savignyi*, *O. moubata*, *R. microplus*, *H. longicornis*, *A. variegatum*... (Hovius *et al.*, 2008b ; Chmelar *et al.*, 2012).

L'effet anticoagulant peut également être apporté par des molécules ayant une activité enzymatique sur la fibrine et le fibrinogène. Nous pouvons par exemple citer une **métallo-protéase** identifiée chez *I. scapularis* (Francischetti *et al.*, 2003).

Des protéines de type désintégrine, initialement mises en évidence dans le venin de serpent (McLane *et al.*, 2008), sont également contenues dans la salive de tique. Ces protéines possèdent un motif arginine-glycine-acide aspartique (RGD) pouvant lier les intégrines présentes à la surface des plaquettes empêchant la liaison de celles-ci avec la fibrine et donc l'agrégation plaquettaire. La fonction antiplaquettaire de ces protéines avec motif RGD a été prouvée à la fois chez des tiques *Ixodidae* et *Argasidae*. Ainsi nous pouvons retrouver les protéines variabiline (chez *Ixodidae/Dermacentor variabilis*), savignygrine (chez *Argasidae/O. savignyi*), monogrine (chez *Argasidae/Argas monolakensis*) (Chmelar *et al.*, 2012). Chez les tiques dures du genre *Ixodes*, des protéines avec un motif RGD ont été traduites et nommées **ixodegrines**. Cependant, leur activité antiplaquettaire n'a pas encore été montrée (Chmelar *et al.*, 2012).

Activité sur la réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense de l'organisme à la suite d'une agression externe. Cette réponse immunitaire est immédiate et n'est pas spécifique d'un antigène. Les différentes composantes de l'immunité innée comprennent les barrières physiques, chimiques et microbiologiques érigées par l'organisme, l'inflammation, la cascade du complément ou encore la phagocytose.

Les protéines **IRS-2** et **PGE2**, présentant une activité antihémostatique, ont respectivement une activité anti-inflammatoire et immunosuppressive. L'activité de la protéine IRS-2 repose sur son aptitude à inhiber la cathepsine G et la chymase (Chmelar *et al.*, 2011). Quant à la PGE2, elle perturbe la fonctionnalité des cellules dendritiques (Sá-Nunes *et al.*, 2007).

Différentes cellules, comme les mastocytes, les basophiles, les macrophages ou les éosinophiles, sont impliquées dans le processus de l'inflammation. Le rôle de la salive de tique sur ces cellules n'est pas clairement établi (Francischetti *et al.*, 2009). Cependant, des molécules présentes dans la salive possèdent une activité sur différents médiateurs de l'inflammation libérés par ces cellules dès qu'elles reconnaissent un corps étranger : la sérotonine, l'histamine, la bradykinine ou encore les leucotriènes. Ces médiateurs sont à l'origine des observations caractéristiques : douleur, rougeur et échauffement qui peuvent alerter l'hôte piqué, provoquant ainsi le retrait de la tique. Afin d'éviter cela, des molécules ayant une activité anti-inflammatoire sont contenues dans la salive de tique.

Une famille de molécules, les **lipocalines**, a la capacité de lier la sérotonine et/ou l'histamine, inhibant leur activité. De telles molécules ont été mises en évidence chez les tiques dures *R. appendiculatus* (Paesen *et al.*, 1999), *D. reticulatus* (Sangamnatdej *et al.*, 2002) ou *A. variegatum* (Ribeiro *et al.*, 2011). En 2008, une famille de quatorze lipocalines (*lipocalin from Ixodes ricinus*, **LIR1** à **LIR14**) a été identifiée chez *I. ricinus* (Beaufays *et al.*, 2008a). Cependant, aucune d'entre elles n'a

montré une capacité à lier l'histamine. En 2011, quatre lipocalines (*lipocalin from Ixodes persulcatus*, **LIPER-1 à LIPER-4**) ont été identifiées chez *I. persulcatus* (Konnai *et al.*, 2011). De la même façon que chez *I. ricinus*, elles n'ont pas montré d'affinité avec l'histamine. Parmi ces 18 protéines, seule la LIR6, renommée **Ir-LBP**, a montré une affinité pour le leucotriène LTB4 (Beaufays *et al.*, 2008b).

La salive de tique a également montré un effet d'hydrolyse de la bradykinine. Une **métallo-peptidase** a été identifiée comme responsable de cet effet chez *I. scapularis* (Ribeiro *et al.*, 1998).

La cascade du complément joue un rôle central lors de l'immunité innée. Cette cascade comprend 35 protéines différentes et peut être activée selon trois voies : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. La voie commune est activée par la reconnaissance d'un anticorps alors que les deux autres voies sont activées par la présence du pathogène. Ces trois voies mènent à l'activation de la C3 convertase et de la C5 convertase qui sont à l'origine de l'inflammation, l'opsonisation, la phagocytose des agents pathogènes et du recrutement des neutrophiles et des macrophages. La salive de tique contient plusieurs molécules agissant spécifiquement sur l'inhibition de la voie alterne de cette cascade (Figure 11). Seule cette voie sera présentée ici.

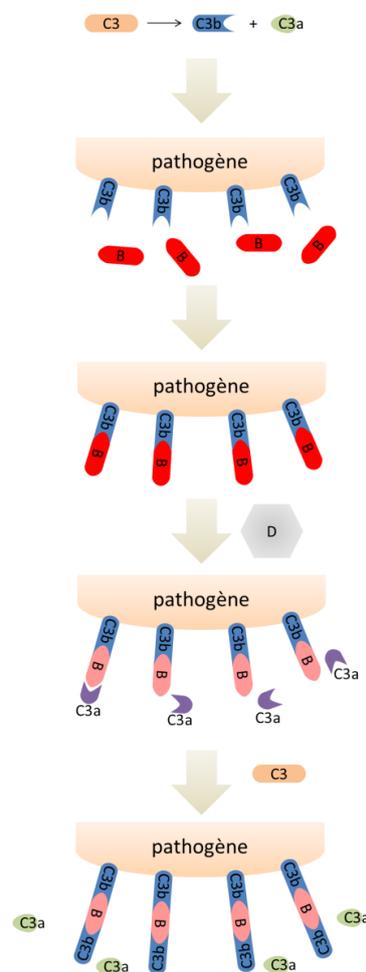


Figure 11 : Voie alterne de la cascade du complément.

La voie alterne du complément est activée lorsque les molécules C3b, obtenues à partir du clivage de C3, reconnaissent un agent pathogène et se fixent à celui-ci. Les molécules C3b fixées peuvent alors se lier au facteur B. En présence du facteur D, le facteur B du complexe C3bB se clive et le complexe **C3bBb**, ou **C3 convertase alterne**, se forme. Cette C3 convertase clive les molécules de C3, formant ainsi les molécules C3a et C3b. Les C3b peuvent alors se lier à l'agent pathogène comme précédemment ou alors se lier à la C3 convertase C3bBb, formant ainsi le complexe **C3bBbC3b**, ou **C5 convertase**.

Chez *I. scapularis*, deux protéines ont une activité dirigée contre la voie alterne du complément: **Isac** (*I. scapularis* salivary anticomplement) (Valenzuela *et al.*, 2000) et **Salp20** (*salivary protein 20*) (Tyson *et al.*, 2007). Ces protéines inhibent la formation du complexe entre le facteur B et le C3b, inhibant ainsi la C3 convertase alterne. Chez *I. ricinus*, plusieurs protéines homologues à ISAC ont été identifiées : **IRAC I** et **IRAC II** (*I. ricinus* anticomplement) (Daix *et al.*, 2007 ; Schroeder *et al.*, 2007), et **IxAC-B1 à IxAC-B5** (*Ixodes* anticomplement) (Couvreur *et al.*, 2008). IRAC I et IRAC II possèdent le même mode d'action que les protéines Isac et Salp20. Un autre mécanisme d'inhibition du complément a été montré pour les protéines IxAC-B. Ces protéines se lient spécifiquement à la properdine, protéine régulatrice de la voie alterne du complément qui forme un complexe avec la C3 convertase stabilisant cette molécule (Couvreur *et al.*, 2008). La C3 convertase est alors dégradée rapidement et la voie alterne du complément inhibée. Ce mécanisme a également été évoqué comme mode d'action de la protéine Salp20 (Tyson *et al.*, 2008).

La réponse immunitaire innée et l'inflammation peuvent également être perturbées par des protéines agissant sur les chimiokines et les cytokines. Ces molécules permettent la régulation de ces deux réactions de l'organisme hôte ainsi que le recrutement et l'activation des leucocytes sur le site de la blessure. Il a été montré un effet inhibiteur de la salive de tiques dures (*R. sanguineus*, *D. reticulatus*, *A. variegatum*, *I. ricinus*) sur ces molécules (Gwakisa *et al.*, 2001 ; Hajnická *et al.*, 2005). Trois protéines de la même famille ont montré une capacité à lier spécifiquement certaines cytokines ou chimiokines chez *R. sanguineus* : les protéines **Evasin-1, -3 et -4** (Frauensschuh *et al.*, 2007 ; Déruaz *et al.*, 2008 ; Vančová *et al.*, 2010a).

Au cours de la réaction immunitaire innée, les neutrophiles sont des leucocytes rapidement recrutés sur le site de la blessure. Ces cellules sont importantes non seulement lors de la phagocytose des agents étrangers, mais également lors de la production de chimiokines. La salive de tique *I. scapularis* est capable d'inhiber la fonction des neutrophiles (Ribeiro *et al.*, 1990). Deux protéines possédant cette activité ont récemment été identifiées : **ISL 929** et **ISL 1373** (Guo *et al.*, 2009).

Activité sur la réponse immunitaire adaptative

Il est également important pour la tique de combattre le système immunitaire adaptatif de son hôte qui se met en place plus tardivement. Cette réponse immunitaire est spécifique de l'antigène rencontré et les cellules jouant un rôle majeur sont les **lymphocytes B** et les **lymphocytes T**.

Les lymphocytes B expriment à leur surface des anticorps qui sont spécifiques de l'antigène ciblé. Ces cellules circulantes vont se différencier dès qu'elles le détectent et vont sécréter une quantité plus importante d'anticorps. L'inhibition de ces cellules, et donc de la production d'anticorps dirigés contre elles, est bénéfique pour la tique et empêche son rejet. La salive de *I. ricinus* possède une activité d'inhibition des lymphocytes B chez la souris (Hannier *et al.*, 2003). La protéine **BIP** (*B cell*

inhibitory protein) a été identifiée comme responsable de cette activité chez *I. ricinus* (Hannier *et al.*, 2004).

Les lymphocytes T, quant à eux, vont jouer un rôle crucial en détruisant les cellules étrangères. La protéine **Salp15** (*salivary protein 15*) est l'une des molécules les plus étudiées, inhibant la prolifération des lymphocytes T. Cette protéine, mise en évidence par le groupe d'Erol Fikrig chez *I. scapularis* (Das *et al.*, 2001) présente la particularité de lier spécifiquement les récepteurs CD4 des lymphocytes T, inhibant ainsi l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (Anguita *et al.*, 2002 ; Garg *et al.*, 2006). Il a également été montré que Salp15 lie les récepteurs DC-SIGN, ce qui a pour conséquence d'inhiber la production de cytokines et l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques (Hovius *et al.*, 2008c). Chez *I. ricinus*, trois protéines homologues de Salp15 ont été identifiées : **Salp15 Iric-1**, **Salp15 Iric-2** et **Salp15 Iric-3** (Hovius *et al.*, 2007). Une autre protéine d'*I. scapularis*, **IL-2 binding protein**, inhibe la prolifération des lymphocytes T en liant l'interleukine IL-2 produite par ceux-ci (Gillespie *et al.*, 2001). Enfin, les **sialostatines L et L2** influencent également la prolifération des lymphocytes T (Kotsyfakis *et al.*, 2006, 2007). Les sialostatines sont des cystatines, c'est-à-dire des protéines inhibitrices des protéases à cystéine comme les cathepsines ou les caspases. La sialostatine L, ayant une forte affinité pour la cathepsine L, est la première cystatine identifiée chez *I. scapularis*, et montre une activité sur la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques et sur l'inflammation (Kotsyfakis *et al.*, 2006).

Enfin, la protéine **IRIS**, présentant une activité antihémostatique, montre également une capacité à moduler la réponse immunitaire innée et adaptative. Elle agit non seulement sur l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires, mais également sur la modulation de l'activité des macrophages et des lymphocytes T (Leboulle *et al.*, 2002a, 2002b).

Le Tableau 4 récapitule l'activité des molécules identifiées dans la salive de tique.

Activité	Protéines	Espèce	Protéomique/ Transcriptomique	Référence
Sur l'hémostase	Prostaglandine E2	<i>I. scapularis</i>	P	(Ribeiro <i>et al.</i> , 1985)
	Apyrase	<i>I. scapularis</i>	P	(Ribeiro <i>et al.</i> , 1985)
	Ixolaris	<i>I. scapularis</i>	T	(Francischetti <i>et al.</i> , 2002)
	Penthalaris	<i>I. scapularis</i>	T	(Francischetti <i>et al.</i> , 2004)
	Salp14	<i>I. scapularis</i>	T/P	(Das <i>et al.</i> , 2001 ; Narasimhan <i>et al.</i> , 2002, 2004)
	Salp9pac*	<i>I. scapularis</i>	T	(Narasimhan <i>et al.</i> , 2002, 2004)
	Protéine de 9,8 kDa	<i>I. scapularis</i>	P	(Narasimhan <i>et al.</i> , 2002)
	IRIS	<i>I. ricinus</i>	T	(Leboulle <i>et al.</i> , 2002b ; Prevot <i>et al.</i> , 2006)
	IRS-2	<i>I. ricinus</i>	T	(Chmelar <i>et al.</i> , 2011)
	Métallo-protéase	<i>I. scapularis</i>	T/P	(Francischetti <i>et al.</i> , 2003)
Sur la réponse immunitaire innée	IRS-2	<i>I. scapularis</i>	T	(Chmelar <i>et al.</i> , 2011)
	PGE2	<i>I. scapularis</i>	P	(Sá-Nunes <i>et al.</i> , 2007)
	Ir-LBP	<i>I. ricinus</i>	T	(Beaufays <i>et al.</i> , 2008a, 2008b)
	Métallo-peptidase	<i>I. scapularis</i>	P	(Ribeiro <i>et al.</i> , 1998)
	ISAC	<i>I. scapularis</i>	T/P	(Valenzuela <i>et al.</i> , 2000)
	Salp20	<i>I. ricinus</i>	T	(Tyson <i>et al.</i> , 2007)
	Salp 15	<i>I. scapularis</i>	T	(Das <i>et al.</i> , 2001 ; Marchal <i>et al.</i> , 2009a, 2011)
	IRAC I / IRAC II	<i>I. ricinus</i>	T	(Daix <i>et al.</i> , 2007 ; Schroeder <i>et al.</i> , 2007)
	IxAC-B1 à IxAC-B2	<i>I. ricinus</i>	T	(Couvreur <i>et al.</i> , 2008)
ISL-929 / ISL-1373	<i>I. scapularis</i>	T	(Guo <i>et al.</i> , 2009)	
Sur la réponse immunitaire adaptative	BIP	<i>I. ricinus</i>	P	(Hannier <i>et al.</i> , 2004)
	Salp15	<i>I. scapularis</i>	T/P	(Das <i>et al.</i> , 2001 ; Anguita <i>et al.</i> , 2002 ; Garg <i>et al.</i> , 2006)
	Iric-1 à Iric-3	<i>I. ricinus</i>	T	(Hovius <i>et al.</i> , 2007)
	IL-2 binding protein	<i>I. scapularis</i>	P	(Gillespie <i>et al.</i> , 2001)
	Sialostatine L et L2	<i>I. scapularis</i>	T	(Kotsyfakis <i>et al.</i> , 2006, 2007)
	IRIS	<i>I. ricinus</i>	T	(Leboulle <i>et al.</i> , 2002a, 2002b)

Tableau 4 : Principales molécules de la salive de tique *Ixodes* montrant une activité confirmée sur l'hémostase et la réponse immunitaire.

Les méthodes qui ont permis l'identification de ces protéines sont indiquées : T = transcriptomique (méthodes basées sur la construction de banques d'ADN complémentaire) ou P = protéomique (méthodes basées sur l'analyse des protéines d'extrait de glandes salivaires). * : la fonction anticoagulante de la protéine Salp9pac n'a pas été confirmée.

III- Les bactéries *Borrelia burgdorferi* s.l

A/ Généralités

Taxonomie

L'agent pathogène de la borréliose de Lyme est un spirochète appartenant à l'ordre des *Spirochaetales*, à la famille des *Spirochaetaceae* et au genre des *Borrelia* (Paster *et al.*, 2000). Au sein du genre *Borrelia*, deux groupes de bactéries se distinguent : les bactéries responsables de la maladie de Lyme transmises par les tiques *Ixodidae*, regroupées dans le complexe ***Borrelia burgdorferi sensu lato***, et les bactéries responsables des fièvres récurrentes transmises par les poux, certaines tiques *Ornithodoros* et *I. scapularis*.

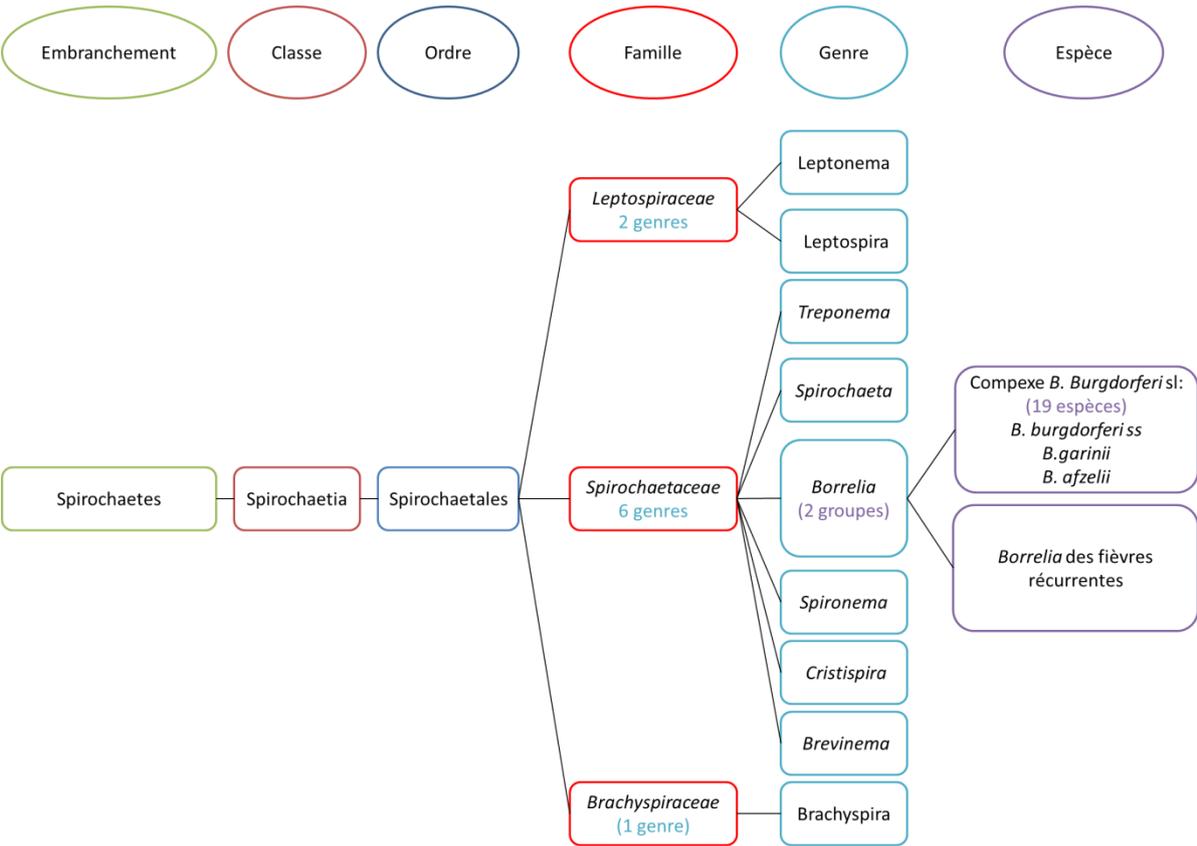


Figure 12 : Taxonomie des bactéries *Borrelia*.

Les principales espèces du groupe *B. burgdorferi* s.l sont présentées ici. D'après (Paster *et al.*, 2000 ; Mannelli *et al.*, 2012).

Le complexe *B. burgdorferi* sl comprend 19 espèces, décrites au cours de ces trente dernières années. Parmi ces espèces, seules trois ont été confirmées comme agent principal pathogène de la maladie de Lyme : ***B. burgdorferi sensu stricto***, ***B. garinii*** et ***B. afzelii***. D'autres espèces, détectées dans des cas isolés de la maladie, présentent un caractère pathogène potentiel : *B. bavariensis*, *B. spielmanii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. bissettii*, *B. finlandensis*, *B. kurtenbachii* (Rudenko *et al.*, 2011 ; Stanek *et al.*, 2011a ; Mannelli *et al.*, 2012)

Morphologie

Les spirochètes sont des bactéries extrêmement mobiles, de forme hélicoïdale et possèdent une morphologie caractéristique comprenant un cylindre protoplasmique, des flagelles, un espace périplasmique et une membrane externe (Rosa *et al.*, 2005). Le cylindre protoplasmique central est entouré par l'espace périplasmique. Dans cet espace, délimité par la membrane externe, se trouve une dizaine de flagelles (Barbour *et al.*, 1986), ancrés dans la membrane cytoplasmique en leurs extrémités et enroulés autour du cylindre protoplasmique. Ce sont ces flagelles qui confèrent à la bactérie sa forme particulière spiralée et sa forte mobilité (Rosa *et al.*, 2005).

La longueur des bactéries varie de 8 μm (*B. coriaceae*) à 30 μm (*B. burgdorferi* sl) et la largeur varie entre 0,2 μm (*B. burgdorferi* sl) et 0,5 μm (*B. recurrentis* et *B. persica*) (Barbour *et al.*, 1986).

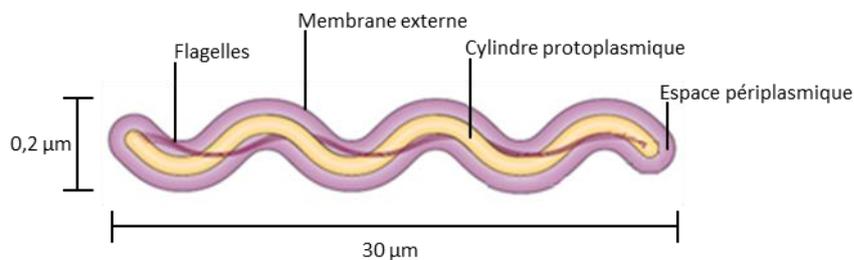


Figure 13 : Morphologie de la bactérie *Borrelia burgdorferi*.
D'après (Rosa *et al.*, 2005).

Répartition géographique

La répartition géographique de la bactérie *Borrelia* est intimement liée à celle de la tique du genre *Ixodes*. Comme pour les tiques, la répartition des différentes espèces de *Borrelia* dépend de la localisation géographique. Parmi les espèces fréquemment impliquées en pathologie humaine, seule *B. burgdorferi* ss est présente aux Etats-Unis, alors que les trois espèces *B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, *B. afzelii* le sont en Europe (Tableau 5).

Espèces de <i>B. burgdorferi</i> sl	Localisation géographique
<i>B. californiensis</i>	Amérique du nord
<i>B. americana</i>	Amérique du nord
<i>B. carolinensis</i>	Amérique du nord
<i>B. kurtenbachii</i>	Amérique du nord
<i>B. andersonii</i>	Amérique du nord
<i>B. burgdorferi</i> ss	Amérique du nord/Europe
<i>B. bissettii</i>	Amérique du nord/Europe/Asie
<i>B. lusitaniae</i>	Europe
<i>B. afzelii</i>	Europe
<i>B. bavariensis</i>	Europe
<i>B. spielmanii</i>	Europe
<i>B. finlandensis</i>	Europe
<i>B. garinii</i>	Europe/Asie
<i>B. valaisiana</i>	Europe, Asie
<i>B. janonica</i>	Asie
<i>B. turdi</i>	Asie
<i>B. tanukii</i>	Asie
<i>B. sinica</i>	Asie
<i>B. yangtze</i>	Asie

Tableau 5 : Localisation des différentes espèces bactériennes du complexe *B. burgdorferi* sensu lato. D'après (Rudenko *et al.*, 2011 ; Stanek *et al.*, 2011a ; Mannelli *et al.*, 2012).

B/ Le génome de la bactérie

La bactérie *Borrelia* est également caractérisée par son génome particulier. En effet, alors que la majorité des bactéries possède un chromosome et des plasmides circulaires, *Borrelia* possède un chromosome linéaire d'environ 900 kb, et un nombre important de plasmides à la fois circulaires et linéaires. L'ensemble de ces plasmides constitue 40 % de son génome total et représente l'élément extra chromosomique le plus important décrit chez une bactérie (Stewart *et al.*, 2005).

Pendant plus d'une dizaine d'années, seul le génome de la souche B31 de *B. burgdorferi* ss était totalement séquencé (Fraser *et al.*, 1997 ; Casjens *et al.*, 2000). Ce génome comprend un ensemble de 21 plasmides dont 9 circulaires et 12 linéaires. Depuis 2011 et les travaux de Schutzer, 13 autres souches de *B. burgdorferi* ss ont été séquencées, ainsi que trois souches de *B. afzelii*, quatre de *B. garinii*, une de *B. bissettii*, une de *B. valaisiana*, une de *B. spielmanii* et une de *B. finlandensis* (Casjens *et al.*, 2011a, 2011b, 2011b ; Schutzer *et al.*, 2011, 2012 ; Brenner *et al.*, 2012 ; Jiang *et al.*, 2012).

C/ La transmission de la bactérie

La survie et la transmission entre les hôtes vertébrés de la bactérie sont assurées grâce à la tique *Ixodes* lors de son cycle de développement (Figure 8). Après éclosion, les larves sont généralement non infectées. En effet, l'infection trans-ovarienne est un phénomène rare chez la tique du genre *Ixodes* (Richter *et al.*, 2012 ; Rollend *et al.*, 2013). La larve n'est donc que très peu responsable de l'infection d'un hôte. Les larves et les nymphes peuvent acquérir la bactérie lors de leur repas sanguin, si celui-ci est réalisé sur un hôte infecté et pourront être responsables de l'infection d'un hôte au cours du repas sanguin suivant (Figure 14). Certains hôtes jouent le rôle de réservoir de *B. burgdorferi* sl. Ces hôtes réservoirs, qui causeront l'infection des larves ou des nymphes, sont généralement des rongeurs, comme la souris, le rat, la musaraigne ou le campagnol, ou des oiseaux, comme le rouge-gorge, le merle ou le pingouin (Gern *et al.*, 1998 ; Piesman *et al.*, 2004).

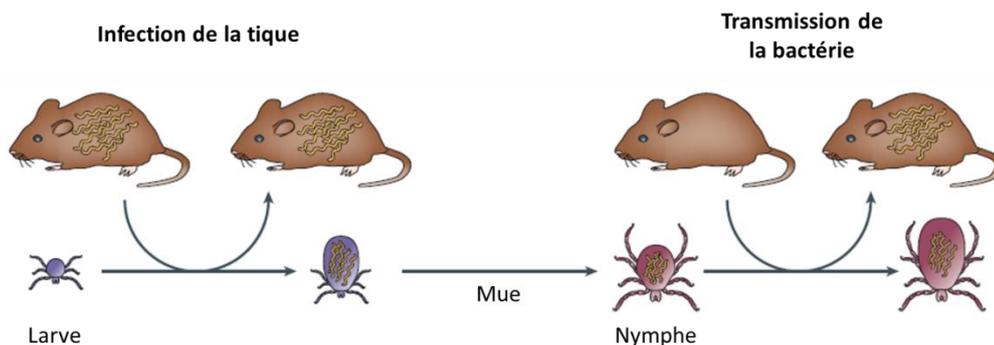


Figure 14 : Cycle d'infection par la bactérie *B. burgdorferi*.

D'après (Rosa *et al.*, 2005).

La tique larve non infectée acquiert la bactérie au cours de son repas sanguin sur un hôte vertébré si celui-ci est infecté, puis la tique mue en nymphe. Lors de cette mue les bactéries restent dans l'intestin de la tique. La nymphe procède ensuite à son repas sanguin, au cours duquel elle peut transmettre la bactérie à un hôte vertébré non infecté.

Lors du repas sanguin causant l'infection de la tique, les bactéries infestent rapidement l'intestin de celle-ci, entre 24 et 48h (Gern *et al.*, 1996). Elles restent essentiellement localisées dans l'intestin tout au long de la mue. Au cours des premières heures du repas sanguin suivant la mue, les bactéries se trouvent toujours dans l'intestin et commencent à se multiplier abondamment (Schwan *et al.*, 2002). Elles migrent ensuite de l'intestin vers les glandes salivaires, puis elles sont injectées au niveau du site de piqûre conjointement avec la salive de tique. Le risque de transmission, étroitement lié au délai de migration des bactéries dans les glandes salivaires, est faible au cours des premières heures du repas sanguin et augmente avec la durée de ce dernier. Il a été montré que la transmission par *I. scapularis* peut survenir 24h après le début du repas sanguin, mais l'efficacité maximale est obtenue à 72h (Piesman *et al.*, 1987). En Europe, il semble que ce délai d'infection soit plus court, de l'ordre de 17h (Piesman *et al.*, 2004). Plus généralement, il semble que la dynamique de transmission de la bactérie dépende non seulement du vecteur mais également de l'espèce pathogène (Crippa *et al.*,

2002). Dans cette étude, Il est montré que *B. afzelii* est transmise plus rapidement que *B. burgdorferi* ss de la tique *I. ricinus* à l'hôte.

Au cours de ce cycle de vie, *Borrelia* doit faire face à différentes conditions. Par exemple, dans l'intestin de la tique, la bactérie se trouve dans un environnement à température ambiante et légèrement basique, alors qu'au niveau cutané d'un mammifère, l'environnement est neutre à environ 37-39°C. Afin de passer d'un environnement à l'autre, la bactérie va alors modifier l'expression de ses protéines de surface (Yang *et al.*, 2000).

Expression protéique de *Borrelia* dans la tique lors de l'infection de celle-ci

Au cours de la prise de repas sanguin par la tique sur un hôte infecté, les bactéries sur-expriment les protéines de surface **OspA** et **OspB**. Il a été montré que ces protéines sont essentielles lors de la transmission de la bactérie, notamment pour la colonisation et la survie de *Borrelia* dans l'intestin de la tique (Yang *et al.*, 2004). Les bactéries se lient, par l'intermédiaire de OspA, aux récepteurs pour OspA (TROSPA, *Tick Receptor for OspA*), présents à la surface de l'intestin de la tique (Pal *et al.*, 2004). Bien que l'importance du rôle d'OspB ait été montrée (Fikrig *et al.*, 2004 ; Neelakanta *et al.*, 2007), les récepteurs de cette protéine, différents de ceux de OspA (Pal *et al.*, 2004), restent pour le moment non identifiés.

A la suite de ce repas sanguin, et jusqu'au repas sanguin suivant, les *Borrelia* vont majoritairement rester confinées dans l'intestin de la tique.

Expression protéique de *Borrelia* dans la tique lors de l'infection de l'hôte

Lorsqu'une tique infectée pique un hôte, elle va pouvoir lui transmettre des bactéries. Au début de ce repas sanguin, les bactéries restent dans l'intestin de la tique et se multiplient rapidement. Les bactéries, exprimant jusqu'alors OspA, diminuent l'expression de cette protéine et augmentent celle de la protéine **OspC** (Pal *et al.*, 2000). Elles commencent ensuite à migrer de l'intestin vers les glandes salivaires *via* l'hémolymphe (Schwan, 2003). Ce processus de régulation protéique a été observé chez différentes souches et différentes espèces de *Borrelia*, en Europe et aux Etats-Unis (Schwan *et al.*, 1995 ; Fingerle *et al.*, 2002). Cependant il existe quelques variations : alors que la protéine OspC n'est pas exprimée dans l'intestin d'*I. scapularis* infectée à jeun (Schwan *et al.*, 1995), elle a été détectée chez *I. ricinus* (Leuba-Garcia *et al.*, 1998). De plus, la probabilité d'infection des glandes salivaires chez la tique à jeun est plus élevée chez *I. ricinus* par rapport à *I. scapularis* (Lebet *et al.*, 1994). Ces différentes observations peuvent expliquer le délai d'infection plus court observé chez l'espèce européenne.

Le mécanisme qui guide ce changement d'expression des protéines de surface de *Borrelia* est complexe. La température semble être un des paramètres. Avec l'ingestion de sang de l'hôte, la

température de la tique, initialement à température ambiante, augmente. Des études *in vitro* ont montré que l'augmentation de température à 37°C, température du sang et de la peau de l'hôte, influence l'expression des lipoprotéines de surface de la bactérie en augmentant la production d'OspC et en diminuant la production d'OspA (Schwan *et al.*, 2000). Le pH dans l'intestin de la tique modifie également l'expression d'OspC. L'ingestion de sang décroît le pH dans l'intestin d'un pH basique à 7-7,4, induisant une augmentation d'OspC (Carroll *et al.*, 1999).

Lorsque la tique a terminé son repas sanguin et qu'elle se détache de l'hôte, l'expression d'OspC diminue rapidement à la surface des bactéries restantes dans la tique (Schwan *et al.*, 2000). Lors de cette même étude, Schwan *et al.* ont montré qu'OspC n'était pas du tout exprimée lors de l'acquisition de la bactérie par la tique, corroborant ainsi le rôle important de cette protéine au moment de l'infection d'un hôte.

Expression protéique de *Borrelia* dans l'hôte lors de l'infection de celui-ci

De nombreuses études ont été menées sur la protéine OspC, afin de déterminer son rôle dans l'organisme hôte lors de l'infection. Ces études soulignent l'importance de cette protéine au début de l'infection (Grimm *et al.*, 2004 ; Tilly *et al.*, 2006). En effet, les spirochètes déficients en OspC, sont capables de migrer dans les glandes salivaires de la tique puis dans l'hôte, mais sont rapidement éliminés de l'organisme hôte. Après l'infection, OspC disparaît rapidement de la surface de la peau et ne semble pas nécessaire à la persistance de la bactérie (Tilly *et al.*, 2007).

Lorsque des pathogènes entrent dans l'organisme, ceux-ci sont reconnus par des récepteurs de l'immunité innée : les TLRs (*Toll like receptor*). Ces récepteurs, semblables aux récepteurs Toll chez la drosophile, sont des protéines transmembranaires dont le domaine extra-cellulaire permet la reconnaissance spécifique de protéines et le domaine intracellulaire induit le signal d'activation en se couplant à des molécules adaptatrices comme Myd88. Cette réponse face à un agent pathogène provoque la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. Dix récepteurs TLR (TLR1 à TLR10) ont été identifiés chez l'homme, et le TLR2 montre une affinité pour les lipoprotéines ou lipopeptides portant le motif Pam₃Cys. Les protéines Osp, exprimées à la surface de *Borrelia* sont des lipoprotéines portant ce motif Pam₃Cys. Les *Borrelia* interagissent donc avec les récepteurs TLR2 des cellules de l'hôte (Hirschfeld *et al.*, 1999).

Borrelia exprime également des molécules qui vont interagir avec la matrice extracellulaire, non seulement dans la peau mais également au niveau des différents organes dans lesquels la bactérie se dissémine. L'interaction avec cette matrice paraît tout autant essentielle pour la persistance de l'infection que l'échappement du système immunitaire (Cabello *et al.*, 2007). Certaines études suggèrent un rôle de niche protectrice de cette matrice face à la réponse immunitaire (Liang *et al.*, 2004). Ces interactions sont dues aux molécules de salive de tique jouant le rôle d'adhésine, en liant différentes protéines de l'hôte. Nous pouvons citer, par exemple, **DbpA** et **DbpB** (*Decorin Bindin*

Protein A/B) liant la décorine, **BBK32** liant la fibronectine, **Bgp** (*Borrelia gap binding protein*) et **BBK32** liant les peptidoglycanes ou **P66** liant les intégrines (Coburn *et al.*, 2005).

Comme pour la tique, lorsque *Borrelia* entre dans un organisme hôte, elle doit, dans un premier temps, lutter contre le système immunitaire de celui-ci.

La cascade du complément est un des processus mis en œuvre par l'organisme pour se défendre contre les agents infectieux. Afin de protéger ses propres cellules de cette cascade, l'organisme hôte exprime à la surface de celles-ci des protéines régulatrices de l'activation de la cascade du complément. Ces protéines agissent sur la C3b convertase, induisant sa dégradation. La bactérie exprime alors des protéines lui permettant d'échapper à sa destruction en liant certains facteurs de régulation. Parmi ces protéines se distinguent les protéines **CRASP** (*complement regulator-acquiring surface protein*) et les protéines **Erp** (*OspC/E-related protein*). Elles lient les facteurs H et/ou facteur FHL-1, induisant l'inhibition de l'activation de la voie alterne du complément. Cinq protéines CRASP ont été identifiées chez *B. burgdorferi* ss, *B. garinii* et *B. afzelii* (Kraiczy *et al.*, 2001a). Les protéines CRASP-1 et CRASP-2, ont une affinité pour le facteur H et le facteur FHL-1 (Kraiczy *et al.*, 2001b), et les protéines CRASP-3 (ErpP), CRASP-4 (ErpC) et CRASP-5 (ErpA) ont uniquement une affinité pour le facteur H (Alitalo *et al.*, 2002 ; Mannelli *et al.*, 2012). D'autres molécules appartenant à cette famille des Erp ont été identifiées, notamment OspE et ses homologues (Hellwage *et al.*, 2001 ; Alitalo *et al.*, 2002 ; Kraiczy *et al.*, 2013).

Comme nous l'avons vu pour le vecteur, la réponse immunitaire innée, non spécifique, est mise en place rapidement lors de la détection d'un antigène. Cette réponse va également être à l'origine de la réponse immunitaire adaptative. Afin d'échapper à leur destruction par les anticorps anti-VlsE, les *Borrelia* mettent en œuvre une stratégie de variation antigénique de la protéine **VlsE** (Zhang *et al.*, 1997). VlsE est rapidement exprimée lors de l'infection d'un hôte et semble essentielle pour la persistance de la bactérie dans l'organisme hôte. En effet, l'absence du plasmide portant le gène codant VlsE induit une décroissance du taux d'infection par *Borrelia* (Labandeira-Rey *et al.*, 2003 ; Bankhead *et al.*, 2007). Le gène codant cet antigène subit des recombinaisons génétiques, induisant l'expression de plusieurs variants de VlsE. L'efficacité de la destruction de *Borrelia* par l'anticorps est donc altérée et la bactérie persiste dans l'organisme.

Comme nous l'avons vu, la bactérie est injectée conjointement avec la salive de tique. Nous avons également vu que la salive de tique contient un ensemble de molécules ayant de nombreuses activités pharmacologiques. La bactérie peut donc détourner l'effet de ces molécules à ses fins. Une des interactions les plus marquantes entre la tique et la bactérie est l'interaction entre **OspC** et **Salp15**. Une étude de 2005 montre que cette interaction chez *I. scapularis* permet de protéger les bactéries en retardant la reconnaissance d'OspC par les anticorps et d'augmenter le taux d'infection (Ramamoorthi *et al.*, 2005a). Chez *I. ricinus*, des résultats similaires ont été obtenus avec l'analogue **Iric-1** de Salp15 (Hovius *et al.*, 2008a).

Le succès de l'infection d'un hôte mammifère par l'agent pathogène responsable de la maladie de Lyme est dû non seulement à l'agent pathogène lui-même (bactéries du groupe *B. burgdorferi* sl) qui modifie l'expression de ces protéines, mais également au vecteur (tiques du genre *Ixodes*) qui va aider les bactéries à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte, et à l'hôte lui-même qui combat l'intrusion. Il est donc important de décrypter les mécanismes d'interactions entre ces trois acteurs-pathogène/vecteur/hôte - afin de développer de nouvelles stratégies vaccinales ou diagnostiques.

Chapitre II : Les outils et stratégies pour l'analyse protéomique

Le **protéome**, terme introduit par Wilkins dans les années 1990 (Wilkins *et al.*, 1996), représente l'ensemble des **PROTE**ines exprimées par un gén**OME** dans une cellule, un tissu ou un organisme. En fonction du cycle cellulaire, de la réponse à une contrainte (biologique ou physique) ou de l'état physiopathologique d'un organisme, un génome peut exprimer différents protéomes. Le terme protéomique désigne alors l'étude dynamique de l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule donnée, comprenant leurs isoformes et leurs modifications, la mise en évidence de leur structure et de leurs interactions avec d'autres protéines, l'ADN ou l'ARN.

Selon le type de projet, différentes informations peuvent être recherchées dans le cadre d'une analyse protéomique par spectrométrie de masse. Pour obtenir la caractérisation et l'identification de la protéine, deux types de stratégies peuvent être envisagés : les approches « top-down » et *bottum-up*. La première consiste à obtenir des informations de séquence à partir de la protéine entière (McLafferty *et al.*, 2007). La seconde consiste à obtenir ces mêmes informations à partir de fragments de la protéine, obtenus par digestion enzymatique. Cette digestion peut être réalisée après une première étape de séparation des protéines (électrophorèses, HPLC) ou directement sur l'échantillon non traité (approche *shotgun*). Dans ce chapitre nous décrivons les approches *bottum-up* qui sont les plus utilisées en analyse protéomique.

I- Les techniques séparatives de protéines et de peptides

Les échantillons biologiques qui font l'objet d'analyses protéomiques sont généralement des mélanges complexes et les concentrations des protéines peuvent s'étendre sur des gammes dynamiques étendues. De ce fait, ils ne peuvent pas être analysés directement par spectrométrie de masse.

Une étape de préfractionnement des échantillons avant l'analyse par spectrométrie de masse est généralement réalisée afin de réduire leur complexité. Cette étape peut être effectuée directement sur l'échantillon biologique, elle est alors basée sur la séparation des protéines contenues dans le mélange, ou/et après digestion enzymatique de l'échantillon, elle est alors basée sur la séparation des peptides obtenus. Les techniques de séparation les plus utilisées en analyse, sont l'électrophorèse sur gel et la chromatographie liquide haute performance.

A/ La séparation par électrophorèse sur gel

L'électrophorèse consiste à séparer des molécules chargées, peptides ou protéines dans notre cas, sous l'effet d'un champ électrique. Le gel généralement utilisé pour la séparation de protéines est composé de polyacrylamide (PAGE, *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) et la séparation peut se faire selon une dimension (1DE) ou selon deux dimensions (2DE) (Rabilloud *et al.*, 2009).

Le gel de polyacrylamide est constitué d'un réseau entre les chaînes de polyacrylamide, formées à partir de la polymérisation de molécules d'acrylamide, et des molécules de N,N-méthylène bisacrylamide, jouant le rôle d'agent réticulant. Les protéines migrent au travers des mailles formées par le gel en fonction de leur taille et de leur charge. Selon la réticulation du gel, déterminée par la concentration en acrylamide/bisacrylamide, les protéines migrent plus ou moins bien dans celui-ci : plus le pourcentage d'acrylamide/bisacrylamide est élevé, plus les mailles sont petites, et les protéines traversent moins facilement le gel. Il convient donc d'adapter la concentration en acrylamide/bisacrylamide à la taille des protéines à séparer.

Electrophorèse 1DE

La séparation monodimensionnelle de protéines peut se faire en conditions natives (Native PAGE, Blue Native-PAGE (Schägger *et al.*, 1991), Clear Native PAGE (Schägger *et al.*, 1994) ou High Resolution Clear Native PAGE (Wittig *et al.*, 2007)), ou le plus fréquemment en conditions dénaturantes, en utilisant un détergent comme le dodécylsulfate de sodium (SDS).

L'électrophorèse 1DE est apparue dans les années 70 (Laemmli, 1970), et reste aujourd'hui largement utilisée en analyse protéomique. Cette séparation repose sur l'utilisation du SDS, qui se fixe aux protéines et favorise leur dénaturation et leur solubilisation. De plus, le SDS leur confère une charge négative globale, qui masque totalement leur charge intrinsèque. De ce fait, la densité de charge est identique pour chaque protéine et leur séparation dans un champ électrique est uniquement dirigée par la masse moléculaire. Un exemple de gel est présenté en Figure 15.

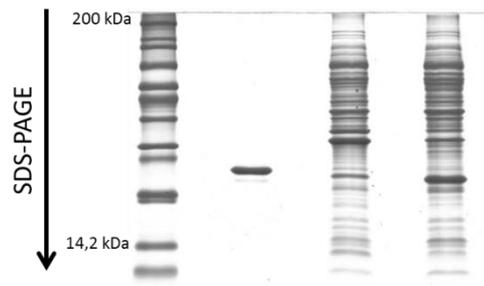


Figure 15 : Exemple de gel d'électrophorèse 1DE SDS-PAGE.

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire dans une gamme de masse dépendant de la réticulation du gel. Ce gel présente, de gauche à droite, la séparation obtenue pour les marqueurs de point moléculaire, une protéine recombinante purifiée et deux culots bactériens de *Borrelia*.

Les protéines contenues dans une bande de gel sont ensuite digérées par une enzyme, puis après extraction du gel, les peptides obtenus sont analysés par spectrométrie de masse.

Les principaux avantages de cette technique de séparation sont l'excellente capacité de solubilisation des protéines, même hydrophobes, grâce au SDS et sa simplicité de mise en œuvre. De ce fait, l'électrophorèse 1DE est classiquement utilisée comme étape de fractionnement avant des analyses LC-MS/MS. Il a été montré que cette stratégie (1DE-LC-MS/MS) était la plus reproductible et permettait d'identifier un maximum de protéine par rapport à des stratégies avec une isoélectrofocalisation ou une séparation par chromatographie liquide comme étape de préfractionnement (Cottingham, 2010). Cependant, le pouvoir de séparation reste relativement faible et de nombreuses protéines peuvent être contenues dans une bande du gel. Une étape de séparation des peptides par chromatographie liquide peut alors s'avérer nécessaire avant l'analyse par spectrométrie de masse.

Electrophorèse 2DE

Afin d'augmenter le pouvoir séparateur de l'électrophorèse, une première dimension peut être effectuée : l'isoélectrofocalisation. L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel a été proposée par O'Farrell en 1975 (O'Farrell, 1975) et a été facilitée par l'introduction des bandelettes à gradient de pH immobilisé pour l'isoélectrofocalisation dans les années 1980 (Görg *et al.*, 1987).

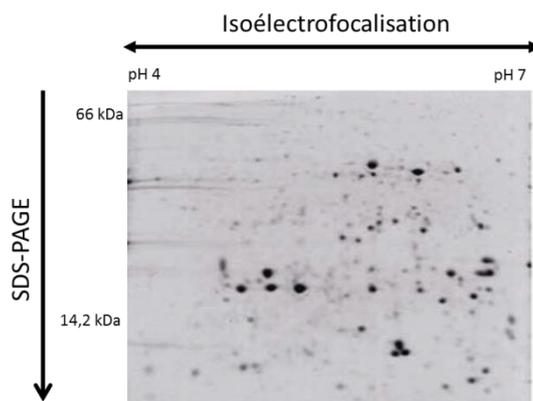


Figure 16 : Gel d'électrophorèse 2DE.

D'après (Roepstorff, 2012). Les protéines sont séparées selon une première dimension en fonction de leur point isoélectrique. Puis, elles sont séparées selon une seconde dimension en fonction de leur masse moléculaire.

Dans la première dimension, les protéines sont séparées en fonction de leur point isoélectrique (pI). Dans la seconde dimension, les protéines sont séparées par SDS-PAGE en fonction de leur masse moléculaire. Cette méthode permet d'obtenir une très bonne séparation des protéines. Cependant, elle présente quelques inconvénients. En effet, elle n'est pas appropriée pour la détection de protéines hydrophobes, membranaires ou basiques, et les protéines minoritaires, dont l'intensité des spots est très faible, sont peu, voire pas détectées après coloration des gels. Pour améliorer la détection des protéines, de nombreuses optimisations ont porté sur la préparation d'échantillon et sur les méthodes de coloration des gels (Rabilloud *et al.*, 2010). La préparation d'échantillon, avec l'utilisation d'agents chaotropiques et de détergents dans le tampon de solubilisation, doit être menée en fonction de l'échantillon biologique à traiter (Rabilloud *et al.*, 2011). Les trois principales techniques de coloration utilisées pour la détection des protéines sur le gel sont les colorations avec une solution colloïdale de bleu de Coomassie, avec du nitrate d'argent ou avec des molécules fluorescentes (Rabilloud *et al.*, 2011). La coloration organique au bleu de Coomassie (Neuhoff *et al.*, 1988 ; Candiano *et al.*, 2004) présente une bonne linéarité et est compatible avec la spectrométrie de masse mais souffre d'une sensibilité limitée. La coloration au nitrate d'argent (Switzer *et al.*, 1979) est plus sensible mais n'est pas linéaire et pose des problèmes de compatibilité avec la spectrométrie de masse. Des solutions ont été apportées pour rendre cette coloration compatible avec la spectrométrie de masse mais elles restent non linéaires (Chevallet *et al.*, 2008). La coloration fluorescente (SYPRO Ruby, Deep Purple) est une méthode sensible présentant une bonne linéarité et une bonne compatibilité avec la spectrométrie de masse. Cependant, cette technique est beaucoup plus onéreuse. Une dernière limitation est le côté chronophage de la mise au point de cette stratégie selon les échantillons à traiter, particulièrement pour l'étape de préparation d'échantillon.

Malgré toutes ces limitations, l'électrophorèse 2DE a permis de répondre à de nombreuses questions biologiques et reste aujourd'hui la méthode la plus résolutive pour la séparation de protéines, particulièrement pour la séparation d'isoformes (Roepstorff, 2012).

B/ La chromatographie liquide haute performance

Une alternative à la séparation des protéines par électrophorèse sur gel est la séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Comme l'électrophorèse sur gel, cette technique peut être envisagée pour la séparation de protéines mais elle est également très utilisée pour la séparation des peptides après digestion enzymatique. L'HPLC est facilement couplée à la spectrométrie de masse, particulièrement avec les sources d'ionisation electrospray.

HPLC sur phase inverse

L'HPLC sur phase inverse (RP-HPLC) permet de séparer des composés en fonction de leur polarité. Cette séparation est basée sur la différence d'affinité des molécules entre une phase stationnaire hydrophobe et une phase mobile liquide dont la polarité peut évoluer au cours du temps (élution en mode gradient). Les phases stationnaires les plus couramment utilisées pour la séparation des peptides/protéines sont les phases dites C4, C8 ou C18, où des chaînes de 4, 8 ou 18 carbones ont été greffées sur les silanols de la silice. La phase C4 est plus adaptée pour la séparation de protéines et les phases C8 et C18 pour les peptides. D'autres phases sont également utilisées pour la séparation des peptides sur phase inverse : les phases monolithiques polymériques (Svec *et al.*, 2006). La phase mobile est constituée d'un mélange d'eau et d'un solvant plus moins polaire tel que le méthanol ou l'acétonitrile. Ces solvants volatils sont particulièrement appropriés au couplage direct avec la spectrométrie de masse.

Autres techniques d'HPLC

Les protéines et peptides peuvent également être séparés par chromatographie échangeuse de cations ou d'anions (SCX, *strong cation chromatography* ou SAX, *strong anion chromatography*) ou par chromatographie d'exclusion stérique (SEC, *size exclusion chromatography*).

En chromatographie échangeuse d'ions, les molécules sont séparées en fonction de leur interaction électrostatique avec la phase stationnaire chargée. Les facteurs importants lors de cette séparation sont le pH de la phase mobile, qui doit être adapté au pI des molécules à séparer, et la force ionique des éluants.

En SEC, les molécules sont séparées en fonction de leur aptitude à pénétrer dans les pores de la phase stationnaire. Cette séparation va dépendre de la taille des molécules. En effet, plus les particules sont grosses, moins elles vont pénétrer dans les pores. La phase stationnaire (taille des pores) est choisie en fonction des molécules à séparer et la phase mobile doit être choisie pour sa capacité à solubiliser les analytes. La SEC est généralement utilisée pour la purification de protéines ou le préfractionnement d'un échantillon.

Chromatographie liquide multidimensionnelle

Les différents types de chromatographie liquide peuvent être combinés dans une approche multidimensionnelle. C'est le cas par exemple de la stratégie **MudPIT** (*Multi-Dimensional Protein Identification Technology*) qui a été proposée par le groupe de Yates en 1999 (Link *et al.*, 1999). Cette approche consiste en la combinaison d'une chromatographie SCX suivie d'une RP-HPLC. D'autres couplages ont été proposés par la suite : combinaison de deux RP-HPLC à pH basique et acide (Gilar *et al.*, 2005), ou RP-HPLC et HILIC. Une revue récente présente ces différents couplages (Di Palma *et al.*, 2012).

II- La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique datant du début du XX^{ème} siècle, (Thomson, 1913 ; Aston, 1919). Elle est largement utilisée pour la caractérisation de molécules car elle permet d'effectuer une mesure de masse, en phase gazeuse, d'espèces ionisées. Cette technique est apparue en biologie et en analyse protéomique à la fin des années 1980, avec les développements de nouvelles techniques d'ionisation : la source *Electrospray* (ESI) (Fenn *et al.*, 1989) et la source *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation* (MALDI) (Tanaka *et al.*, 1988), travaux récompensés par le Prix Nobel de chimie en 2002. Elle est aujourd'hui la méthode de choix pour l'analyse des biomolécules.

Un spectromètre de masse se divise en trois éléments principaux : la source d'ionisation, l'analyseur de masse et le détecteur (Figure 17).

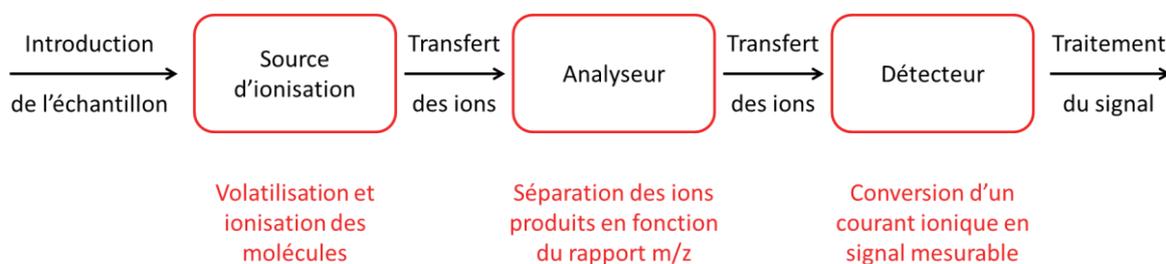


Figure 17 : Schéma d'un spectromètre de masse.

Dans ce paragraphe, seront détaillés les deux sources (ESI et MALDI), les analyseurs (quadripôle, piège à ions tridimensionnel, temps de vol), et le détecteur (multiplicateur d'électrons) utilisés dans le cadre de cette thèse.

A/ La source d'ionisation

La source d'ionisation a pour but de volatiliser et ioniser les molécules. En analyse protéomique, il est important que les molécules ne soient pas fragmentées ou dégradées dans la source. Pour les biomolécules, les sources d'ionisation utilisées sont les sources ESI et MALDI permettent l'analyse de molécules intactes. Aujourd'hui ce sont les deux sources les plus courantes dans le domaine de la protéomique.

La source ESI

L'ionisation ESI a été proposée pour la première fois par Dole à la fin des années 1960 en couplage direct avec un détecteur de type cage de Faraday pour la détermination de la masse moléculaire de polymères synthétiques (Dole *et al.*, 1968). Dans les années 1980, John Fenn a couplé cette source avec un analyseur de masse, montrant ainsi la faisabilité de l'étude de molécules intactes en spectrométrie de masse (Fenn *et al.*, 1989).

Cette source d'ionisation permet de générer, à pression atmosphérique, des ions en phase gazeuse à partir d'analytes en solution. Elle est donc tout particulièrement adaptée au couplage avec l'HPLC.

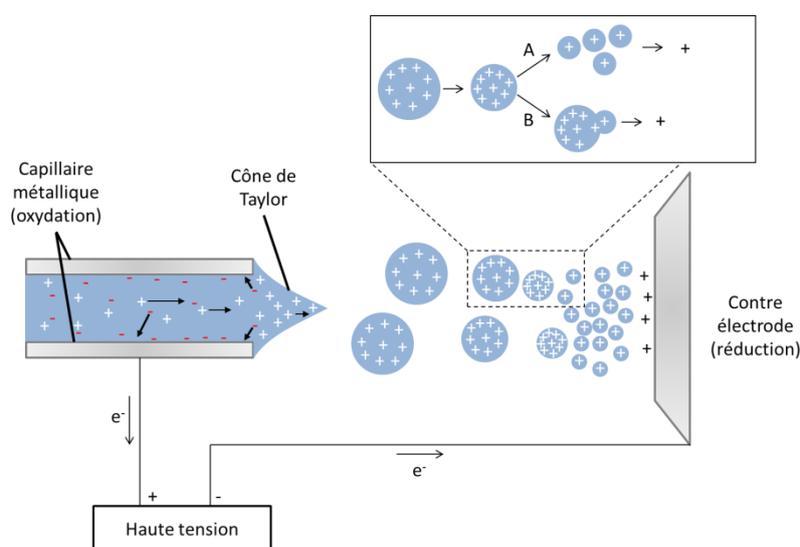


Figure 18 : Ionisation ESI en mode positif.

D'après (Kearle *et al.*, 2009). Une différence de potentiel est appliquée entre le capillaire métallique d'introduction de l'échantillon et la contre électrode à l'entrée de l'analyseur de masse. En mode positif, le capillaire métallique joue le rôle d'anode (oxydation) et la contre électrode le rôle de cathode (réduction). Dans le capillaire métallique, les charges positives s'accumulent à la sortie formant un cône appelé cône de Taylor. Des gouttelettes chargées positivement se forment. Le solvant s'évapore peu à peu jusqu'à former des charges désolvatées. (A) : modèle de la charge résiduelle proposé par Dole. (B) : modèle de l'évaporation ionique proposé par Iribarne et Thomson.

L'échantillon liquide est introduit dans la source à pression atmosphérique par l'intermédiaire d'un capillaire métallique. Une différence de potentiel est appliquée entre le capillaire et la contre électrode (interface entre la source et l'analyseur du spectromètre de masse), ce qui provoque la polarisation du liquide (Figure 18). En fonction du signe de cette différence de potentiel, on va préférer l'ionisation de charge positive ou négative. En protéomique, on travaille plus fréquemment en mode positif (génération de charge positive). Le capillaire joue alors le rôle d'anode chargée positivement sur laquelle les charges négatives en solution sont oxydées. Les charges positives s'accumulent à la sortie du capillaire métallique et le liquide forme un cône appelé cône de Taylor (Kearle *et al.*, 2009). Des gouttelettes chargées positivement sont créées à l'extrémité de ce cône. La présence d'un gaz de nébulisation est nécessaire pour une production stable et régulière de gouttelettes.

La source étant chauffée, le solvant s'évapore peu à peu, entraînant une diminution de la taille des gouttelettes et l'augmentation des forces de répulsions coulombiennes. A un moment donné, ces forces dépassent la tension de surface des gouttelettes provoquant ainsi une succession d'explosions coulombiennes (Kearle *et al.*, 2009). Deux mécanismes de production d'ions désolvatés en phase gazeuse sont actuellement proposés et discutés : le modèle de la charge résiduelle (*Charged Residue Model*) proposé par Dole, où les ions sont progressivement désolvatés en phase gazeuse jusqu'à obtenir des gouttelettes ne contenant qu'un seul ion (Dole *et al.*, 1968), et le modèle de l'évaporation ionique (*Ion Evaporation Model*) proposé par Iribarne et Thomson, où les ions peuvent être directement désorbés des gouttelettes multichargées (Iribarne *et al.*, 1976).

Ce mode d'ionisation permet d'obtenir des ions multichargés lorsque plusieurs sites ionisables sont présents sur la molécule, et ainsi étendre la gamme de masse de l'instrument mesurant des rapports masse sur charge (m/z).

La source MALDI

Simultanément aux développements de la source d'ionisation ESI, une autre source d'ionisation a été développée à la fin des années 1980 par Karas et Hillenkamp : la source MALDI. Ce mode d'ionisation a rapidement montré la possibilité d'analyser des protéines de masse moléculaire supérieure à 10 kDa (Karas *et al.*, 1988 ; Tanaka *et al.*, 1988).

Dans ce mode d'ionisation, l'échantillon est préalablement co-cristallisé avec une matrice (petites molécules organiques). Ce dépôt cristallin est ensuite irradié, sous vide (de l'ordre de 10^{-7} mbar), par de brèves impulsions laser de longueur d'onde donnée (337 nm pour un laser à azote). Cette longueur d'onde correspond à la longueur d'onde d'absorption de la matrice. La matrice absorbe l'énergie des photons incidents et atteint un état excité. Lors de la relaxation, la matrice est éjectée par petites quantités (désorption) en entraînant des molécules d'analyte, et s'ionise. L'ionisation des molécules d'analyte est réalisée par transfert de protons des molécules de matrice vers les molécules d'analyte. Les ions ainsi formés, généralement monochargés, sont ensuite accélérés jusqu'à l'analyseur.

La matrice, élément primordial dans ce mode d'ionisation, est couramment constituée d'un composé organique aromatique et acide. Les matrices les plus classiques sont l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) (Beavis *et al.*, 1992), l'acide sinapinique (SA) (Beavis *et al.*, 1989) ou encore l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (Strupat *et al.*, 1991). Le choix de la matrice dépend de la classe de molécules à analyser. Par exemple, les matrices HCCA et DHB sont plutôt utilisées pour l'analyse de peptides alors que la matrice SA l'est pour les protéines.

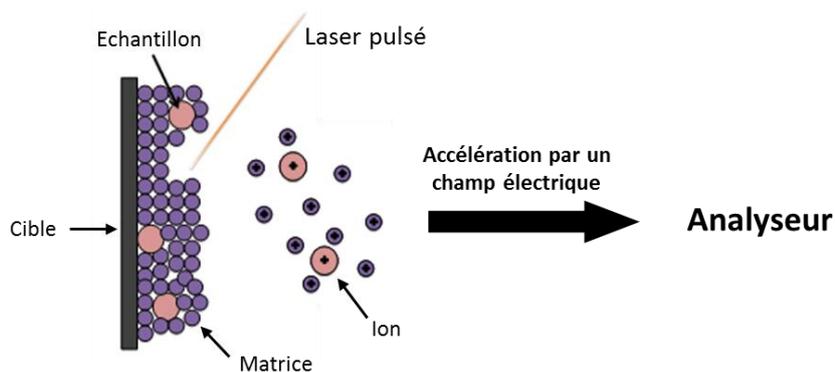


Figure 19 : Ionisation MALDI.

Le laser irradie le dépôt cristallin de matrice et d'analyte. Lors de la relaxation des molécules excitées de matrice, celle-ci se désorbe et s'ionise en entraînant des molécules d'analytes. L'ionisation des analytes est réalisée par transfert de proton des molécules de matrice vers les molécules d'analyte. Les ions ainsi formés sont accélérés jusqu'à l'analyseur.

Cette source permet l'analyse de molécules de haut poids moléculaire car le processus d'ionisation ne dépend ni des propriétés d'absorption des analytes ni de la taille de ces molécules. De plus, elle présente l'avantage d'être relativement tolérante aux sels, ce qui n'est pas le cas de la source ESI.

B/ L'analyseur de masse

Le rôle de l'analyseur dans un spectromètre de masse est de séparer les ions, en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). L'analyseur de masse joue un rôle central dans un spectromètre de masse et influe directement sur la qualité du résultat. Les performances d'un analyseur sont définies par quelques paramètres clés : sa résolution, sa précision de mesure de masse, sa gamme de masse, sa sensibilité et sa capacité à réaliser de la spectrométrie de masse en tandem (Aebersold *et al.*, 2003).

L'analyseur quadripolaire

L'analyseur quadripolaire a été développé dans les années 1950 par Paul et Steinwedel (Paul *et al.*, 1953). Il est constitué de 4 barres métalliques parallèles comme schématisé sur la Figure 20. Les barres opposées sont reliées électriquement et soumises à un potentiel continu U et un potentiel alternatif radiofréquence, d'amplitude V et de fréquence ω ($V\cos(\omega t)$). Ce potentiel global $\Phi=U+V\cos(\omega t)$ est de même valeur, mais de signe opposé entre deux barres adjacentes.

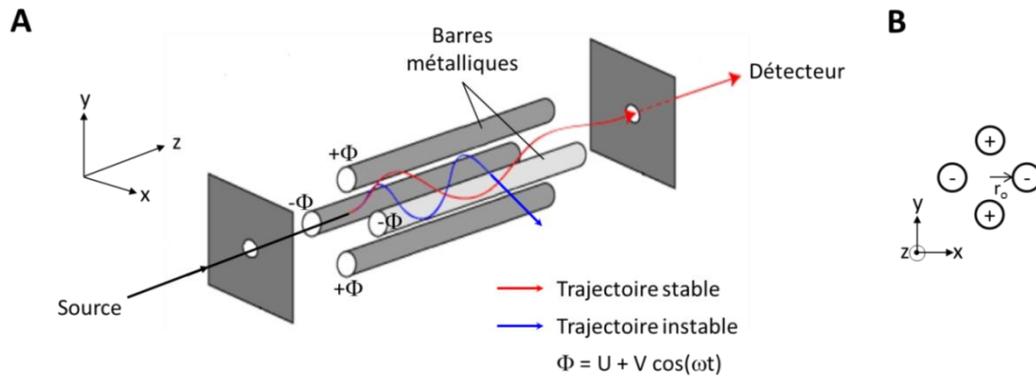


Figure 20 : Analyseur quadripolaire.

Adapté de <http://cbm.cnrs-orleans.fr>. Cet analyseur est composé de quatre électrodes métalliques distantes de r_0 du centre du quadripôle. Les barres opposées sont portées au même potentiel Φ et les barres adjacentes sont portées à un potentiel de signe opposé $-\Phi$. Les ions ayant une trajectoire stable dans le champ électrique créé traversent le quadripôle et atteignent le détecteur, les ions ayant une trajectoire instable ne traversent pas le quadripôle.

La séparation des ions est basée sur la stabilité de leur trajectoire dans le champ électrique oscillant Φ . Les ions entrent dans le quadripôle avec une vitesse initiale selon l'axe z de celui-ci. Ils sont ensuite soumis à des cycles d'attraction et de répulsion vers les barres métalliques, soumises aux potentiels $+\Phi$ et $-\Phi$, et se déplacent donc dans les trois dimensions (z, x, y). La zone de stabilité des ions dans le plan (x, y) du quadripôle en fonction de leur rapport m/z est donnée par la résolution des équations de Mathieu et est présentée en Figure 21.

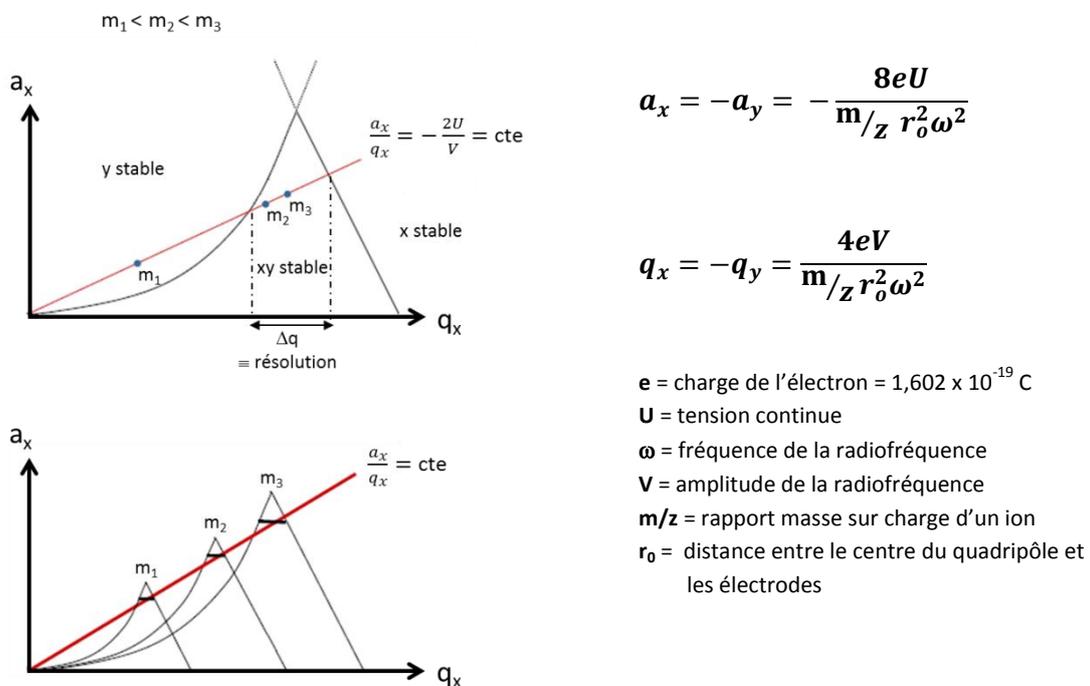


Figure 21 : Diagramme de stabilité des ions dans un quadripôle.

D'après (Gross, 2011). Les ions sont stables selon les directions x et y uniquement si les paramètres a et q sont dans la zone de stabilité.

Pour des valeurs U et V données, seuls certains ions peuvent avoir une trajectoire stable, selon x et selon y, ce qui leur permet d'atteindre le détecteur. Les autres ions sont défectés sur les barres ou s'échappent entre celles-ci. Le pouvoir de résolution $m/\Delta m$ va dépendre du rapport des tensions : plus la droite est proche du sommet du diagramme de stabilité, plus la résolution est élevée. On peut remarquer sur la Figure 21 qu'un balayage du potentiel U et de l'amplitude de la radiofréquence V, maintenant un rapport U/V constant, permet de transmettre successivement des ions de masse différente vers le détecteur. Le quadripôle peut être utilisé, dans certains cas, en mode *RF only*, où seule une radiofréquence est appliquée. Dans ce cas U=0, le domaine de stabilité correspond à l'axe q_x sur le diagramme de la Figure 21 et tous les ions ont une trajectoire stable et passent au travers du quadripôle.

Le quadripôle présente des caractéristiques assez restreintes en terme de gamme de m/z analysable (jusqu'à 2 000 m/z) et de résolution FWHM (entre 1 000 et 5 000 pour m/z = 1 000). Cet analyseur permet de sélectionner spécifiquement un ion (mode SIM, *Selected Ion Monitoring*), s'apparentant ainsi à un filtre de masse. De ce fait, il est fréquemment couplé à d'autres quadripôles, afin de former un instrument de type triple quadripôle ou à un autre quadripôle et un analyseur à temps de vol (QqTOF), afin de former un instrument hybride permettant de réaliser des analyses de spectrométrie de masse en tandem.

L'analyseur temps de vol

Les premiers analyseurs à temps de vol (TOF, *Time Of Flight*) ont vu le jour à la fin des années 1940 et au début des années 1950 avec les travaux de Cameron et Eggers (Cameron *et al.*, 1948), de Wiley et McLaren (Wiley *et al.*, 1955) et de Wolff et Stephens (Wolff *et al.*, 1953). L'utilisation de cet analyseur a souffert, à ses débuts, de l'apparition quasi simultanée des analyseurs quadripolaires. Ce n'est qu'à la fin des années 1980 avec l'apparition de la source MALDI qu'il a connu un regain d'activité (Standing, 2000).

Dans cet analyseur, les ions sont formés au niveau de la source et sont accélérés jusqu'à l'entrée du tube de vol (zone d'accélération). Ils sont ensuite séparés en fonction de leur vitesse dans une zone libre de champ sous vide poussé. Idéalement, tous les ions de même rapport m/z possèdent la même énergie cinétique E_c à l'entrée du tube de vol, donc la même vitesse v, et arrivent au même instant au niveau du détecteur :

$$E_c = zeU = \frac{1}{2}mv^2 \quad \text{soit} \quad v = \sqrt{\frac{2zeU}{m}}$$

avec z la charge de l'ion, m sa masse, e la charge de l'électron et U la différence de potentiel appliquée dans la zone d'accélération.

Dans la zone libre de champ, l'ion conserve son énergie et le temps mis par celui pour atteindre le détecteur situé à une distance L est exprimé par :

$$t = \frac{L}{v} = \frac{L}{\sqrt{2eU}} \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Cependant, les ions ne sont pas formés au même endroit et au même instant au niveau de la source. Ceci implique que des ions de même rapport m/z acquièrent une énergie cinétique différente dans la zone d'accélération et affichent une vitesse différente dans le tube de vol, impactant ainsi la résolution de l'analyseur. Pour remédier à ce problème, deux dispositifs ont été développés : l'extraction retardée (Colby *et al.*, 1994) et le réflecteur (Mamyrin, 1994).

L'extraction retardée met en œuvre l'utilisation d'une lentille entre la source MALDI et l'analyseur. Un potentiel légèrement plus élevé que celui de la cible est appliqué sur cette lentille ce qui permet de ralentir les ions formés. Ces ions sont alors focalisés et vont entrer dans le tube de vol au même instant.

Le réflecteur est composé d'électrodes circulaires disposées à l'extrémité du tube de vol sur lesquelles sont appliqués des potentiels croissants. Le champ créé par ces électrodes va permettre de renvoyer les ions vers le détecteur. En fonction de l'énergie cinétique des ions, ils vont pénétrer plus ou moins profondément dans le réflecteur, ce qui permet aux ions de même rapport m/z de se focaliser et d'atteindre le détecteur au même instant.

L'analyseur piège à ion tridimensionnel

Le piège à ion (IT, *Ion Trap*) a été inventé dans les années 1960 par Paul et Steinwedel. Il est constitué de deux électrodes hyperboliques, appelées électrodes « chapeaux », et d'une électrode annulaire de section hyperbolique. Comme pour un analyseur à quadripôles, des tensions issues de la superposition d'une tension continue et d'une tension alternative, sont appliquées sur l'électrode annulaire et sur les électrodes « chapeaux ». Les ions circulent dans l'espace à trois dimensions formé entre ces électrodes ($\sim 1 \text{ cm}^3$) et défini par les coordonnées cylindriques (r, θ, z) , où z est l'axe des électrodes « chapeaux » et r le rayon de l'électrode annulaire (Figure 22). A la différence de l'analyseur précédent, où seuls les ions d'un rapport m/z donné sont autorisés à traverser l'analyseur en fonction des tensions appliquées, des ions de différentes masses sont piégés simultanément dans cet espace et éjectés en fonction de leur rapport m/z .

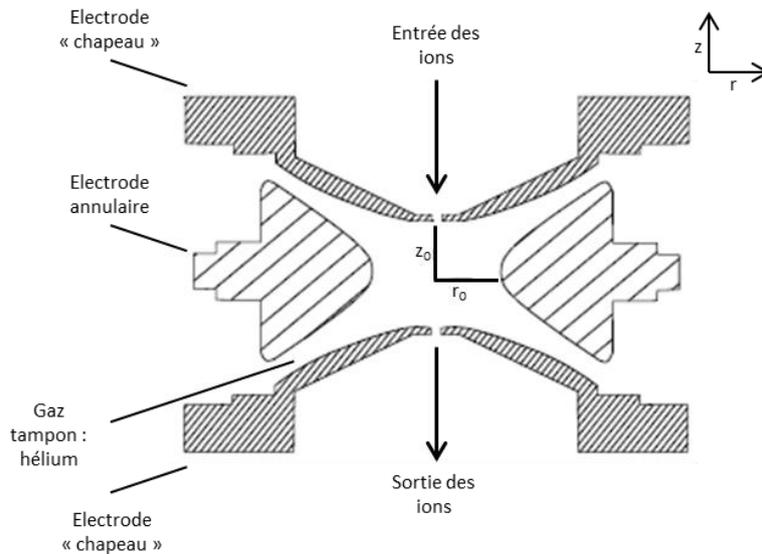


Figure 22 : Analyseur piège à ions.

Cet analyseur est composé de deux électrodes « chapeaux » et d'une électrode annulaire de section hyperbolique pouvant être soumise à un potentiel électrique. La distance entre le centre du piège et les électrodes chapeaux est de z_0 et entre le centre du piège et l'électrode annulaire est de r_0 . Les ions entrent et sortent du piège par les électrodes chapeaux. La présence d'un gaz tampon (hélium) permet d'améliorer l'efficacité du piégeage des ions en focalisant les ions au centre du piège.

- *Piégeage des ions*

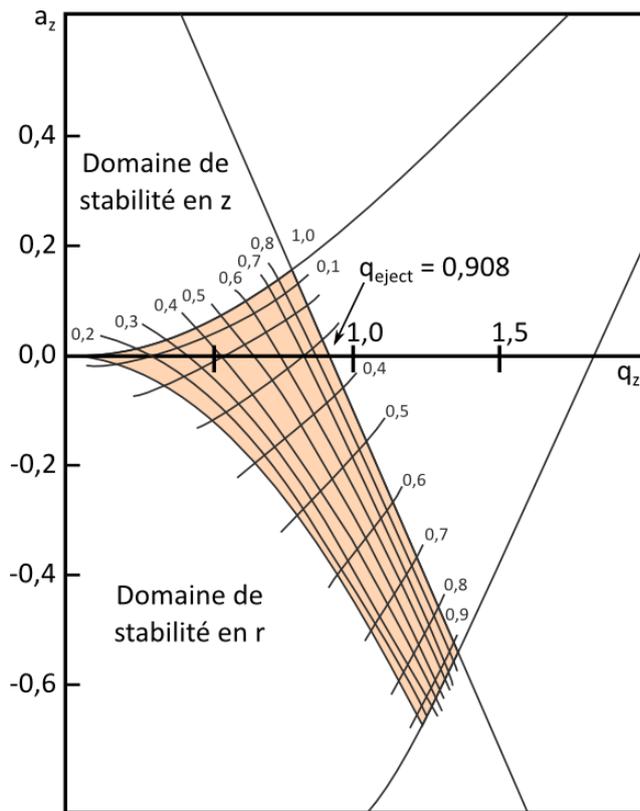
Les ions entrent dans le piège à ion par une des deux électrodes chapeaux. Afin de permettre l'entrée des ions, ces électrodes sont reliées à la terre. L'électrode annulaire est, elle, soumise uniquement à une tension alternative $V \cos(\omega t)$, créant un champ électrique dans le piège. Seuls les ions ayant une trajectoire stable selon r et selon z dans ce champ électrique sont piégés. Comme pour le quadripôle, les zones de stabilité sont déterminées par la résolution des équations de Mathieu (Figure 23).

Dans le cas présent, la tension continue U est nulle, donc $a_z=0$. La zone de stabilité dans le piège est déterminée par l'axe q_z :

- pour $q_z < q_{\text{éjection}}$, la trajectoire est stable, l'ion est piégé.
- pour $q_z > q_{\text{éjection}}$, la trajectoire est instable, l'ion s'écrase sur les électrodes ou s'échappe.

La valeur $q_{\text{éjection}} = 0,908$ constitue la frontière entre les zones de stabilité et d'instabilité de la trajectoire d'un ion. D'après l'expression de q_z (Figure 23), pour une amplitude de radiofréquence V donnée, il existe une valeur de rapport m/z minimum en dessous de laquelle les ions ne sont pas piégés ($q_z > q_{\text{éjection}}$). Ceci constitue la notion de cut-off des basses masses dans un piège à ions.

L'efficacité du piégeage des ions est améliorée par la présence d'un gaz tampon, de l'hélium à une pression résiduelle de l'ordre de 10^{-3} mbar. Ce gaz permet de diminuer l'énergie cinétique des ions par collisions induisant ainsi une focalisation de ceux-ci au centre du piège.



$$a_z = -2a_r = -\frac{16eU}{m/z(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2}$$

$$q_z = -2q_r = \frac{8eV}{m/z(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2}$$

- e = charge de l'électron = $1,602 \times 10^{-19}$ C
- U = tension continue
- ω = fréquence de la radiofréquence
- V = amplitude de la radiofréquence
- m/z = rapport masse sur charge d'un ion
- r₀ = distance entre le centre du piège et l'électrode annulaire
- z₀ = distance entre le centre du piège et les électrodes chapeau

Figure 23 : Diagramme de stabilité des ions dans un piège à ions.

D'après (March, 1997). Les ions sont stables selon les directions z et r uniquement si les paramètres a_z et q_z sont dans la zone colorée. Dans le cas d'une tension continue nulle sur l'électrode annulaire ($a_z=0$), la zone de stabilité est déterminée par l'intersection entre l'axe q_z et la zone de stabilité colorée. La frontière entre la zone de stabilité et d'instabilité correspond à $q_{\text{éjection}}=0,908$.

- Ejection des ions

L'éjection des ions du piège peut être réalisée en mode d'éjection sélective de masse, basée sur l'instabilité des trajectoires, en augmentant petit à petit l'amplitude V de la tension alternative appliquée sur l'électrode annulaire. En effet, d'après le diagramme de stabilité, si V augmente, q_z augmente, se rapproche de $q_{\text{éjection}}$, et les ions de rapport m/z croissant sont éjectés progressivement par l'électrode « chapeau » de sortie car leur trajectoire devient instable. Cependant ce mode d'éjection est limité par la tension applicable sur l'électrode annulaire (15-20 kV), et seulement les ions de rapport $m/z < (m/z)_{\text{max}}$ pourront être analysés. Ce rapport maximum est de l'ordre de 1 000. Par exemple, pour un rayon de l'électrode annulaire r_0 de 1 cm, une distance z_0 de 0,707 cm, une fréquence ω de 1,1 MHz et une amplitude de radiofréquence V de 15 kV, le rapport m/z maximum pouvant être détecté est de 663 (Kaiser Jr. et al., 1991). Il est alors nécessaire d'étendre la gamme de masse analysable par le piège à ions. La méthode utilisée est l'éjection résonante.

En mode d'éjection résonnante, la trajectoire de l'ion stable selon z dans le piège est perturbée par une tension alternative supplémentaire appliquée sur les électrodes « chapeau » $V' \cos(\omega't)$, avec V' de l'ordre de quelques centaines de millivolt. Si, pour une tension donnée $V \cos(\omega t)$ appliquée à l'électrode annulaire, la fréquence ω' de la tension supplémentaire coïncide avec la fréquence de résonance de la trajectoire selon l'axe z , l'énergie cinétique de l'ion augmente et l'éjection de l'ion se produit pour une valeur de q_z inférieure à 0,908. Ainsi une plus large gamme de rapport m/z peut être analysée.

Comme pour le quadripôle, les caractéristiques du piège à ion sont restreintes en gamme de m/z (jusqu'à 3 000 m/z) (Gross, 2011) et de résolution ($\sim 3\,500$ en mode *Enhanced resolution* sur le système amaZon de Bruker). Cet analyseur présente également une faible précision de masse due aux effets d'espace charge lorsque trop d'ions sont confinés dans le piège perturbant les champs appliqués. Cependant, cette capacité à piéger les ions induit une grande sensibilité. Contrairement aux analyseurs précédents, il est possible de réaliser, dans le piège à ions et sans couplage supplémentaire, de la spectrométrie de masse multiple, MS^2 , MS^3 ... Il présente une vitesse de balayage élevée (32 500 $m/z.s^{-1}$ en mode UltraScan et jusqu'à 52 000 $m/z.s^{-1}$ en mode XtremeScan sur le système amaZon de Bruker) lui permettant de réaliser des cycles MS-MS/MS dans un temps réduit (environ 1 s pour un cycle de MS et de 6 MS/MS utilisé en routine au laboratoire).

Des analyseurs de type piège à ions linéaire, ou 2-D, présentant des capacités de piégeage beaucoup plus élevées que les trappes 3D, ont été développés. Ils apportent des améliorations tant au niveau de la sensibilité que de la résolution et de la précision de masse (Douglas *et al.*, 2005).

C/ Le détecteur

Lorsqu'ils ont traversé l'analyseur, les ions doivent ensuite être détectés. Cette détection va dépendre des propriétés de l'ion : masse, charge, vitesse ou encore conformation. Différents types de détecteurs sont disponibles, permettant de transformer un courant d'ion en un signal mesurable (cage de Faraday), de générer un courant électronique à la suite de collision des ions avec une surface (multiplicateurs d'électrons), ou encore d'évaluer les effets d'induction de charges dans un conducteur (FT-ICR). Les détecteurs les plus utilisés sur les spectromètres de masse de type ESI-QqQ ou ESI-IT sont les multiplicateurs d'électrons. Deux types de multiplicateur peuvent être différenciés : les multiplicateurs à dynodes discrètes (ou dynodes séparées) et les multiplicateurs à dynode continue (channeltron ou galettes de microcanaux).

Le principe d'un multiplicateur d'électrons réside sur la capacité d'une surface métallique ou semi-conductrice à émettre des particules secondaires à la suite d'impacts par des particules énergétiques.

Channeltron

Les ions séparés dans l'analyseur frappent une première électrode, appelée dynode de conversion, portée à un haut voltage négatif (respectivement positif) qui permet de générer des ions négatifs et des électrons (respectivement des ions positifs) secondaires. Chaque ion est à l'origine de l'émission de plusieurs particules secondaires. Les particules secondaires émises par la dynode de conversion sont accélérées vers l'entrée du channeltron constitué d'une électrode continue de forme cylindrique, ou de forme conique incurvée (« corne », Figure 24).

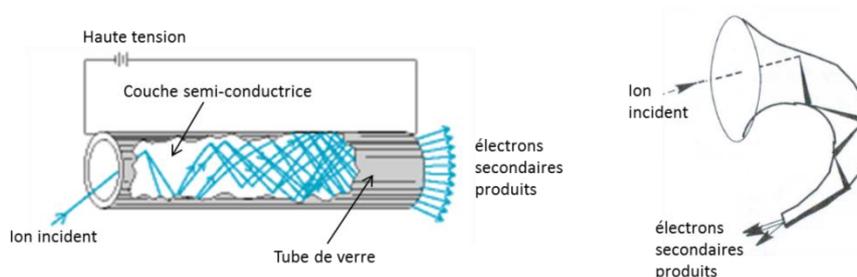


Figure 24 : Channeltrons.
D'après (Ladislav Wiza, 1979 ; Gross, 2011)

Cette électrode, en verre dopé au plomb, est recouverte d'un matériau semi-conducteur de haute résistivité (couches d'oxyde de plomb et d'oxyde de silicium). Cette couche permet à la fois d'assurer l'émission d'électrons secondaires, et de résister à la haute tension appliquée sur cette électrode. En effet, une différence de potentiel d'environ 2 kV est appliquée entre l'entrée et la sortie du *channeltron*. Cette différence de potentiel chute le long du tube, impliquant l'accélération vers la sortie du tube des électrons secondaires, formés à la suite de l'impact d'un ion avec le channeltron.

Ces électrons secondaires frappent à nouveau le tube et provoquent l'émission d'un plus grand nombre d'électrons secondaires.

Les channeltrons cylindriques sont limités en termes de stabilité pour un gain élevé ($\sim 10^4$ - 10^5). En effet, pour un gain élevé, la densité de charge électronique en sortie du cylindre est plus importante, ce qui implique l'augmentation de la probabilité d'observer la production de charge positive par collision entre les électrons et des molécules de gaz résiduelles. Ces ions positifs sont accélérés de la sortie vers l'entrée du cylindre et peuvent alors contribuer au signal obtenu s'ils entrent en contact avec la paroi du tube. Ce bruit, appelé *ion feedback*, est largement réduit dans le cas des channeltrons incurvés et le gain obtenu peut atteindre 10^8 (Gross, 2011).

Ce type de détecteur est adapté à la détection des ions en couplage avec les analyseurs quadripolaire et piège à ion. Au contraire, il n'est pas adapté à l'analyseur temps de vol à cause de la forme, généralement conique, de l'électrode de conversion : l'impact des ions de même m/z sur des régions opposées de l'électrode crée un décalage temporel qui détruit la résolution.

Galette de micro-canaux

Il existe un autre type de multiplicateur d'électrons à dynode continue : la galette de micro-canaux (Figure 25).

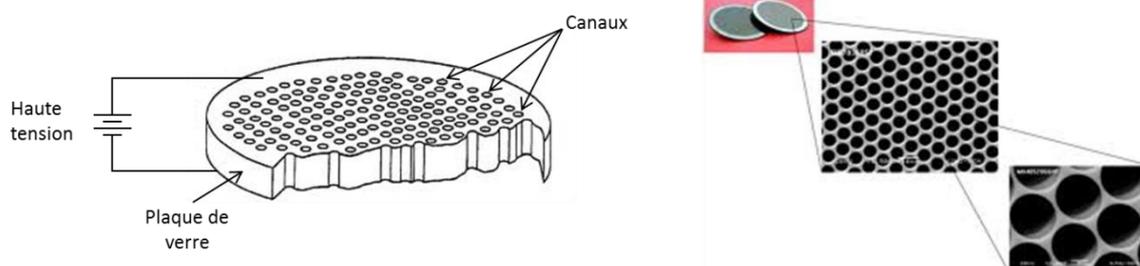


Figure 25 : Galette de micro-canaux.
D'après (Ladislas Wiza, 1979) et <http://www.tectra.de/MCP.htm>

Ce détecteur est constitué d'une plaque épaisse en verre dopé au plomb percée de canaux parallèles. Ces canaux sont, comme pour le *channeltron*, recouverts d'une couche d'un matériau semi-conducteur et ils sont légèrement inclinés ($\sim 8^\circ$) par rapport au plan d'entrée afin d'optimiser les collisions des ions entrant perpendiculairement au plan. Le gain obtenu avec une seule galette est de l'ordre de 10^5 en raison de l'*ion feedback*. Cependant, plusieurs galettes peuvent être assemblées, en chevron pour deux galettes ou en Z pour trois galettes, afin d'obtenir un gain de 10^8 .

Ce type de détecteur est bien adapté à la détection d'ions dans les analyseurs à temps de vol car il n'induit pas de déviation temporelle notable dans la mesure des temps de vol des ions.

D/ La spectrométrie de masse en tandem et la fragmentation peptidique

Un spectre de masse obtenu à partir de la configuration présentée ci-dessus (un seul analyseur de masse) permet d'obtenir uniquement la masse des molécules présentes dans un échantillon. Lors d'études protéomiques, cette information sera utilisée dans une stratégie *peptide mass fingerprint* afin d'obtenir l'identification des protéines à partir de la masse des peptides générés par digestion enzymatique. Pour obtenir plus d'informations, particulièrement sur la séquence de ces peptides, des analyses de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) sont alors mises en œuvre. La connaissance de la séquence des peptides augmente considérablement la spécificité d'identification par spectrométrie de masse. Cependant, la détermination de la séquence peptidique à partir des spectres MS/MS nécessite la connaissance des mécanismes de fragmentation, parfois très complexes.

Spectrométrie de masse en tandem MS/MS

Afin de parvenir aux informations supplémentaires citées, des instruments permettant de réaliser successivement l'acquisition d'un spectre MS, de sélectionner un ion parent, de le fragmenter et de mesurer les rapports m/z des fragments générés ont été développés (Figure 26). Deux catégories d'instrument permettent de réaliser ces étapes : les spectromètres de masse avec deux analyseurs couplés (type QqQ, QqTOF, TOF/TOF), basés sur une séparation spatiale (*in space MS/MS*) et les spectromètres de masse avec un seul analyseur (IT, LIT, FT-ICR) basés sur une séparation temporelle (*in time MS/MS*).

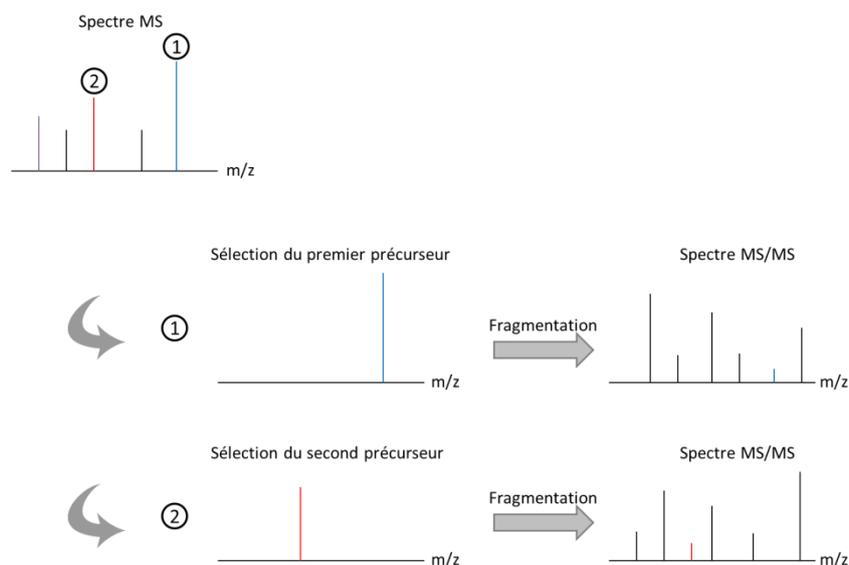


Figure 26 : Déroulement d'une analyse par spectrométrie de masse en tandem.

Dans un premier temps un spectre MS est acquis. Certains ions détectés sont sélectionnés pour être isolés puis fragmentés. Les étapes d'isolation, de fragmentation et de mesure des fragments sont répétées en fonction du nombre de peptides précurseurs sélectionnés lors de la première étape.

Dans le cas des instruments où plusieurs analyseurs sont couplés, comme le QqQ, l'étape de sélection des ions précurseurs est réalisée dans le premier analyseur. Dans un quadripôle, cette sélection est réalisée par l'application d'un potentiel Φ donné ne permettant la stabilité de trajectoire que de l'ion sélectionné. Ce dernier est dirigé vers une cellule de collision, qui consiste généralement en un quadripôle en mode *RF only* où se déroule la fragmentation. Les fragments générés sont séparés dans le second analyseur, puis sont détectés. Dans le cas d'un QqQ, cette séparation est réalisée par un balayage du potentiel U et de l'amplitude de la radiofréquence V , maintenant un rapport U/V constant. Les différentes étapes sont réalisées dans des sections différentes du spectromètre de masse, d'où la dénomination MS/MS dans l'espace.

Dans le cas des instruments avec un seul analyseur, les différentes phases présentées précédemment se déroulent au même endroit mais au cours du temps, d'où la dénomination MS/MS dans le temps. Le piège à ion présenté précédemment est un exemple de ce type d'instrument. Dans cet analyseur, l'acquisition d'un spectre MS/MS se déroule de la manière suivante :

Pour l'isolation de l'ion précurseur, les ions de m/z inférieurs au m/z de l'ion précurseur sont éjectés par un balayage croissant de l'amplitude V de la radiofréquence appliquée sur l'électrode annulaire jusqu'à une amplitude proche de l'amplitude nécessaire à l'éjection de l'ion d'intérêt. Puis, les ions de m/z supérieurs sont mis en résonance à l'aide d'une tension supplémentaire $V'\cos(\omega't)$ appliquée aux électrodes « chapeaux » et sont éjectés par un balayage croissant en fréquence partant d'une fréquence proche de la fréquence de résonance de l'ion précurseur. Enfin, l'ion est isolé de manière plus fine par des balayages en fréquence proches sa fréquence de résonance. Comme pour l'éjection résonnante, la fragmentation est amorcée par l'application d'une tension alternative supplémentaire sur les électrodes « chapeaux » $V'\cos(\omega't)$. L'ion isolé est excité à sa fréquence de résonance avec une amplitude plus faible que pour l'éjection résonnante. Ceci permet d'augmenter l'énergie cinétique de l'ion sans atteindre l'éjection de la trappe. L'ion est fragmenté suite à l'accumulation d'énergie interne, provoquée par l'enchaînement de nombreuses collisions avec le gaz tampon. Etant donné que l'ion précurseur est excité à sa fréquence propre de résonance, les ions fragments obtenus ne sont pas excités et restent confinés dans le piège. Cependant, il est inévitable de perdre les ions de rapport m/z faible, qui n'auront pas une trajectoire stable dans le piège ($q_z > q_{\text{éjection}}$) pour la tension appliquée sur l'électrode annulaire au moment de la fragmentation. Les fragments ainsi confinés dans le piège à ions sont ensuite éjectés par balayage de l'amplitude appliquée sur l'électrode annulaire et par éjection résonnante.

Quel que soit le type d'instrument utilisé, l'acquisition de spectres MS/MS est effectuée de manière automatique en fonction de critères choisis par l'utilisateur (intensité, rapport m/z ou état de charge des ions précurseurs). C'est ce que l'on appelle le mode d'acquisition données-dépendant (DDA, *Data Dependent Acquisition*). Dans ce mode d'acquisition, un nombre restreint, déterminé à partir du spectre MS, d'ions précurseurs est fragmenté. De nombreux ions ne sont donc pas analysés. D'autres

modes d'acquisition ont été développées afin de contourner cette limitation du mode DDA. Parmi ceux-ci nous pouvons citer le mode d'acquisition MS^E, proposé par la société Waters en 2006 (Geromanos *et al.*, 2009). Dans ce mode, tous les ions précurseurs sont fragmentés en même temps en appliquant une rampe d'énergie de collision après acquisition d'un spectre MS. Le spectre MS^F représente donc les données MS/MS de tous les peptides visualisés en MS. L'association de chaque fragment à son parent est réalisée par alignement des temps d'élution. Les listes de masses des fragments et de leurs ions précurseurs ainsi générées sont ensuite comparées avec les données issues des banques de données pour obtenir l'identification des protéines. Ce mode d'acquisition souffre de l'impossibilité de valider manuellement les spectres de fragmentation correspondant à un nombre important d'ions précurseurs et de l'obligation d'utiliser l'algorithme développé par Waters, seul sur le marché. Si la complexité du mélange est trop importante, les spectres sont difficiles à interpréter par l'algorithme. Une séparation des ions selon une dimension supplémentaire peut être envisagée, comme la mobilité ionique (Angel *et al.*, 2012b). En 2012, le groupe d'Aebersold a proposé le mode d'acquisition SWATH-MS commercialisé par la société ABSciex (Gillet *et al.*, 2012). Comme le mode MS^F, ce mode d'acquisition est données-indépendant et consiste en l'acquisition successive de spectres MS sur une fenêtre de 25 Da et de la fragmentation de tous les ions précurseurs contenus dans cette fenêtre. En décalant successivement la fenêtre de 25 Da, une large gamme de masse peut être suivie. Etant très récent, peu d'études ont utilisé ce mode d'acquisition de données et nous ne disposons pas d'un recul suffisant pour conclure sur les avantages ou inconvénients par rapport aux autres modes.

Fragmentation

Il existe différents modes de fragmentation permettant de séquencer les peptides : la fragmentation induite par collisions (CID : *Collision Induced Dissociation*) (McLafferty *et al.*, 1967), la fragmentation par capture d'électron (ECD, *Electron Capture Dissociation*) (Zubarev *et al.*, 1998), ou encore la fragmentation par transfert d'électron (ETD, *Electron Transfer Dissociation*) (Syka *et al.*, 2004). Au sein du mode CID, les fragmentations basse énergie (quelques dizaines d'eV) et haute énergie (quelques keV) peuvent être distinguées, et induisent différentes coupures le long de la chaîne peptidique ou sur les chaînes latérales.

Au cours de mes travaux, seule la fragmentation CID basse énergie sur des instruments de type ESI-IT ou ESI-QqQ a été mise en œuvre et sera présentée ci-après. Dans ce type d'instrument, de l'énergie interne est transférée aux ions après une collision avec un gaz, généralement de l'argon ou de l'hélium (~ 0,1 eV/collision). Le clivage d'une liaison le long de la chaîne peptidique (énergie de dissociation entre 3 et 4 eV selon le type de liaison) est possible grâce à l'accumulation d'énergie interne, engendrée par l'enchaînement de collisions au sein de la cellule.

La nomenclature de la fragmentation le long d'une chaîne peptidique a été introduite en 1984 par Roepstorff et Fohlmann (Roepstorff *et al.*, 1984). Par la suite, elle a été simplifiée par Biemann (Biemann, 1990) et reste la nomenclature de référence à l'heure actuelle (Figure 27). Le clivage de la

chaîne peptidique au niveau de la liaison carbone-carbone donne lieu à la formation des séries d'ions **a** et **x**, celui au niveau de la liaison peptidique aux séries d'ions **b** et **y**, et celui au niveau de la liaison azote-carbone aux séries d'ion **c** et **z**. Les séries **a**, **b** et **c** sont constituées des ions pour lesquels la charge positive est portée par la partie N-terminale, et les séries **x**, **y** et **z**, des ions pour lesquels la charge positive est portée par la partie C-terminale.

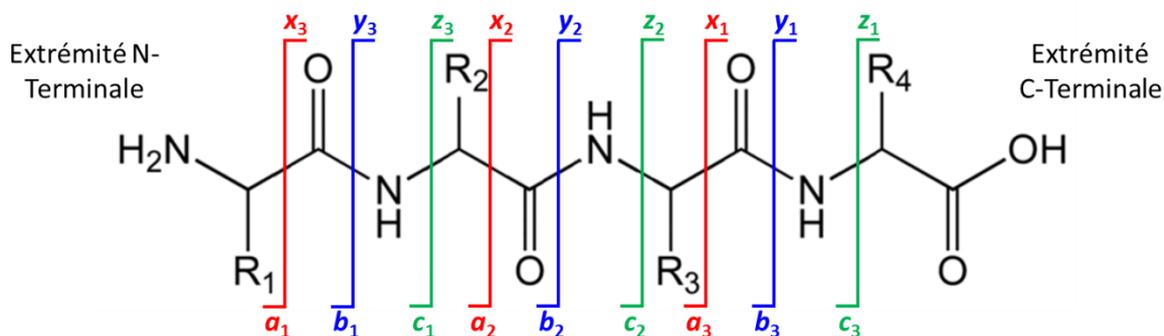


Figure 27 : Fragmentation peptidique.

Nomenclature selon Biemann des fragments obtenus en fragmentation CID basse énergie sur un peptide de quatre acides aminés (chaîne latérale R1, R2, R3, R4). Pour les ions des séries **a**, **b** et **c**, la charge est portée par la partie N-terminale du peptide. Pour les ions des séries **x**, **y** et **z**, la charge est portée par la partie C-terminale du peptide.

La différence de masse observée entre deux ions d'une même série (entre y_1 , y_2 et y_3 sur la Figure 27, par exemple) permet de déterminer l'identité de l'acide aminé qui a été perdu, et par extension la séquence du peptide précurseur. Il faut néanmoins noter que la distinction entre les acides aminés isobares leucine et isoleucine n'est pas possible en fragmentation CID basse énergie. Pour les lysines et les glutamines, dont la différence de masse est faible, 0,03 Da, la distinction est réalisable uniquement à l'aide d'analyseurs haute résolution.

Généralement, les ions majoritairement observés en fragmentation CID basse énergie sont les ions **b** et **y**. La formation de ces ions est obtenue par l'apport d'un proton au niveau de l'azote des liaisons amides qui affaiblit l'énergie de cette liaison et favorise donc la dissociation. Cependant, d'un point de vue thermodynamique, la protonation de cet azote n'est pas favorable par rapport à celle de l'oxygène porté par le carbone de la liaison amide, qui va renforcer la liaison et donc défavoriser la dissociation. De plus, la protonation peut se produire sur d'autres sites le long de la chaîne peptidique, comme l'amine N-terminale ou encore les acides aminés basiques. Ces sites sont beaucoup plus favorables énergétiquement et peuvent « séquestrer » la charge positive. C'est le cas, par exemple, de l'arginine ou de la lysine C-terminal des peptides tryptiques. Le modèle du proton mobile, introduit par Dongré *et al.*, permet de résoudre ces incohérences entre les données thermodynamiques et l'observation réelle des fragments peptidiques : l'augmentation de l'énergie interne, provoquée par l'accumulation de collision avec le gaz, entraîne la délocalisation du proton et donc la formation d'intermédiaires moins favorables énergétiquement (Dongré *et al.*, 1996).

Dans le cas de peptides tryptiques monochargés, le proton est « séquestré » au niveau l'acide aminé basique C-terminal (lysine ou arginine) et l'énergie nécessaire pour délocaliser la charge positive le long du squelette peptidique, et donc pour la fragmentation, est élevée.

Dans le cas de peptides tryptiques doublement chargés, les charges sont généralement portées par l'acide aminé basique en C-terminal et par l'amine N-terminale. Le proton porté par cette dernière est plus facilement délocalisé le long du squelette peptidique, favorisant la génération d'ion *y* et *b*. Les ions *y* obtenus sont plus stables que les ions *b*, du fait de la séquestration du proton en C-terminal, et sont donc plus intenses. Les ions *b* sont plus facilement sujets à une fragmentation secondaire.

III- Les stratégies d'identification de protéines par spectrométrie de masse

A/ L'empreinte peptidique massique

La mesure de masse d'un ensemble de peptides générés par digestion enzymatique, permet de remonter à l'identification d'une protéine. Les données expérimentales, obtenues après analyses MALDI-MS ou ESI-MS, sont comparées aux listes de masses théoriques obtenues par digestion *in silico* de l'ensemble des séquences protéiques contenues dans des banques de données. Cette stratégie d'identification est dénommée identification par empreinte peptidique massique (PMF, *Peptide Mass Fingerprint*) (Pappin *et al.*, 1993). Cette stratégie est généralement appliquée à des échantillons peu complexes car la superposition d'empreintes peptidiques massiques de plusieurs protéines augmente la difficulté d'interprétation, réduisant ainsi l'efficacité de l'identification.

Cette stratégie, basée uniquement sur la comparaison de listes de masse, nécessite, une précision de mesure de masse élevée. Elle est également limitée par la taille de la banque de données. En effet, plus la banque est conséquente, plus on augmente la probabilité de retrouver deux séquences peptidiques différentes en acides aminés mais de même masse, et donc plus l'identification des faux positifs est probable. Si l'on ne dispose que de la masse du peptide, rien ne permettra de valider une séquence par rapport à une autre dans un tel cas et la spécificité de la technique se trouve limitée. De plus, la correspondance entre la masse théorique et la masse mesurée expérimentalement est stricte et ne permet pas de mettre en évidence des homologies de séquences, ce qui implique que les séquences exactes doivent être contenues dans la banque interrogée.

B/ Les stratégies nanoLC-MS/MS

Les stratégies nanoLC-MS/MS, où une étape de chromatographie liquide haute performance sur phase inverse est couplée à la spectrométrie de masse en tandem, sont aujourd'hui largement utilisées pour l'identification des protéines lors d'une approche *bottom-up*. Elles peuvent être réalisées sur un mélange de peptides issus d'une digestion enzymatique *in gel* après une séparation des protéines sur gel d'électrophorèse ou après une digestion en milieu liquide de l'échantillon biologique. Ces stratégies présentent l'avantage d'obtenir des informations supplémentaires sur les peptides et donc d'augmenter la fiabilité de l'identification. Ces peptides sont préalablement séparés par nanoLC avant d'être introduits dans la source du spectromètre de masse. La séparation par HPLC évite la compétition entre eux au moment de l'ionisation et permet l'analyse de mélanges complexes et le côté miniaturisé de la nanoLC permet de travailler sur de faibles quantités de matériel biologique. Ils sont ensuite analysés par spectrométrie de masse en tandem, permettant d'obtenir en plus de la masse, des informations de séquence du peptide.

L'identification des protéines à partir des informations de séquence des peptides fournies par ces spectres MS/MS peut être abordée selon deux approches :

- L'empreinte de fragmentation peptidique
- Le séquençage *de novo*.

L'empreinte de fragmentation peptidique

De façon analogue à l'identification par PMF, les listes de masses expérimentales de fragments associés à un ion parent sont comparées à des listes de masses théoriques obtenues par digestion et fragmentation *in silico* de l'ensemble des séquences protéiques contenues dans des banques de données. La dénomination d'empreinte de fragmentation peptidique (PFF, *Peptide Fragment Fingerprint*) a été introduite par analogie avec la dénomination PMF (Blueggel *et al.*, 2004).

L'approche par PFF présente cependant quelques limites à son utilisation. En effet, le succès de son utilisation repose essentiellement sur la présence de la protéine dans la banque de donnée. Ainsi l'étude d'organismes non séquencés, comme la tique *Ixodes ricinus*, n'est pas envisageable. Une alternative dans notre cas est de travailler avec la banque *Ixodes scapularis*, espèce de tique présente aux Etats-Unis et dont le génome est totalement séquencé. Cependant, les moteurs de recherche se basent sur des identités strictes entre les masses théoriques et les masses expérimentales. Ceci implique que la moindre différence dans la séquence d'acide aminé, et donc dans la masse du peptide, ne permet pas l'identification du peptide. Par exemple, chez la tique du genre *Ixodes* certaines protéines, comme OspC, sont variables d'une espèce à l'autre, voire d'une souche à l'autre au sein de la même espèce. La seconde approche d'identification proposée précédemment, le séquençage *de novo*, doit alors être mise en œuvre.

Le séquençage de novo

Pour obtenir les informations sur toute ou partie de la séquence des peptides issus de la digestion enzymatique, nous pouvons directement interpréter les spectres de fragmentation MS/MS. Les séquences ou partie de séquences (tags) obtenues par cette interprétation des spectres sont ensuite soumises à des programmes d'alignement de séquence comme MS-Blast. Ces programmes, tolérants aux erreurs de séquences, vont permettre de mettre en évidence des homologies entre le tag proposé par l'utilisateur pour un organisme donné et des séquences présentes chez des organismes proches. Dans le cas de la tique *Ixodes ricinus*, des banques relatives au genre *Ixodes*, à l'ordre des acariens ou à l'embranchement des arthropodes peuvent par exemple être utilisées.

Cette approche permet d'interpréter des spectres supplémentaires par rapport à l'approche en banque de données et peut permettre d'identifier des peptides modifiés. Elle présente cependant quelques contraintes. Tout d'abord, les spectres MS/MS doivent être de bonne qualité afin d'obtenir

un tag de séquence non ambigu et suffisamment long pour être significatif (5-6 acides aminés consécutifs). De plus, cette approche est plus longue par rapport aux approches en banque de données. En effet, malgré l'existence d'outils informatiques (PepNovo, Peaks), il est souvent nécessaire de vérifier, manuellement l'ensemble des spectres.

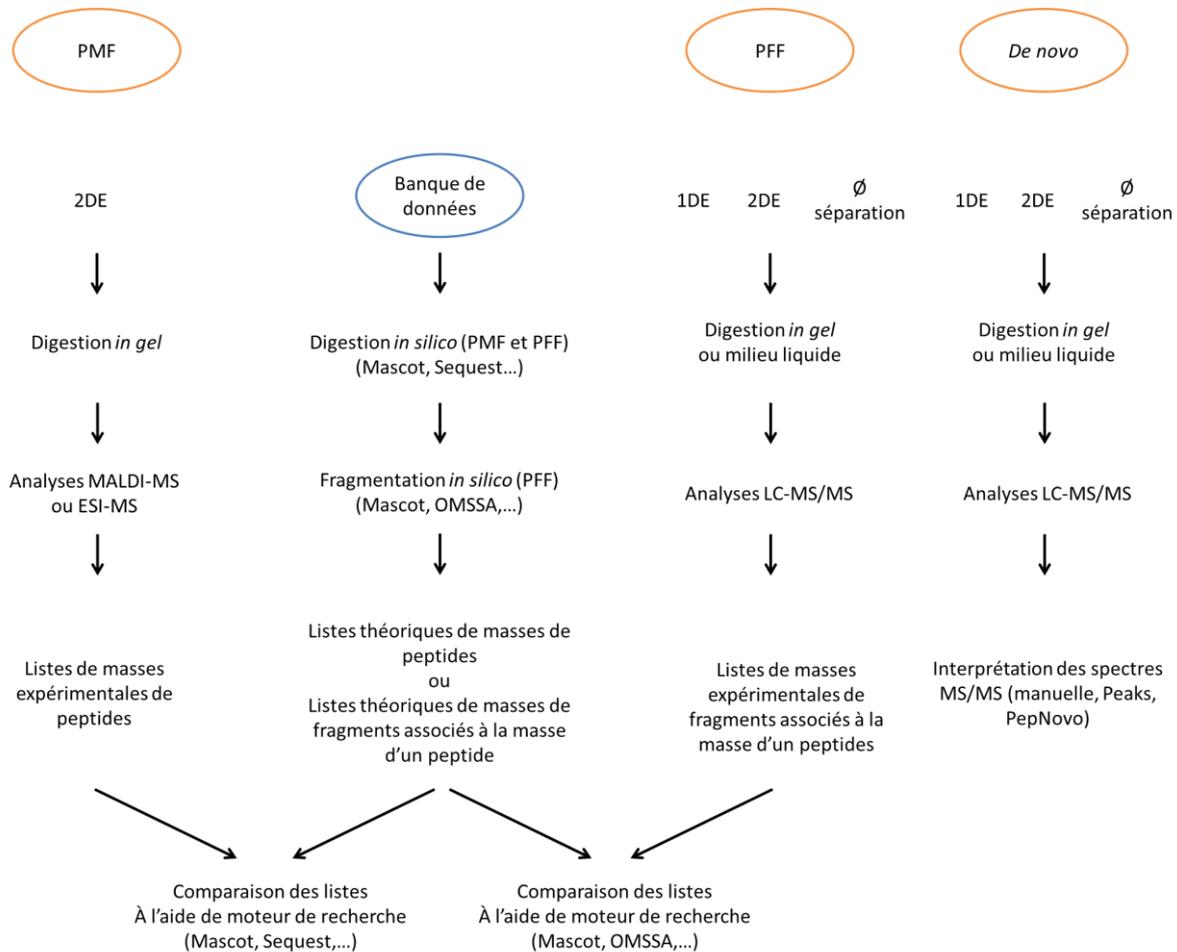


Figure 28 : Stratégies d'identification de protéines par PMF, PFF ou séquençage *de novo*.

C/ Les banques de données

Dans le cadre des stratégies d'identification par PMF, PFF ou séquençage *de novo*, la banque de données joue un rôle central. Les identifications et les interprétations biologiques dépendent directement de la disponibilité des banques protéiques relatives à un organisme donné et de l'annotation de celles-ci. Différentes catégories de banques de séquences protéiques sont disponibles : les banques de dépôt et les banques corrigées.

Les banques de **dépôt** sont constituées de séquences protéiques traduites à partir de gènes prédits. Aucune vérification n'est menée sur ces séquences et très peu, voire pas, d'annotations sont disponibles. La banque NCBI non redondante (NCBInr) est un exemple de banque de dépôt

classiquement utilisée. En plus des séquences issues de la traduction automatique des banques nucléotidiques, elle contient des séquences annotées issues d'autres banques protéiques. Malgré les efforts pour regrouper les séquences identiques sous une même entrée, d'où la dénomination non redondante, le degré de redondance est élevé et la banque est volumineuse. En effet, seuls les séquences identiques à 100% sont fusionnées, et les séquences différant de quelques acides aminés ou en longueur (fragments de protéines) constituent des entrées différentes. Cependant, cette banque est intéressante lorsque des variations mineures de séquence sont recherchées et présente l'avantage d'être plus exhaustive que d'autres banques.

Les banques dites **corrigées** sont des banques pour lesquelles chaque entrée a été minutieusement triée et annotée par des experts, à partir d'informations issues de la littérature. Ces banques présentent l'avantage d'être bien documentées et de ne pas contenir des séquences redondantes. La fiabilité des séquences présentes dans ces banques est donc accrue. La banque SwissProt est la banque corrigée manuellement de référence, la mieux annotée et la moins redondante. Etant donné la difficulté pour les annotateurs de suivre la croissance rapide des données nucléotidiques depuis une quinzaine d'année, la banque TrEMBL, complémentaire à SwissProt, a été créée. Cette banque contient des séquences issues de la traduction automatique des banques nucléotidiques à l'exception de celles déjà présentes dans SwissProt. Ces séquences sont annotées automatiquement par des outils informatiques, ce qui permet d'aider le travail manuel réalisé par la suite lors de la migration des séquences de TrEMBL vers SwissProt. TrEMBL permet de suivre l'accroissement rapide de la taille des banques de données nucléotidiques sans altérer la qualité de la banque SwissProt. En 2003, dans le cadre du consortium UniProt, ces deux banques ont été regroupées en une seule : UniProtKB, et ont été renommées en deux sous-banques : UniProtKB/SwissProt et UniProtKB/TrEMBL.

D/ Les moteurs de recherche

Lors des différentes stratégies d'identification de protéines, la comparaison entre des listes de masses expérimentales et théoriques est réalisée grâce à des algorithmes de recherche qui génèrent les listes théoriques à partir d'une banque de données choisie par l'utilisateur et les comparent à celles obtenues expérimentalement. L'identification d'un peptide est réalisée lorsqu'une liste de masses théoriques correspond à la liste de masses expérimentales. Cette dernière est alors rattachée à la séquence peptidique issue de la protéine contenue dans la banque de données. Cette correspondance est accompagnée d'un « score » mesurant la qualité de l'identification.

De nombreux algorithmes ont été développés pour la réalisation de l'identification par PMF ou par PFF, comme Mascot (Perkins *et al.*, 1999), Sequest (Eng *et al.*, 1994), ProteinProspector (Clauser *et al.*, 1999), X!Tandem (Craig *et al.*, 2004) ou encore OMSSA (Geer *et al.*, 2004). Ces moteurs de recherche tiennent compte de paramètres, définis par l'utilisateur : tolérance sur la masse du précurseur et des fragments, choix de l'enzyme de digestion, modifications de certains acides

aminés, type de fragments. Cependant, le principe de corrélation et l'attribution du score de corrélation associé sont différents d'un algorithme à l'autre. Il paraît donc intéressant d'utiliser une combinaison de plusieurs moteurs de recherche en parallèle, non seulement pour obtenir des identifications supplémentaires, mais également pour renforcer la fiabilité des identifications. Le développement de nouveaux outils combinant les résultats de plusieurs moteurs de recherche atteste ce nouveau tournant dans l'identification des protéines (Alves *et al.*, 2008 ; Wedge *et al.*, 2011). Nous ne décrivons ici, que les deux moteurs de recherches utilisés en routine dans notre laboratoire : Mascot et OMSSA.

Mascot est un moteur de recherche basé sur une approche probabilistique (« Probability-based matching ») (Perkins *et al.*, 1999) classiquement utilisé en analyse protéomique depuis de nombreuses années, dans de nombreux laboratoires. Le modèle de calcul de score de Mascot n'est pas publié. Toutefois, on sait qu'il permet de discriminer de manière itérative la meilleure séquence théorique pour chaque spectre de fragmentation en considérant notamment l'intensité des ions fragments expérimentaux attribués, la taille de la séquence attribuée, le nombre de fragments attribués ou non, le nombre d'ions attribués consécutifs d'une même série de fragmentation et l'erreur de masse sur les fragments attribués. A chaque peptide identifié, Mascot attribue un « score d'ion » représentatif de la probabilité que les fragments aient pu être attribués par hasard ; et un « score identité » qui dépend de la taille de l'espace de recherche. Un « score d'ion » supérieur au « score identité » signifie que la probabilité pour que l'identification soit le résultat d'un phénomène aléatoire est inférieure à 5 %. Pour rendre compte de cette probabilité, la différence entre le « score d'ion » et le « score identité » est généralement considérée.

Le moteur OMSSA (*Open Mass Spectrometry Search Algorithm*) est un algorithme probabilistique développé initialement par NCBI dans l'objectif de proposer un nouveau moteur de recherche rapide et libre de droits (Geer *et al.*, 2004). Un modèle mathématique explicite est utilisé pour l'attribution de scores aux peptides identifiés. Il s'appuie sur l'hypothèse que pour tout peptide théorique ayant la masse du peptide parent mesuré, le nombre d'ions fragments théoriques correspondants aux ions fragments d'un spectre expérimental varie selon une loi de Poisson en fonction du nombre de fragments considérés. La moyenne de la distribution dépend de la tolérance sur la masse des ions fragments fixée, du nombre de pics théoriques et expérimentaux, et de la masse du peptide parent considéré. OMSSA calcule alors une « E-value » représentant la probabilité pour que l'association des spectres expérimental et théorique soit due au hasard. Pour des raisons pratiques, le score utilisé est généralement de la forme $-\log_{10}(\text{E-value})$.

OMSSA est utilisé en routine au LSMBO depuis 2009 et a été inclus dans le développement d'une interface conviviale d'analyse de données par spectrométrie de masse permettant la génération de banques de données, la réalisation de recherche en banque de données par OMSSA ou encore la recherche d'annotation biologique à partir de listes de protéines (<https://msda.unistra.fr/>).

E/ L'évaluation des résultats

L'utilisation d'algorithme de recherche pour l'identification des protéines n'est cependant pas infaillible et peut donner lieu à l'identification de faux positifs, c'est-à-dire l'attribution d'une séquence à un spectre MS/MS alors que celui-ci ne la représente pas. La nécessité de valider les résultats est donc cruciale pour l'exactitude de l'identification. Si une identification de protéine à partir de plus de deux peptides n'est pas remise en cause, la question de la véracité de l'identification peut se poser lorsque seulement un ou deux peptides sont mis en jeu.

L'attribution d'un simple seuil minimal de score des moteurs de recherche présente les désavantages d'augmenter le nombre d'identifications de faux positif si le seuil est trop faible, de diminuer le nombre d'identifications de vrai positif si le seuil est trop élevé, et de ne pas pouvoir être appliquée de la même façon d'une série d'analyse à une autre. Bien qu'elle soit très subjective, une inspection manuelle des résultats, et notamment des spectres MS/MS, peut être envisagée, à condition de ne pas avoir un ensemble de données conséquent.

Face à l'augmentation de données et de projet à grande échelle, des approches probabilistes ont alors été développées. Nous développerons ici la stratégie *target-decoy* (Peng *et al.*, 2003 ; Elias *et al.*, 2005), utilisée dans le cadre de cette thèse. Cette stratégie est basée sur la recherche d'identification dans une banque de donnée comprenant à la fois la banque d'intérêt, ou cible, et une banque leurre. La banque leurre est constituée des séquences inversées de la banque cible. Cette approche repose sur le principe que l'identification d'un peptide de la banque leurre suit la même distribution que l'identification d'un faux positif dans la banque cible. L'ensemble des identifications obtenues dans cette banque cible + leurre est ensuite filtré en fonction du score. Le taux de faux positifs est estimé pour un seuil de score donné en calculant le rapport du nombre de protéines identifiées dans la banque leurre par le nombre total de protéines identifiées. Cependant, la multiplication par deux de la banque de données rallonge le temps de recherche par les algorithmes.

IV- Les stratégies de quantification des protéines par spectrométrie de masse

Depuis l'avènement de l'analyse protéomique à grande échelle, de nombreuses études qualitatives d'identification de protéines au sein d'échantillons biologiques ont été menées. Depuis la fin des années 1990, nous pouvons remarquer une évolution avec le développement de nouvelles méthodologies visant l'établissement de données quantitatives (Ong *et al.*, 2005 ; Bantscheff *et al.*, 2007). La quantification de protéines est aujourd'hui devenue un point essentiel en analyse protéomique et se présente sous deux formes : la quantification relative et la quantification absolue. Contrairement à la quantification absolue, où la quantité exacte d'un biomarqueur ou d'une protéine dans un échantillon biologique est recherchée, la quantification relative présente un rapport de la quantité de ce biomarqueur ou de cette protéine présents dans différents échantillons.

A/ Les stratégies basées sur l'électrophorèse sur gel

Une des premières stratégies de quantification relative de protéines a été l'analyse différentielle par 2-DE. Après coloration, les cartes protéiques permettent, à l'aide de logiciels d'analyse d'image (PDQuest, SameSpots...), une quantification relative (sur-expression ou sous-expression de protéines) entre différents échantillons. Les protéines contenues dans les spots variant en intensité peuvent alors être identifiées par spectrométrie de masse. Cependant, la variabilité biologique et la variabilité technique lors de la réalisation des gels imposent de réaliser plusieurs gels pour une condition donnée, et donc de disposer d'une quantité suffisante d'échantillon biologique, pour obtenir une carte 2D représentative. De plus, cette stratégie impose à la méthode de coloration d'être linéaire.

L'approche **DIGE** (*Difference Gel Electrophoresis*) est une alternative à l'approche précédente (Unlü *et al.*, 1997). Lors de cette stratégie, les protéines de deux échantillons sont marquées deux cyanines fluorescentes de longueurs d'onde d'excitation et d'émission différentes. Deux types de cyanines peuvent être utilisés : les cyanines portant un groupement ester N-hydroxy-succinimide réagissant avec les amines des lysines et les cyanines portant un groupement maléimide réagissant avec les fonctions thiol des cystéines. Les échantillons sont ensuite mélangés et séparés sur un même gel. Le gel est révélé aux différentes longueurs d'onde d'excitation/émission et le rapport d'intensité d'un même spot permet une quantification relative, entre les deux échantillons, de la protéine contenue dans le spot. Cette technique permet de s'affranchir des problèmes de reproductibilité entre deux gels, de détecter des variations très faibles entre deux échantillons et reste compatible avec une identification par spectrométrie de masse. Néanmoins, en contrepartie d'un marquage covalent des protéines, la migration des protéines dans le gel est inévitablement perturbée, particulièrement lors de la seconde dimension. Pour minimiser cette perturbation, le marquage doit être soit minimal (une seule cyanine se fixant sur une lysine par protéine), soit être total (saturation de toutes les cystéines

de la protéine par une cyanine (Shaw *et al.*, 2003)). Toutefois, l'approche DIGE reste soumise aux limites imposées par l'analyse sur gel, est plus onéreuse que l'approche classique et nécessite un scanner adapté.

B/ Les stratégies basées sur la spectrométrie de masse

Les approches sans marquage :

En spectrométrie de masse, l'approche *shotgun*, au cours de laquelle les peptides issus de la dégradation enzymatique des protéines sont analysés par LC-MS/MS, est communément utilisée pour identifier un maximum de protéines. Des stratégies, dénommées **label free**, ont été développées afin d'obtenir une quantification de protéines à partir de ces données *shotgun*. Parmi celles-ci, deux se distinguent particulièrement : la mesure de l'**intensité** ou de l'**aire** du pic des courants d'ions extraits des peptides précurseurs en LC-MS (America *et al.*, 2008) ou la mesure du nombre de spectres de fragmentation d'un peptide, **spectral counting**, en LC-MS/MS (Lundgren *et al.*, 2010). Dans la première stratégie, les intensités (ou les aires) de chaque peptide d'une analyse sont comparées à différentes analyses afin de fournir une information de quantification relative entre différents échantillons. Elle présente l'avantage de s'affranchir du côté aléatoire de la sélection des peptides précurseurs pour la fragmentation, mais nécessite néanmoins une résolution élevée pour pouvoir distinguer deux masses proches et un système chromatographique extrêmement reproductible pour faciliter l'alignement entre plusieurs analyses. Différentes stratégies ont été mises en place pour pouvoir remonter à la séquence des peptides quantifiés : soit l'analyse est dupliquée en réalisant d'abord une analyse LC-MS puis une analyse LC-MS/MS visant l'identification du plus grand nombre de peptides, soit les spectres MS pour la quantification et MS/MS pour l'identification sont acquis au cours de la même analyse. Dans le dernier cas, le rapport entre les spectres MS et MS/MS doit être équilibré de façon à ne pas biaiser la quantification (Bantscheff *et al.*, 2007 ; America *et al.*, 2008).

La stratégie *spectral counting* est basée sur la considération empirique que plus la protéine est abondante dans un échantillon, plus le nombre de spectres de fragmentation des peptides de cette protéine est élevé (Bantscheff *et al.*, 2007). La quantification relative entre différents échantillons peut donc être effectuée par la comparaison du nombre de spectre MS/MS pour une protéine. Cette stratégie présente l'avantage de permettre à la fois l'identification et la quantification des protéines. Cependant, elle souffre de l'aspect aléatoire de la sélection des ions précurseurs en mode DDA et peut également être biaisé par l'exclusion dynamique appliquée aux ions déjà sélectionnés pour la fragmentation (exclusion qui permet d'augmenter le nombre d'identification mais qui implique la perte de données pour les ions exclus). Il est également important de tenir compte du fait que la réponse en termes de nombre de spectre est différente selon les peptides, principalement dû aux différences observées en chromatographie (temps de rétention différents et largeurs de pic différentes). De plus, le nombre de spectres MS/MS total pour une protéine est influencé par la

longueur de celle-ci. Différentes méthodes ont été développées pour pallier cette limitation : l'index d'abondance des protéines (PAI, *Protein Abundance Index*) (Rappsilber *et al.*, 2002), la modification exponentiel du PAI (emPAI) (Ishihama, 2005) ou encore l'utilisation de model informatique prédictif comme l'APEX (*Absolute Protein Expression Profiling*) (Lu *et al.*, 2007).

Ces méthodes *label free* montrent une précision et une justesse moindres par rapport aux approches par marquage (Holman *et al.*, 2012). Dans le cadre d'une étude de biomarqueur, où il est nécessaire de détecter et de quantifier de manière juste et précise des protéines d'intérêt, cet aspect présente une réelle problématique. De plus la sensibilité de cette approche est limitée, ce qui représente un inconvénient majeur pour la quantification de protéines minoritaires. Cependant, ces approches présentent l'avantage de ne pas ajouter d'étapes supplémentaires dans la préparation d'échantillon, d'être moins onéreuses et de ne pas présenter de limitation dans le nombre d'échantillons pouvant être comparés (Bantscheff *et al.*, 2007).

Les approches par marquage des protéines ou des peptides :

Afin de pallier les problèmes relatifs aux approches par gels, différentes stratégies *off gel* de marquage ont été développées. Ce marquage peut s'opérer au niveau protéique ou au niveau peptidique, sur des groupements spécifiques de la séquence (cystéines, lysine ou amine N-terminale). Parmi les méthodes de marquage, nous pouvons distinguer le marquage métabolique, où le marquage s'effectue lors de la synthèse *in vitro* des protéines, et le marquage par dérivation chimique ou enzymatique, intervenant au moment de la préparation d'échantillon.

Parmi les marquages métaboliques, nous pouvons citer la méthode **SILAC** (*Stable Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture*) où les cellules de la première condition sont mises en culture dans un milieu classique non marqué tandis que les cellules de la seconde condition sont mises en culture dans un milieu où certains acides aminés ont été remplacés par une forme marquée isotopiquement (¹³C), généralement la leucine ou la lysine (Ong *et al.*, 2002, 2003). Après 5 duplications cellulaires, les acides aminés marqués seront totalement incorporés au niveau protéique (Ong, 2012). Après lyse des cellules des deux cultures, les extraits de protéines sont mélangés, éventuellement séparés par gel d'électrophorèse SDS-PAGE, digérés puis analysés par LC-MS/MS. Les peptides et protéines sont quantifiés relativement à partir de la différence de signal obtenue en MS. Cette stratégie est limitée par le côté chronophage et coûteux et par le nombre restreint de conditions biologiques pouvant être comparées en une seule analyse. Cependant, le côté précoce du marquage et la combinaison des échantillons limitent grandement la variabilité technique des différentes étapes du processus et augmente la justesse de quantification (Bantscheff *et al.*, 2007).

Parmi les marquages par dérivation, nous pouvons tout d'abord citer la stratégie **ICAT** (*Isotope-Coded Affinity Tag*) proposée par l'équipe de Ruedi Aebersold en 1999, permettant la quantification relative de protéines entre deux échantillons (Gygi *et al.*, 1999). Cette méthode consiste à modifier chimiquement les **protéines** contenues dans les échantillons avec un réactif comportant un groupement iodoacétamide, un bras espaceur et un tag biotine. Le réactif va se fixer par

l'intermédiaire de son groupement iodoacétamide sur les groupements thiol des cystéines. L'un des échantillons est marqué avec un réactif léger (8 hydrogènes au niveau du bras espaceur), l'autre avec un réactif lourd (8 deutériums au niveau du bras espaceur pour la première génération de réactif). Après marquage, les deux échantillons sont combinés et digérés, puis les peptides marqués sont purifiés par affinité. Ces peptides sont ensuite analysés par LC-MS/MS. Le rapport de l'intensité des pics de l'analyse MS entre les peptides lourds et légers permet de fournir une abondance relative des peptides, et donc des protéines, entre les deux échantillons. Cette stratégie présente les inconvénients d'induire une séparation entre les peptides marqués par le tag lourd et ceux marqués par le tag léger en RP-HPLC, provoquée par la présence des deutériums (effet isotopique), et d'influencer la fragmentation du peptide à cause de la présence du tag sur les peptides (Ong *et al.*, 2005). Ces limitations ont donné lieu aux développements de tags clivables après capture sur phase solide des peptides contenant des cystéine (Qiu *et al.*, 2002 ; Zhou *et al.*, 2002) et de tags clivables marqués au ^{13}C (Li *et al.*, 2003 ; Yi *et al.*, 2005). Cependant, cette stratégie est limitée par l'absence de cystéines dans la séquence de certaines protéines, ou de leur faible représentation (Ong *et al.*, 2005).

Une autre stratégie de marquage chimique des protéines, nommée **ICPL** (*Isotope-Coded Protein Label*) a été développée (Schmidt *et al.*, 2005). Cette stratégie met en œuvre le marquage des groupements amine libres des protéines par réaction avec un ester N-nicotinoyloxy-succinimide. Ce marqueur est ajouté aux échantillons sous sa forme légère ou lourde (4 deutériums) et avant mélange des échantillons. Les protéines subissent ensuite une étape de fractionnement (1DE, 2DE ou HPLC), une étape de digestion et sont analysées par LC-MS/MS. Les protéines sont quantifiées relativement par comparaison de l'intensité des pics en MS (lourd vs léger).

Une autre stratégie basée sur la réaction des amines avec un ester N-hydroxy-succinimide, mais au niveau peptidique cette fois (amines N-terminales et amines des lysines), a été développée en 2004 par Ross *et al.*. Il s'agit de l'approche **iTRAQ** (*isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification*), permettant la quantification relative entre quatre échantillons (Ross *et al.*, 2004). Les quatre échantillons digérés sont marqués par quatre réactifs ayant la particularité d'avoir la même masse globale mais des masses de groupement *reporter* et *balance* différentes. Ainsi les peptides des quatre échantillons subissent les mêmes modifications, mais ils génèrent des ions *reporters* de masses différentes lors de la fragmentation des peptides dont l'intensité sera utilisée pour la quantification relative entre les échantillons. Aujourd'hui, jusqu'à huit échantillons peuvent être traités simultanément (Evans *et al.*, 2012). Une autre stratégie de marquage chimique au niveau peptides des amines, proche de la stratégie iTRAQ, a été proposée : approche **TMT** (*tandem mass tags*) (Thompson *et al.*, 2003).

La quantification ciblée par Selected Reaction Monitoring (SRM)

Le mode d'acquisition ciblée par **Selected Reaction Monitoring (SRM)** couplé à l'utilisation de peptides de référence isotopiquement marqués (**SID, Stable Isotope Dilution**) présente alors un avantage pour la quantification relative et absolue des protéines car l'analyse est uniquement dédiée aux protéines d'intérêt.

Ce mode d'acquisition a été décrit à la fin des années 1970 (Zakett *et al.*, 1978) et a été utilisé dans un premier temps pour la quantification de petites molécules. Nous rencontrons fréquemment les termes de *Single Reaction Monitoring* et *Multiple Reaction Monitoring (MRM)*. Le terme MRM désigne l'application du mode d'acquisition SRM à plusieurs ions fils provenant d'un seul ou de plusieurs ions précurseurs. Cependant, le mot *Multiple* peut porter à confusion et peut être confondu avec le mode d'acquisition *Consecutive Reaction Monitoring*, aussi appelée MRMⁿ, où plusieurs modes SRM sont réalisés en série. Ces termes ont été retirés de la nomenclature IUPAC en 2006 (Murray *et al.*, 2006 ; Murray, 2010).

Depuis quelques années, la quantification ciblée par SRM a été au cœur de nombreuses études protéomiques (Hüttenhain *et al.*, 2012 ; Kim *et al.*, 2012 ; Gillette *et al.*, 2013).

La stratégie SRM, tire avantage des spectromètres de masse en tandem, généralement de type triple quadripôle (QqQ), capables d'agir comme des filtres de masse et de sélectionner un **ion précurseur** particulier (peptide issu de la digestion enzymatique) dans le premier analyseur, de le fragmenter dans le deuxième (cellule de collision) et de sélectionner un ou plusieurs **ions fils** dans le troisième. Les couples ion précurseur/ion fils, également appelés **transitions**, peuvent être suivis au cours du temps, ce qui permet d'obtenir un profil chromatographique pour une transition particulière (Figure 29). Au cours d'une même analyse, plusieurs ions précurseurs peuvent être suivis. Grâce à ces deux niveaux de sélection dans une gamme de masse restreinte, le mode SRM présente une grande spécificité et sensibilité.

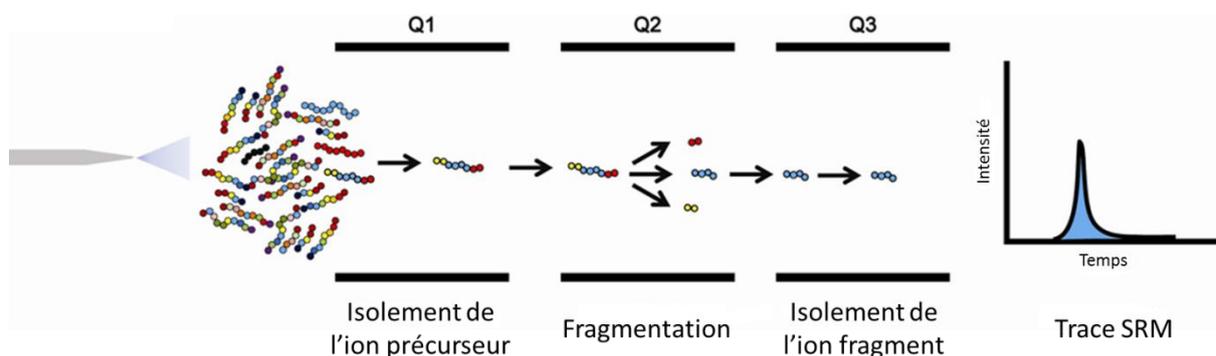


Figure 29 : Stratégie LC-SRM. Les peptides sont séparés par RP-HPLC.

D'après (Angel *et al.*, 2012b). Un des peptides protéotypiques sélectionnés est isolé dans Q1, fragmenté dans Q2 et les ions fragments correspondants aux transitions sélectionnées pour ce peptide sont tour à tour isolés dans Q3.

L'intégration du pic chromatographique pour chaque transition permet d'obtenir une quantification relative du peptide ciblé et donc de la protéine d'intérêt entre différents échantillons. Une quantification absolue d'un échantillon particulier peut également être établie si des standards de référence isotopiquement marqués quantifiés précisément sont utilisés.

L'application de cette stratégie de quantification aux protéines a été plus compliquée que pour les petites molécules et a demandé des développements supplémentaires. En effet, les études protéomiques impliquent l'analyse d'échantillons plus complexes, exprimant des protéines dans une large gamme dynamique. De plus, les protéines sont de trop grosses molécules pour pouvoir être analysées directement, des étapes supplémentaires sont nécessaires pour la génération de peptides par digestion enzymatique, généralement par la trypsine, puis pour leur séparation par HPLC. La quantification des protéines s'effectue indirectement sur ces peptides issus de la digestion. Il se pose alors le problème de l'efficacité des enzymes de digestion et de la différence de réponse en spectrométrie de masse des peptides générés. En effet, la réponse des différents peptides d'une même protéine peut varier d'un facteur 100 en intensité (Picotti *et al.*, 2007). L'ensemble de ces éléments pourraient affecter la spécificité de la méthode ainsi que la détection de protéines faiblement exprimées.

Le nombre et le choix des protéines d'intérêt, des peptides précurseurs et des transitions sont donc des étapes cruciales dans l'établissement d'une méthode de quantification d'une protéine d'intérêt par SRM. La validation et l'optimisation des transitions sont également des étapes importantes (Figure 30). L'ensemble de ces étapes sera détaillé dans le chapitre IV consacré à la SRM.

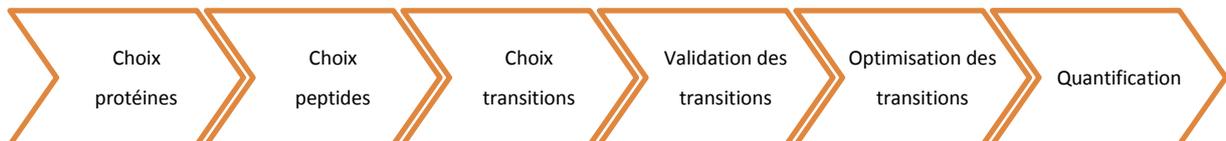


Figure 30 : Processus de développement d'une méthode d'analyse protéomique par SRM.





Chapitre III : Développement d'une méthode analytique HPLC-UV et nanoLC-MS/MS pour l'identification de protéines salivaires de tique

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de ce manuscrit, la salive de tique est importante non seulement lors du repas sanguin, mais également pour lutter contre la réponse immunitaire de l'hôte, et au cours du processus de transmission de l'agent pathogène. Il peut donc être utile d'identifier les molécules actives présentes dans cette salive pour comprendre le mécanisme de l'infection. Ceci permettrait de développer de nouvelles stratégies empêchant la transmission du pathogène, notamment le développement d'un vaccin combiné ciblant à la fois l'agent pathogène et le vecteur.

Nous nous intéresserons dans ce chapitre aux interactions vecteur/pathogène/hôte. L'objectif était d'identifier les molécules contenues dans des extraits de glandes salivaires de tiques ayant un effet sur l'inflammation cutanée, et d'étudier leur régulation en cas d'infection par *Borrelia*.

I- Introduction

L'identification de molécules à partir de salive ou d'extraits de glandes salivaires de tique n'est pas aisée, du fait de la quantité limitée de matériel biologique (Valenzuela, 2004). Les premières études reposaient essentiellement sur des approches classiques de biochimie et de biologie moléculaire, où les activités étaient détectées sur des extraits bruts non purifiés de glandes salivaires de plusieurs dizaines, voire centaines, de tiques. Ensuite, une à deux molécules étaient identifiées comme responsables de ces activités. Ainsi, la prostaglandine E2, ayant une activité antiplaquettaire, a été identifiée par dosage radio-immunologique (Ribeiro *et al.*, 1985). A partir des années 1990, les techniques de séparation par HPLC et de séquençage de protéines, comme la dégradation d'Edman, ont été appliquées à ces études afin de caractériser les molécules responsables des activités mises en évidence sur les extraits bruts. Ainsi, Waxman *et al.* ont identifié le peptide TAP (*Tick Anticoagulant Peptide*) ayant une activité anticoagulante (Waxman *et al.*, 1990). Les techniques d'électrophorèse sur gel commençaient également à voir le jour dans de telles études, mais uniquement pour contrôler la pureté de la molécule isolée. Par la suite, des méthodes dites à haut débit ont vu le jour avec la construction de banques d'ADN complémentaire, obtenues à partir de la transcription inverse d'ARN messager contenu dans les extraits bruts de glandes salivaires de tiques. L'avènement de ces banques a permis de réaliser un criblage d'activité sur plusieurs dizaines de molécules qui ont été par la suite isolées et caractérisées (Das *et al.*, 2001 ; You *et al.*, 2001 ; Valenzuela *et al.*, 2002).

Lors de notre étude, nous avons envisagé une stratégie de séparation d'extraits de glandes salivaires de tiques par RP-HPLC, la réalisation de tests d'activité biologique et l'identification des protéines par nanoLC-MS/MS. Nous nous sommes intéressés à l'effet d'extraits de glandes salivaires de tiques sur la réponse immunitaire innée de l'hôte et plus particulièrement sur l'inflammation cutanée. Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons vu que l'immunité innée est la première ligne de défense, non spécifique et immédiate, de notre organisme face à une agression. Parmi les éléments qui la composent, nous retrouvons les barrières érigées par l'organisme, dont la peau, et l'inflammation. De plus, lors de l'infection par *Borrelia*, l'agent pathogène et la salive de tique sont inoculés au niveau de la peau. L'étude de l'inflammation cutanée est particulièrement intéressante pour mettre en évidence la réponse immunitaire innée à la piqûre de tique et à l'infection par *Borrelia*.

Nous présenterons, dans un premier temps, la mise au point de la séparation par HPLC des molécules présentes dans des extraits de glandes salivaires de tiques. Dans un deuxième temps, nous présenterons les méthodes *in vitro* développées par nos collaborateurs pour évaluer l'activité sur la réponse immunitaire innée cutanée des extraits de glandes salivaires. Après avoir établi le modèle biologique, ces méthodes seront mises en œuvre pour réaliser une étude différentielle entre des tiques non infectées ou infectées par la bactérie *Borrelia*. Enfin, l'étude s'orientera plus particulièrement vers l'analyse d'extraits de glandes salivaires de tiques non infectées.

II- Mise au point de la méthode

L'élevage de tiques est effectué par nos collaborateurs mais s'est révélé être une étape critique tout au long de notre projet. Tout d'abord, l'obtention d'une tique adulte est longue. Après éclosion des œufs, la tique doit prendre deux repas sanguins et effectuer deux mues, puis réaliser un dernier repas sanguin à la stase adulte pour la femelle. La mue dure en moyenne un mois, que ce soit aux stases larvaire ou nymphale. Après éclosion ou mue, une période d'au moins un mois doit être respectée avant de déposer les tiques sur souris ou lapin. Ensuite, l'étape de repas sanguin sur un hôte, certes courte par rapport aux autres étapes de l'élevage, est délicate. En effet, il faut dans un premier temps choisir l'hôte le mieux adapté à la stase de la tique (souris pour les tiques larves et nymphes et lapin pour les tiques adultes). Il faut ensuite s'assurer de la survie de cet hôte tout au long du repas sanguin. Enfin, il faut empêcher que l'hôte ne se débarrasse des tiques déposées sur lui. Un second aspect critique est la production de tiques infectées par la bactérie, obtenues selon le protocole décrit dans la partie expérimentale.

De ce fait, la disponibilité de glandes salivaires de tiques, infectées ou non, peut être très faible. Il a donc été nécessaire, lors du démarrage de ce projet, de miniaturiser au maximum notre système d'analyse en développant une méthode de séparation par micro-HPLC.

A/ Optimisations des conditions chromatographiques sur une chaîne Agilent

Nous avons opté pour une séparation des extraits bruts de glandes salivaires par RP-HPLC sur une chaîne HPLC Agilent 1100series et une colonne Agilent Zorbax SB-C18 (500 μm x 15 cm, 5 μm) (Agilent Technologies, Palo Alto, USA).

Influence de l'agent d'appariement d'ions

Dans un premier temps, nous avons évalué l'influence de l'agent d'appariement d'ion et mis au point le gradient d'élution.

La composition chimique des phases mobiles joue un rôle important, non seulement lors de la séparation chromatographique, mais aussi lors de l'ionisation dans la source du spectromètre de masse. Un agent d'appariement d'ion est généralement utilisé afin d'augmenter l'hydrophobicité des molécules ionisées de manière à ce qu'elles soient mieux retenues sur une phase inverse. Cet agent forme, d'une part des liaisons ioniques avec les molécules à séparer par l'intermédiaire de son groupement chargé et, d'autre part des interactions hydrophobes avec la phase stationnaire. L'acide formique (FA) et l'acide trifluoroacétique (TFA) sont deux agents d'appariement d'ions classiquement utilisés pour la séparation et l'analyse de peptides ou protéines.

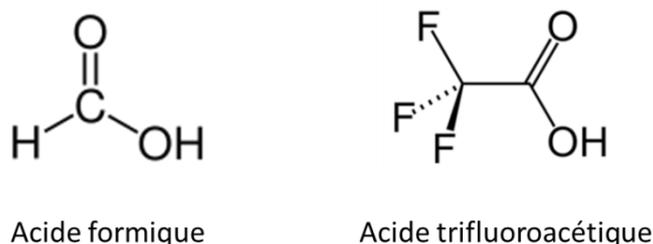


Figure 31 : Agents d'appariement d'ions couramment utilisés pour la séparation des peptides et protéines.

Il est connu que le TFA engendre une baisse de sensibilité pour la détection de peptides ou protéines par spectrométrie de masse (couplage LC-ESI-MS) (García, 2005). La cause de cette perte est la paire d'ions formée entre l'anion trifluoroacétate et l'analyte qui reste associée dans la source électrospray du spectromètre de masse (McCalley, 2005). Quant au FA, il n'est pas l'agent d'appariement d'ions préféré d'un point de vue de la séparation chromatographique car il engendre des pics plus larges et une séparation moins efficace par rapport au TFA (Huber *et al.*, 1999 ; McCalley, 2005). En effet, le pKa du FA est de 3,7, ce qui signifie que dans une solution aqueuse classique contenant 0,1 % FA (pH=2,7) très peu d'ions formiate se forment (<8%). Dans une solution contenant 50 % d'acétonitrile (ACN) et 0,1 % FA ce pourcentage devient <3% (Loeser, 2009). Or ce sont ces ions formiates qui sont responsables de l'appariement d'ions. De plus, E. Loeser a montré que la présence de FA dans les solvants perturbe beaucoup la ligne de base en détection UV en début de gradient d'ACN, particulièrement si la composition initiale de ces solvants est riche en eau (Loeser, 2009).

Pour notre étude, nous avons envisagé une méthode de séparation par HPLC avec une détection par spectrophotométrie UV. Etant donné la faible quantité de matériel biologique disponible, l'optimisation de la détection UV était donc intéressante. Nous avons évalué l'influence de l'agent d'appariement d'ions en comparant les résultats obtenus pour le TFA et le FA. Le signal obtenu, après injection de 1 pmol de digestat tryptique de BSA, dans les deux conditions de phase mobile est présenté sur la Figure 32.

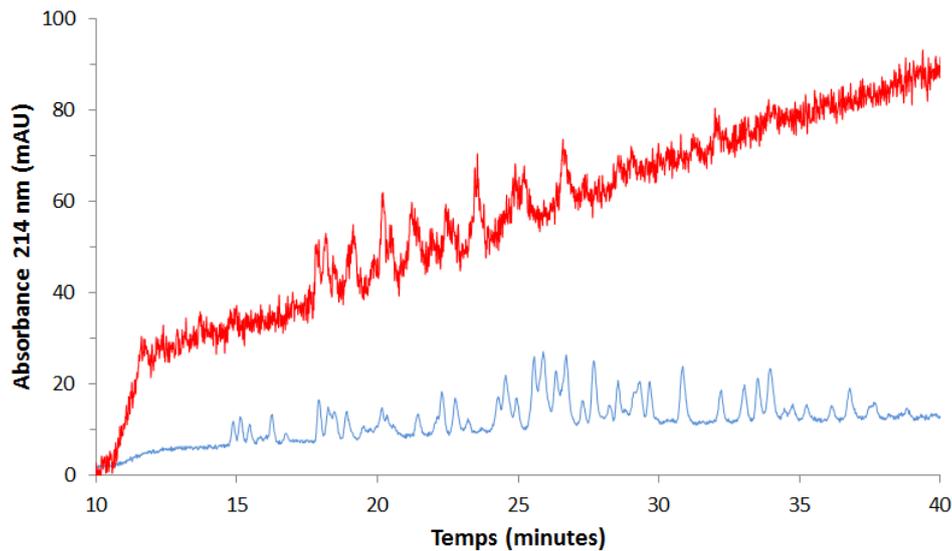


Figure 32 : Influence de l'agent d'appariement d'ions en HPLC.

Injection : 1 pmol de digestat de BSA. Pré-colonne : Agilent Zorbax 300SB-C18, 1 mm x 17 mm, 5 μ m. Colonne : Agilent Zorbax SB-C18, 500 μ m x 15 cm, 5 μ m. Solvants : H₂O + 0,05 % TFA / ACN + 0,045 % TFA (bleu) et H₂O + 2 % ACN + 0,1 % FA / ACN + 2 % H₂O + 0,1 % FA (rouge). Débit : 11 μ L/min. Gradient : isocratique à 5 % pendant 5 min, gradient de 5 % à 55 % en 50 min, gradient de 55 % à 70 % en 5 min. Détection : 214 nm.

La Figure 32 nous confirme que la séparation des peptides est meilleure avec le TFA et montre que le signal obtenu avec le FA est entaché d'un bruit de fond plus important et une forte déviation de la ligne de base. Le TFA a donc été retenu comme agent d'appariement d'ions.

Optimisation du gradient d'ACN

Nous avons ensuite procédé à l'optimisation du gradient d'ACN pour la séparation d'extraits de glandes salivaires de tiques. Les différents gradients testés sont rassemblés dans le Tableau 6.

Gradient 1 (1 % ACN / min)		Gradient 2 (0,5 % ACN / min)		Gradient 3 (biphasique)	
Temps (min)	% solvant B	Temps (min)	% solvant B	Temps (min)	% solvant B
0	2	0	2	0	2
5	2	5	2	5	2
83	80	161	80	20	9,5
				100	29,5
				160	59,5

Tableau 6 : Gradients testés lors de l'optimisation de la séparation d'extraits de glandes salivaires de tiques.
Le solvant B correspond au solvant B : ACN + 0,045 % TFA.

Les chromatogrammes obtenus pour les deux premiers gradients sont présentés en Figure 33 et montrent un effet bénéfique de la pente la plus faible.

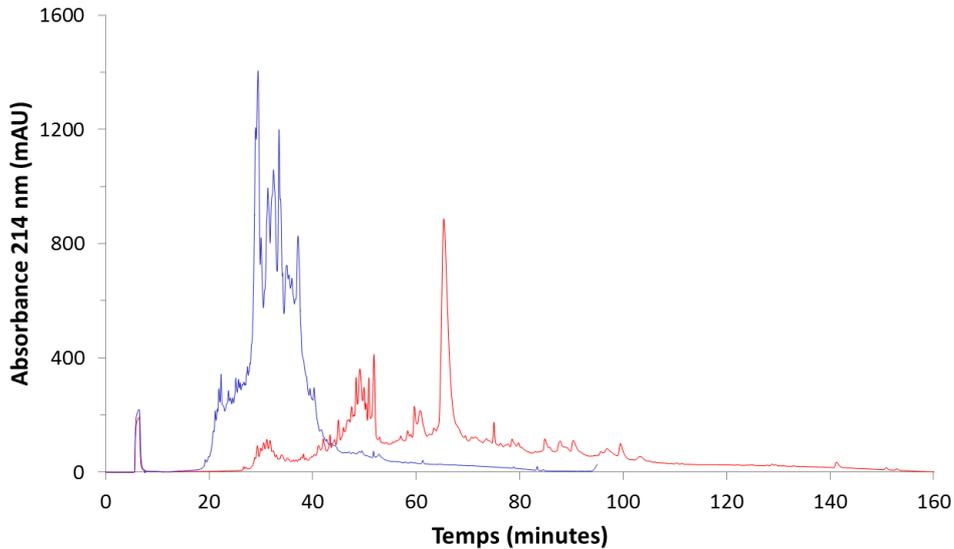


Figure 33 : Optimisation du gradient pour la séparation d'extraits de glandes salivaires de tiques.

Injection : Equivalent de 1,4 tiques non infectées et non nourries. Pré-colonne : Agilent Zorbax 300SB-C18, 1 mm x 17 mm, 5 μ m. Colonne : Agilent Zorbax SB-C18, 500 μ m x 15 cm, 5 μ m. Solvant A : H₂O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 11 μ L/min. Gradient : gradient 1 du Tableau 6 (bleu) et gradient 2 du Tableau 6 (rouge). Détection : 214 nm.

Afin d'améliorer la séparation dans la première partie du chromatogramme, entre 20 et 60 min, nous avons appliqué un gradient avec une pente à 0,25% d'ACN par min dans cette zone (Tableau 6, Gradient 3). Le chromatogramme obtenu est présenté en Figure 34. Les conditions de cette dernière séparation, présentant le meilleur profil chromatographique, ont été retenues pour la suite de notre étude.

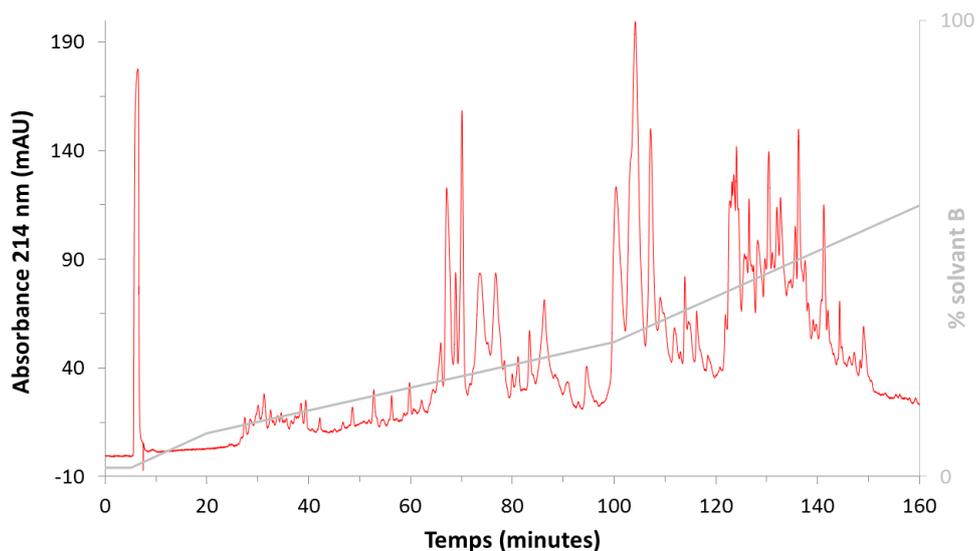


Figure 34 : Chromatogramme d'un extrait de glandes salivaires dans les conditions optimisées de séparation.

Injection : équivalent de 1,4 tiques non infectées et non nourries. Pré-colonne : Agilent Zorbax 300SB-C18, 1 mm x 17 mm, 5 μ m. Colonne : Agilent Zorbax SB-C18, 500 μ m x 15 cm, 5 μ m. Solvant A : H₂O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 11 μ L/min. Gradient : gradient 3 du Tableau 6 (gris). Détection : 214 nm (rouge).

Nous pouvons remarquer ici la différence de profil en fin de gradient entre 100 et 160 min par rapport au profil obtenu entre 60 et 120 min avec le gradient 2, soit une même pente de gradient dans cette zone. Ceci peut être expliqué par le pic majoritaire observé à 60 min avec le gradient 2 qui écrase tout le signal, ou par une variation biologique importante d'un extrait de glandes salivaires à l'autre, comme nous le verrons plus tard.

B/ Couplage microHPLC-UV-MS

Une fois le gradient optimisé, nous avons couplé le système chromatographique à un spectromètre de masse ESI-IT HCT Ultra (Bruker Daltonics). Ainsi, nous avons pu attribuer des masses à un pic observé en UV, comme illustré dans la Figure 35. Cependant, l'attribution des masses n'a pas été évidente pour l'ensemble des spectres ESI-MS obtenus tout au long de l'analyse et était également dépendante de l'analyse (Figure 35).

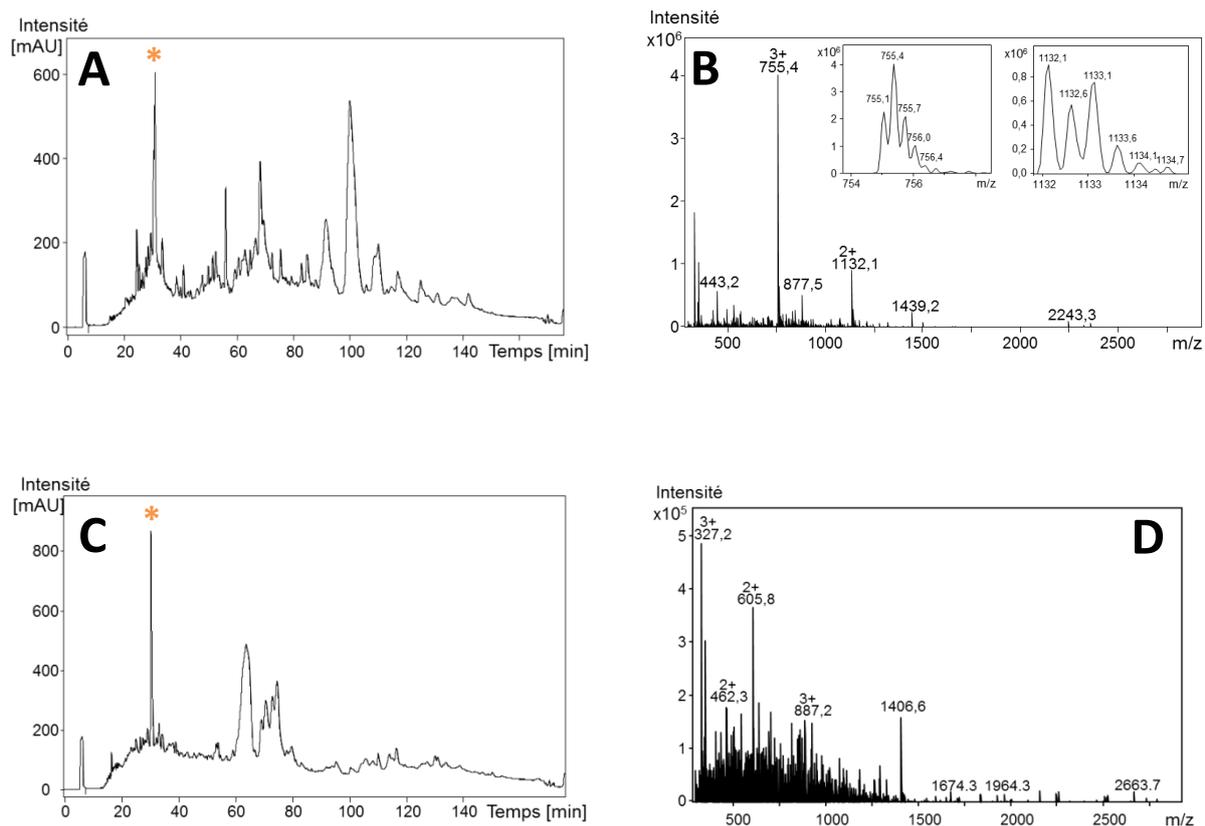


Figure 35 : Analyse d'extraits de glandes salivaires de tiques sur un couplage HPLC-UV-MS.

- (A) chromatogramme d'un extrait de glandes salivaires de tiques non infectées n'ayant pas réalisé de repas sanguin
 (B) : spectre ESI-MS correspondant au pic indiqué par une étoile à 30,5 min sur le chromatogramme A.
 (C) : chromatogramme d'un extrait de glandes salivaires de tiques infectées ayant réalisé un repas sanguin de trois jours.
 (D) : spectre ESI-MS correspondant au pic indiqué par une étoile à 30,5 min sur le chromatogramme C.
 Les conditions chromatographiques sont celles optimisées et présentées dans la Figure 34. Les spectres ESI-MS ont été obtenus sur un piège à ions tridimensionnel HCT Ultra (Bruker Daltonics).

Bien que ces analyses nous aient apporté des renseignements précieux sur le type de molécules présentes dans les extraits de glandes salivaires (peptides ou protéines), elles ont surtout révélé la complexité des échantillons. Cela nous a conduits à l'optimisation de la collecte et de la digestion pour parvenir à l'identification des molécules contenues dans les extraits de glandes salivaires.

C/ Mise au point de la stratégie d'identification par spectrométrie de masse des protéines salivaires de tiques

Les stratégies de nanochromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem (nanoLC-MS/MS) sont majoritairement appliquées en analyse protéomique pour l'identification des protéines. Pour l'analyse d'extraits de glandes salivaires de tiques, nous avons mis en place une stratégie de digestion enzymatique des fractions par la trypsine en milieu liquide, suivie d'une analyse nanoLC-MS/MS. Cette stratégie a été réalisée sur un couplage nanoHPLC-ChipCube (Agilent Technologies) avec un piège à ion tridimensionnel HCT plus ou amaZon (Bruker Daltonics).

L'identification des protéines a été obtenue après traitement de l'ensemble des données nanoLC-MS/MS obtenues. Comme nous l'avons vu précédemment, cette approche est fondée sur la comparaison de listes de masses théoriques et expérimentales. Deux paramètres importants entrent en compte : le choix du ou des moteur(s) de recherche et le choix de la banque de données.

- Lors de nos études, nous avons utilisé deux moteurs de recherche : Mascot et OMSSA. Mascot (Perkins *et al.*, 1999) est utilisé en routine depuis longtemps par de nombreux laboratoires. OMSSA (Geer *et al.*, 2004), plus récent, est utilisé en routine depuis trois ans dans notre laboratoire, conjointement avec Mascot.
- Le génome de la tique *I. ricinus* n'est pas séquencé, et très peu de protéines de cette espèce sont aujourd'hui présentes dans les banques de données (Tableau 7) : environ 170 séquences pour les banques UniProtKB et NCBIInr et 3 séquences pour la banque SwissProt. Nous n'avons donc pas pu travailler sur une banque d'*I. ricinus*. Dans une telle situation, il faut soit travailler avec une banque d'un organisme proche, permettant d'identifier des molécules identiques entre les deux organismes, soit réaliser du séquençage *de novo*, permettant d'identifier des protéines homologues avec des organismes proches. Dans notre cas, le génome de l'espèce *I. scapularis*, présente majoritairement aux Etats-Unis, est totalement séquencé. Comme le montre le Tableau 7, le nombre de séquences dans les banques correspondantes est plus conséquent : environ 21 130 séquences pour les banques UniProtKB et NCBIInr (125 fois plus que pour *I. ricinus*) et 33 séquences pour la banque SwissProt (10 fois plus que pour *I. ricinus*). *I. scapularis* est la seule espèce du genre *Ixodes* dont le génome a été séquencé. Comme nous pouvons le remarquer à partir des données du

Tableau 7, seulement quelques centaines de séquences supplémentaires sont présentes dans les banques, plus générales, du genre *Ixodes*.

Nous pouvons remarquer que le nombre de séquences issues de la banque SwissProt est plus faible. Ceci est principalement dû au fait que la banque SwissProt est une banque corrigée et annotée manuellement avec des informations extraites de la littérature. Ces banques croissent donc plus lentement, d'autant plus pour les organismes peu étudiés. Nous n'avons donc pas travaillé sur cette banque.

Le nombre de séquences dans les banques UniProtKB et NCBIInr est très proche, et l'utilisation de ces deux banques a montré des résultats identiques dans notre projet. La banque de donnée retenue pour notre étude d'extraits de glandes salivaires a été la banque NCBIInr du genre *Ixodes*, présentant le plus grand nombre de séquences.

	Banque SwissProt	Banque UniProtKB	Banque NCBIInr
Espèce <i>Ixodes ricinus</i>	3	168	169
Espèce <i>Ixodes scapularis</i>	33	21 119	21 129
Genre <i>Ixodes</i>	38	21 555	21 571

Tableau 7 : Nombre de séquences contenues dans les banques de données SwissProt, UniProtKB et NCBIInr pour les espèces *I. ricinus* et *I. scapularis* et pour le genre *Ixodes*, en date du 16 novembre 2012.

D/ Optimisation de la digestion enzymatique

De nombreux protocoles de digestion enzymatique en milieu liquide sont décrits dans la littérature. Toutefois, afin d'identifier de façon optimale les protéines contenues dans les fractions d'extraits de glandes salivaires de tiques, nous avons cherché à optimiser ces conditions pour nos échantillons (Tableau 8).

Le tampon NH_4HCO_3 0,1 M, urée 8 M, pH 8,2 est classiquement utilisé pour les digestions en milieu liquide après dilution jusqu'à 1 M d'urée (protocole 5), non seulement dans notre laboratoire mais également dans la littérature (Picotti *et al.* 2007). Il a donc été naturellement retenu pour cette optimisation. La présence d'urée dans le tampon permet de dénaturer les protéines et d'augmenter leur solubilité dans le tampon, notamment celles des protéines hydrophobes.

En 2001, Russel a montré que la présence de solvant organique dans le tampon de digestion améliorait la digestion enzymatique (Russell *et al.*, 2001). Par exemple, la digestion dans un tampon contenant 80 % d'ACN a montré un pourcentage de couverture plus élevé des protéines identifiées, une digestion plus rapide et une digestion plus complète (Hervey *et al.*, 2007 ; Arsene *et al.*, 2008). Cependant, l'utilisation d'un fort pourcentage de solvant organique lors de la digestion reste controversée. En effet, les raisons de l'amélioration de la digestion ne sont pas établies et il a été

montré que l'activité de la trypsine était largement réduite au-delà de 40 % d'ACN dans le tampon et présentait un maximum d'activité entre 10 et 40 % (Wall *et al.*, 2011). Pour montrer l'effet bénéfique ou non de l'ACN sur les fractions d'extraits de glandes salivaires de tiques, nous avons testé un tampon Tris-HCl 25 mM (protocoles 1 et 2) et un tampon NH₄HCO₃ 25 mM (protocoles 3 et 4) avec ou sans ACN (10 %).

Protocole	Tampon	Réduction	Alkylation	Digestion
1	Tris-HCl, 25 mM, pH 8,8	DTT 10mM 1h, 60°C	IAA 30mM 1h, T amb, noir	Trypsine 1 nuit, 37°C
2	Tris-HCl, 25 mM, ACN 10 %, pH 8,8	DTT 10mM 1h, 60°C	IAA 30mM 1h, T amb, noir	Trypsine 1 nuit, 37°C
3	NH ₄ HCO ₃ 25 mM, pH 7,8	DTT 10mM 1h, 60°C	IAA 30mM 1h, T amb, noir	Trypsine 1 nuit, 37°C
4	NH ₄ HCO ₃ 25 mM, ACN 10 % pH 7,8	DTT 10mM 1h, 60°C	IAA 30mM 1h, T amb, noir	Trypsine 1 nuit, 37°C
5	Urée 8 M, NH ₄ HCO ₃ 0,1 M pH 8,2	DTT 12mM 30 min, 37°C	IAA 40mM 1h, T amb, noir	Dilution à 1M urée Trypsine 1 nuit, 37°C

Tableau 8 : Différents protocoles testés lors de l'optimisation de la digestion enzymatique en milieu liquide.

Les protocoles ont été comparés deux à deux sur un ensemble de cinq fractions d'un extrait de glandes salivaires de tiques distribuées le long du chromatogramme HPLC. Les cinq fractions ont été traitées selon deux protocoles puis les peptides issus de la digestion enzymatique ont été analysés par nanoLC-MS/MS. Dans un premier temps, les *base peak chromatogramms* (BPC) issus des analyses de chacune des fractions ont été comparés afin de déterminer les différences de signaux entre les protocoles. La fraction la plus représentative pour chaque comparaison sera présentée ici. Dans un second temps, le nombre de protéines identifiées sur l'ensemble des cinq fractions, après recherche à l'aide de deux moteurs de recherche (Mascot et OMSSA) dans la banque *Ixodes*, a été comparé (Figure 36).

Nous avons tout d'abord comparé les protocoles 1 et 2, puis 3 et 4 afin d'évaluer l'influence de l'ACN. La Figure 37-A montre que le signal obtenu après une digestion sans ACN présente des pics supplémentaires. De même, le nombre de protéines identifiées par recherche dans la banque *Ixodes* à l'aide de Mascot et OMSSA montre que l'ajout d'ACN ne permet pas d'identifier des protéines supplémentaires (Figure 37-B). En effet, nous pouvons remarquer qu'une seule protéine est identifiée en présence d'ACN alors que 6 autres protéines l'étaient en absence d'ACN. Nous observons la même tendance pour le tampon NH₄HCO₃ avec des pics supplémentaires et un nombre de protéines identifiées plus élevé en absence d'ACN (Figure 38). Ces résultats montrent que, dans notre cas, il n'y a pas d'intérêt à travailler dans un milieu contenant 10% d'ACN.

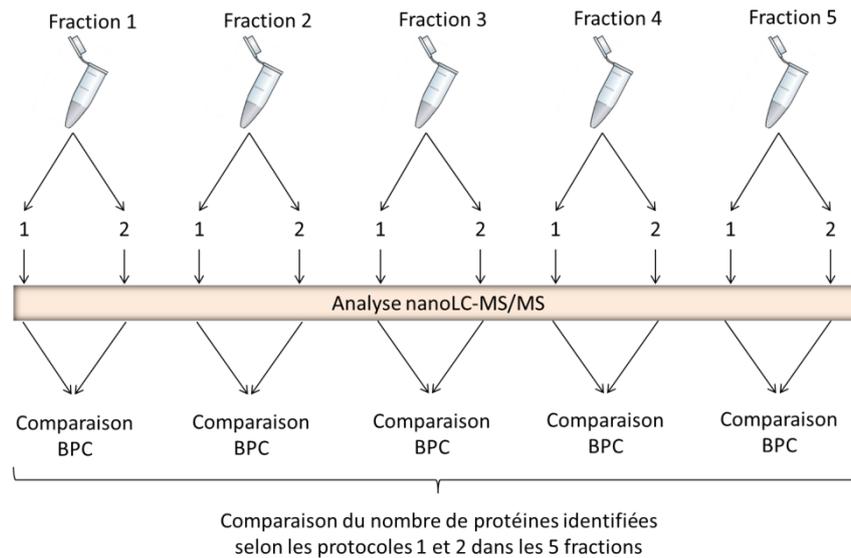
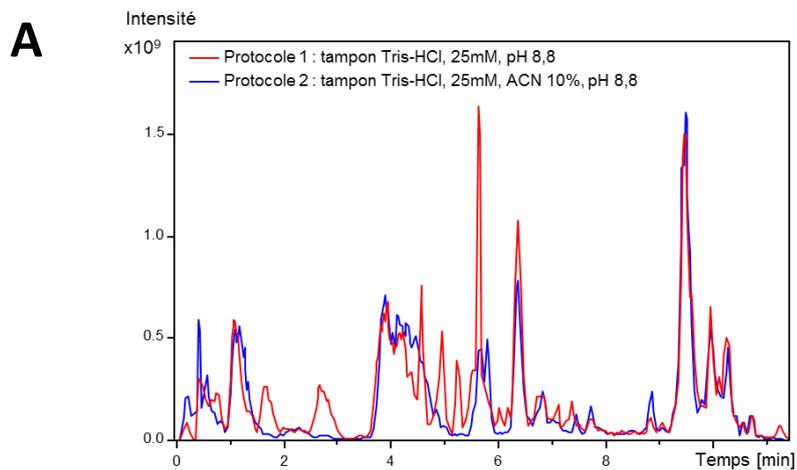


Figure 36 : Optimisation du protocole de digestion.

Les protocoles sont comparés deux à deux. Un ensemble de cinq fractions est traité selon les deux protocoles en question, 1 et 2 dans l'exemple. Les peptides sont analysés par nanoLC-MS/MS. Les deux *base peak chromatograms* (BPC) obtenus pour une fraction, puis le nombre de protéines identifiées sur l'ensemble des cinq fractions sont comparés.

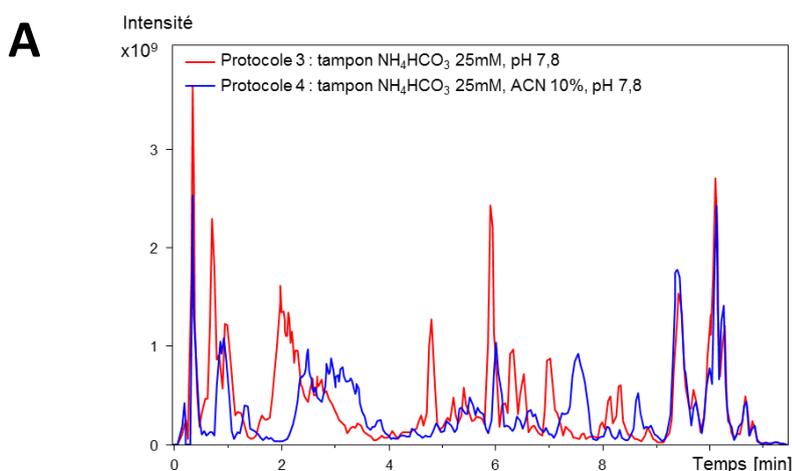


B

	Tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8,8	Tampon Tris-HCl 25 mM, ACN 10%, pH 8,8
Nombre de protéines identifiées (banque <i>Ixodes</i> , Mascot et OMSSA)	7	1

Figure 37 : Optimisation du protocole de digestion : comparaison des protocoles 1 et 2.

(A) : Comparaison des BPC d'une fraction d'extrait de glandes salivaires de tique éluée entre 5 et 7 min en microHPLC-UV.
 (B) : Comparaison du nombre de protéines identifiées dans un ensemble de cinq fractions éluées entre 5 et 7 min, 21 et 23 min, 37 et 39 min, 53 et 55 min, 69 et 71 min.



B

	Tampon NH_4HCO_3 25 mM, pH 7,8	Tampon NH_4HCO_3 25 mM, ACN 10%, pH 7,8
Nombre de protéines identifiées (banque <i>Ixodes</i> , Mascot et OMSSA)	22	13

Figure 38 : Optimisation du protocole de digestion : comparaison des protocoles 3 et 4.

(A) : Comparaison des BPC d'une fraction d'extrait de glandes salivaires de tique éluée entre 77 et 79 min en microHPLC-UV.

(B) : Comparaison du nombre de protéines identifiées dans un ensemble de cinq fractions éluées entre 13 et 15 min, 29 et 31 min, 45 et 47 min, 61 et 63 min, 77 et 79 min.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé les protocoles 1 et 3. La Figure 39 montre des profils de BPC globalement semblables. Par contre, ces deux protocoles se démarquent par le nombre de protéines identifiées. En effet, le tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8,8 (protocole 1) permet l'identification de 13 protéines alors que le tampon NH_4HCO_3 25 mM, pH 7,8 (protocole 3) permet l'identification de 5 protéines seulement. Le protocole 3 n'a donc pas été retenu pour la suite de l'étude.

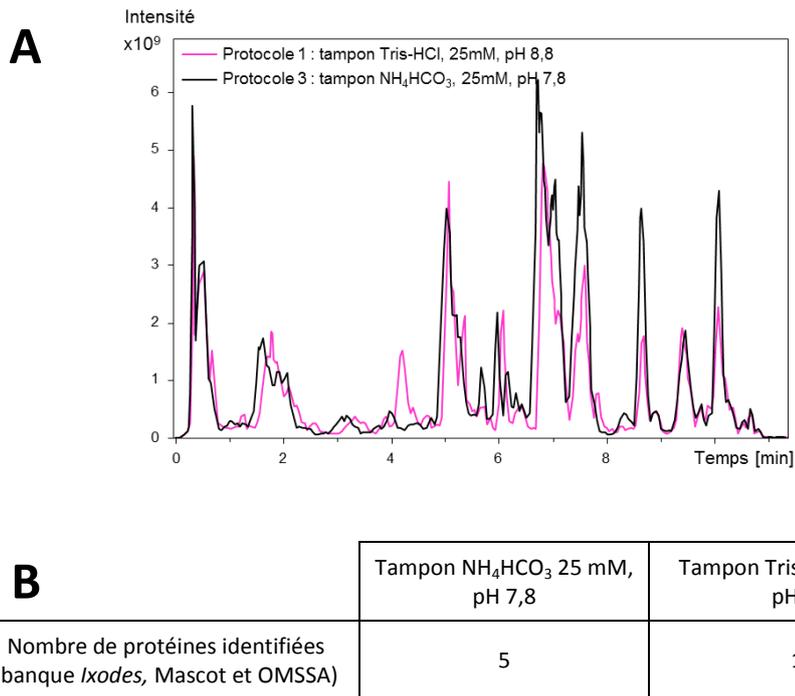
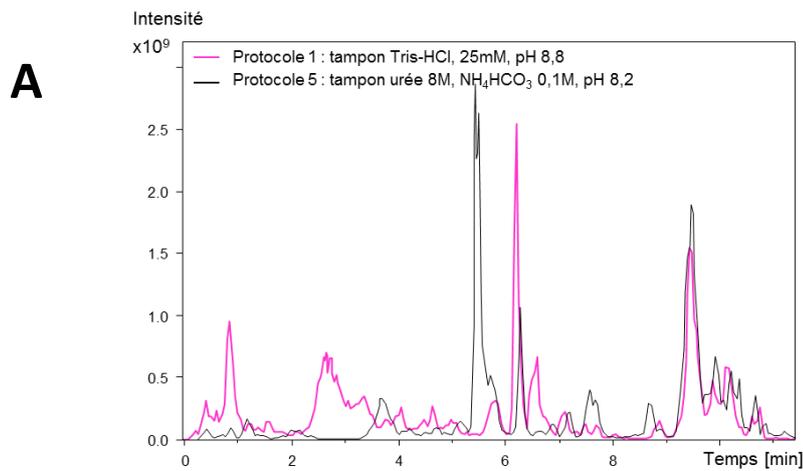


Figure 39 : Optimisation du protocole de digestion : comparaison des protocoles 1 et 3.

(A) : Comparaison des BPC d'une fraction d'extrait de glandes salivaires de tique éluée entre 59 et 61 min en microHPLC-UV.

(B) : Comparaison du nombre de protéines identifiées dans un ensemble de cinq fractions éluées entre 11 et 13 min, 27 et 29 min, 43 et 45 min, 59 et 61 min, 75 et 77 min.

Enfin, nous avons comparé les protocoles 1 et 5 (Figure 40). Au vu des profils des BPC, il est difficile de privilégier une condition par rapport à l'autre. En effet, nous pouvons remarquer qu'il y a des pics supplémentaires, ou de plus forte intensité, non seulement pour le tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8,8 mais également pour le tampon NH_4HCO_3 0,1 M, urée 8 M, pH 8,2. En revanche, le nombre de protéines identifiées permet de différencier ces deux tampons, avec 19 protéines identifiées en absence d'urée contre 3 identifiées en présence d'urée. Le protocole 5 a ainsi été éliminé.



B

	Tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8,8	Tampon urée 8 M, NH_4HCO_3 0,1 M, pH 8,2
Nombre de protéines identifiées (banque <i>Ixodes</i> , Mascot et OMSSA)	19	3

Figure 40 : Optimisation du protocole de digestion : comparaison des protocoles 1 et 2.

(A) : Comparaison des BPC d'une fraction d'extrait de glandes salivaires de tique éluée entre 49 et 51 min en microHPLC-UV.

(B) : Comparaison du nombre de protéines identifiées dans un ensemble de cinq fractions éluées entre 17 et 19 min, 33 et 35 min, 49 et 51 min, 65 et 67 min, 81 et 83 min.

Dans cette partie, nous avons démontré que le protocole le plus adapté à notre problématique de digestion en milieu liquide de fractions d'extraits de glandes salivaires de tiques est le protocole 1 (Figure 41). Le tampon dans lequel la digestion est réalisée est un tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8,8. La réduction des ponts disulfure est réalisée avec du dithiothreitol, à une concentration finale de 10 mM, pendant 1 heure à 60°C. Les cystéines sont alkylées par l'iodoacétamide, à une concentration finale de 30 mM, pendant 1 heure dans le noir et à température ambiante. Ce protocole sera utilisé pour la suite de notre étude sur les glandes salivaires de tiques.

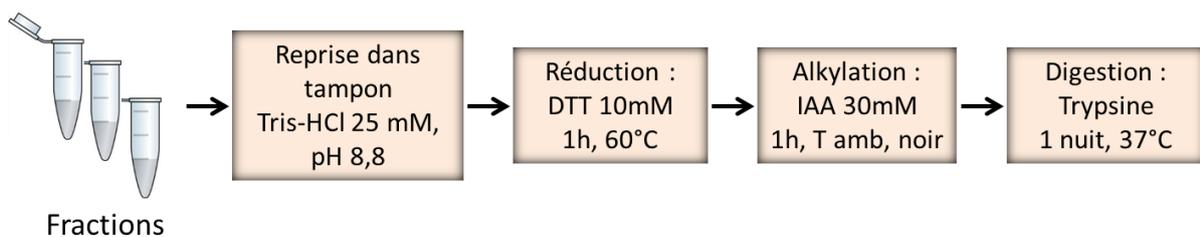


Figure 41 : Protocole de digestion retenu.

E/ Transfert de la méthode chromatographique sur un système Thermo

Au cours de ma thèse, le laboratoire s'est muni d'une chaîne micro-HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fischer Scientific) qui devait être dédiée à la séparation d'extraits de glandes salivaires de tiques. Il a donc fallu transférer la méthode en place sur la chaîne 1100series (Agilent Technologies). Ce transfert de méthode d'un système chromatographique à l'autre a été réalisé en collaboration avec Vanessa Dub au cours de son stage de Master 2. Les paramètres des deux systèmes sont récapitulés dans le Tableau 9.

Au cours de ce transfert de méthode nous avons travaillé sur un digestat trypsique de BSA afin de mettre au point l'ensemble des paramètres du nouveau système. Les aspects qui seront particulièrement discutés ici sont :

- l'injecteur
- le collecteur
- le détecteur
- la colonne

Module	Paramètre	Système Agilent Technologies	Système Thermo Fischer Scientific
Injecteur	Température de l'injecteur	5°C	5°C
	Volume injecté	5 µL pour les GS 1 µL pour 1 pmol de digestat de BSA	1 µL pour 1 pmol de digestat de BSA
	Mode d'injection	Prélèvement direct	User Define Programm (UDP)
Pompe	Solvant de chargement	H ₂ O + 0,1 % TFA	H ₂ O + 0,1 % TFA
	Débit de chargement	50 µL/min	15 µL/min
	Temps de chargement	3 min	3 min
	Solvant d'éluion A	H ₂ O + 0,05 % TFA	H ₂ O + 0,05 % TFA
	Solvant d'éluion B	ACN + 0,045 % TFA	ACN + 0,045 % TFA
	Débit d'éluion	11 µL/min	11 µL/min (colonne Agilent) ou 4 µL/min (colonne Dionex)
	Gradient GS	Gradient 3, Tableau 6	Gradient 3, Tableau 6
	Gradient BSA	isocratique à 5% pendant 5 min, gradient de 5 % à 55 % en 50 min, gradient de 55 % à 70 % en 5 min	isocratique à 5% pendant 5 min, gradient de 5 % à 55 % en 50 min, gradient de 55 % à 70 % en 5 min
Four	Pré-colonne	Agilent Zorbax 300SB-C18, 1 mm x 17 mm, 5 µm	Agilent Zorbax 300SB-C18, 1 mm x 17 mm, 5µm Ou Dionex Acclaim PepMap C18, 500 µm x 15 mm, 5 µm
	Colonne	Agilent Zorbax SB-C18, 500 µm x 150 mm, 5 µm	Agilent Zorbax SB-C18, 500µm x 150 mm, 5 µm Ou Dionex Acclaim PepMap C18, 300 µm x 15 cm, 3 µm
	Température	Température ambiante	Température ambiante
Détecteur	Longueur d'onde	214 nm	214 nm
	Cellule	500 nL	45 nL
	Chemin optique	10 mm	10 mm

Tableau 9 : Paramètres des systèmes chromatographiques Agilent Technologies et Thermo Fischer Scientific pour la séparation d'extraits de glandes salivaires de tiques ou d'un digestat de BSA.

- **Transfert de méthode : optimisation de l'injection**

Les injecteurs et collecteurs des deux systèmes chromatographiques à disposition ont un fonctionnement différent : le passeur d'échantillon de la chaîne Thermo Fischer Scientific remplit à la fois les fonctions d'injecteur et de collecteur alors que pour la chaîne Agilent Technologies les injecteur et collecteur sont deux modules distincts. Ceci impose donc un paramétrage différent du mode d'injection et du mode de collecte comme nous allons le voir.

Modes d'injection

Le premier paramètre de l'injecteur qui diffère entre les deux systèmes est le mode d'injection. En effet, sur le système Agilent Technologies l'aiguille est solidaire de la boucle d'injection et le prélèvement de l'échantillon se déroule comme présenté dans la Figure 42. Ce mode d'injection permet de prélever dans l'aiguille uniquement le volume nécessaire à l'analyse. Il évite donc toute perte superflue d'échantillon étant donné que l'injection se fait directement de l'aiguille vers la pré-colonne.

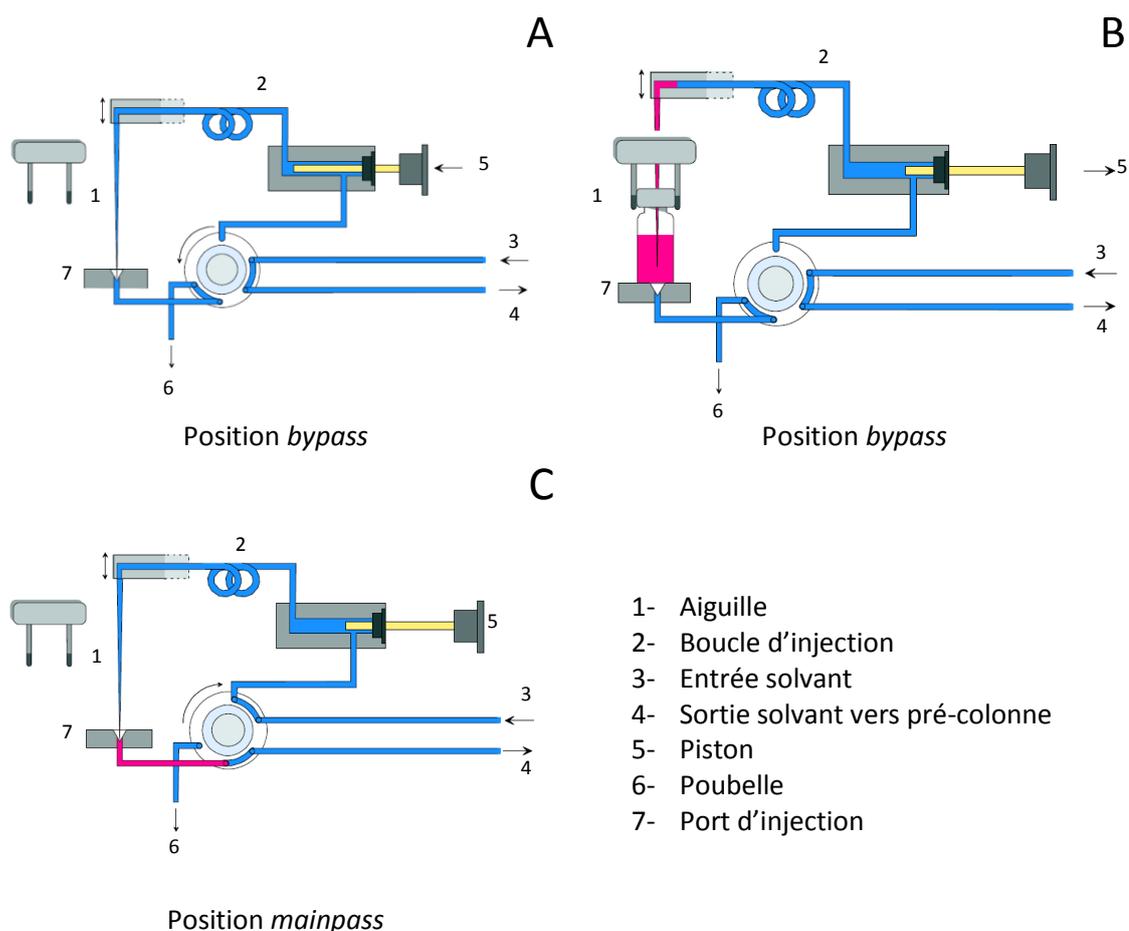


Figure 42 : Déroulement d'une injection sur le système Agilent Technologies.

(A) : La vanne d'injection bascule en position bypass. Cette position permet d'isoler l'ensemble boucle + aiguille de l'arrivée de solvant et de la pré-colonne. (B) : L'aiguille se positionne dans le *vial* de l'échantillon. Le déplacement du piston permet de prélever le volume d'échantillon nécessaire dans la boucle d'injection. Le solvant arrivant de la pompe s'écoule directement vers la pré-colonne. (C) : L'aiguille se positionne sur le port d'injection et la vanne d'injection bascule en position *mainpass*. Le volume prélevé est emmené vers la pré-colonne.

Sur le système Thermo Fischer Scientific, le mode de prélèvement est différent. En effet, l'aiguille et la boucle d'injection ne sont pas solitaires mais connectées entre elles par l'intermédiaire d'une vanne 8 voies. Dans les modes d'injection classiques, *Full loop* ou *Partial loop*, proposés pour la chaîne U 3000, seul le volume d'échantillon contenu dans la boucle est injecté et les

volumes contenus dans l'aiguille (2,4 μL dans notre cas) et au-delà de la boucle, dans le cas du mode *Full loop*, sont définitivement perdus (Figure 43). Etant donné les faibles quantités d'échantillons biologiques disponibles, nous ne pouvons pas travailler avec ces modes d'injections.

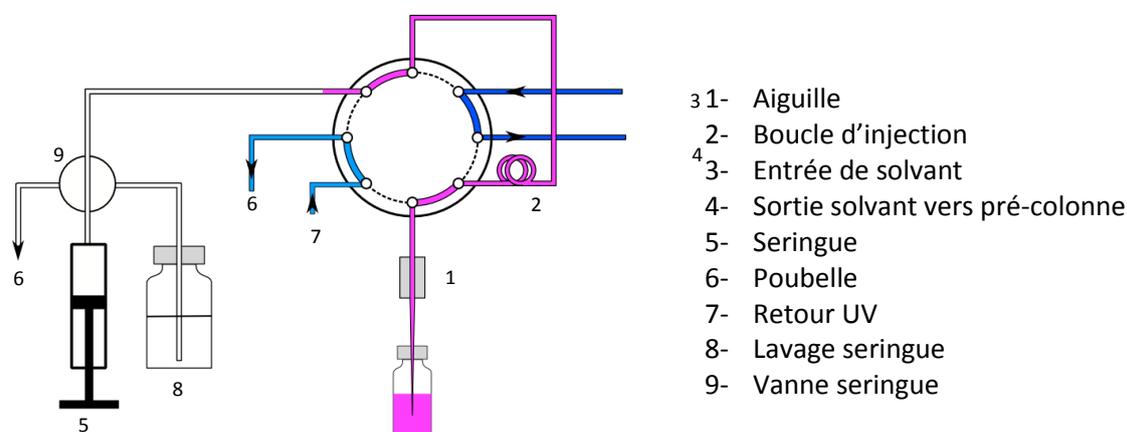


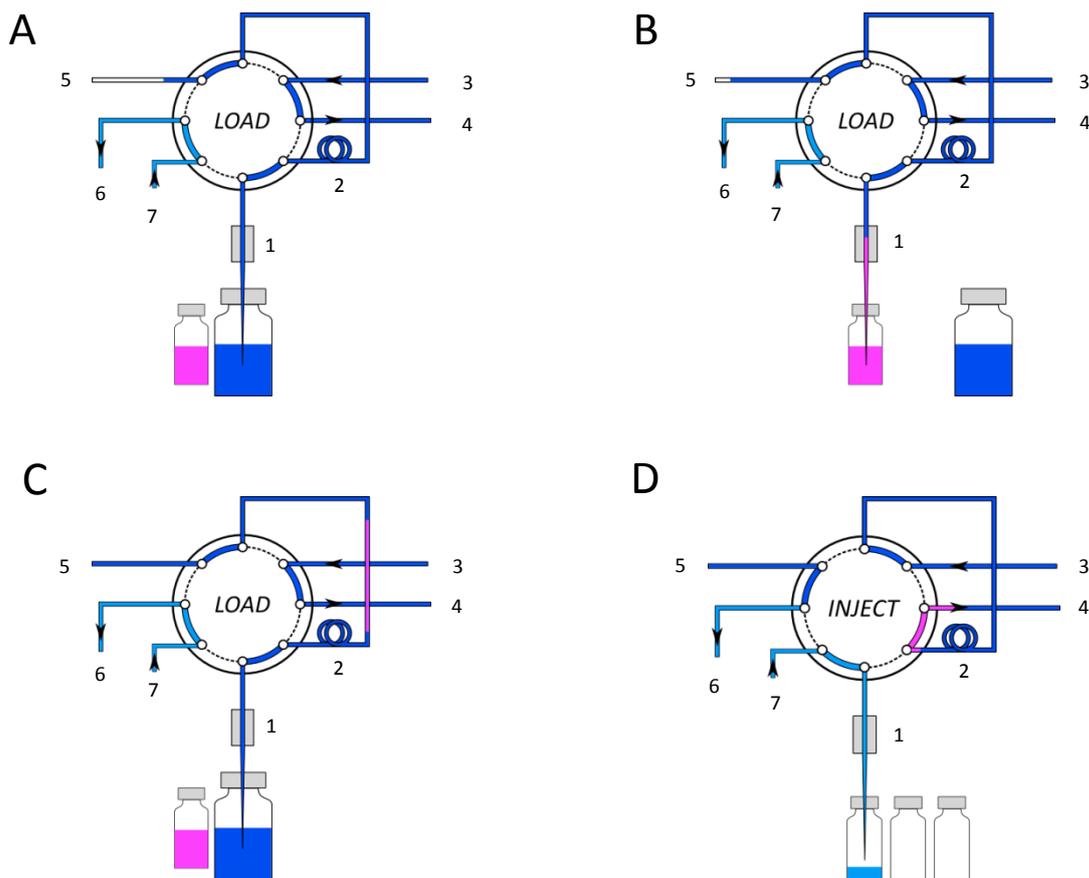
Figure 43 : Système d'injection de la chaîne chromatographique Thermo Fischer Scientific en mode collecte.
Le mode *full loop* est modélisé sur ce schéma. Le déplacement du piston de la seringue permet de remplir l'aiguille et la boucle d'injection avec l'échantillon. Lors du basculement de la vanne uniquement le volume contenu dans la boucle est injecté sur la pré-colonne. L'échantillon contenu dans l'aiguille et au-delà de la boucle est perdu.

Nous ne pouvons pas, non plus, utiliser le mode $\mu\text{L pick up}$ proposé par Thermo Fischer Scientific, où seul le volume nécessaire d'échantillon est prélevé, car il est incompatible avec la collecte. En effet, ce mode est programmé pour être compatible avec une vanne 6 voies, or pour la collecte nous travaillons avec une vanne 8 voies car l'injecteur et le collecteur ne sont qu'un seul et même module.

Nous avons alors choisi le mode d'injection *User Defined Programm (UDP)* qui nous a permis de développer nous-même un programme de type $\mu\text{L pick up}$, compatible avec notre configuration (Figure 44). Ce mode d'injection permet le prélèvement d'un faible volume et n'engendre aucune perte d'échantillon. Cependant, il faut noter que le volume d'échantillon à prélever est limité par les volumes de la boucle d'injection et de l'aiguille. Il ne doit pas excéder :

$$0,5 \times (\text{Volume boucle} - 3 \times \text{Volume aiguille}),$$

soit un volume de 6,4 μL dans notre cas (boucle de 20 μL et aiguille de 2,4 μL).



1 : aiguille, 2 : boucle d'injection, 3 : entrée de solvant, 4 : Sortie solvant vers pré-colonne,
5 : seringue, 6 : poubelle

Figure 44 : Déroulement d'une injection sur le système Thermo Fischer Scientific avec le mode UDP développé.

(A) : La vanne d'injection bascule en position de chargement, *Load*. Cette position permet d'isoler la boucle d'injection de l'arrivée de solvant et de la pré-colonne, et de la connecter à la seringue. L'aiguille se positionne dans un vial de liquide de transport. Le déplacement du piston de la seringue permet de prélever un volume de ce liquide déterminé par l'utilisateur, 20 μL dans notre cas. Ce liquide est constitué du solvant de chargement sur la pré-colonne et est utilisé pour encadrer le volume d'échantillon à prélever. (B) : L'aiguille se positionne dans le *vial* de l'échantillon à prélever. Le déplacement du piston de la seringue permet de prélever le volume nécessaire de l'échantillon (1 à 6 μL). (C) L'aiguille se positionne à nouveau dans le *vial* de liquide de transport afin de prélever un volume permettant de positionner l'échantillon au milieu de la boucle (défini par l'utilisateur). (D) : La vanne d'injection bascule en position d'injection, *Inject*, et le volume d'échantillon prélevé est emmené vers la pré-colonne. L'aiguille se positionne dans un *vial* ou un puits d'une plaque, et la collecte de fraction commence.

Répétabilité du mode UDP

La répétabilité d'injection du nouveau système a été vérifiée, afin de s'assurer du bon fonctionnement de l'injecteur avec le mode d'injection UDP développé. Pour cela, nous avons injecté à plusieurs reprises 1 μL d'un digest de BSA à 1 $\text{pmol}/\mu\text{L}$. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 45, le signal obtenu pour 3 injections consécutives est bien répétable.

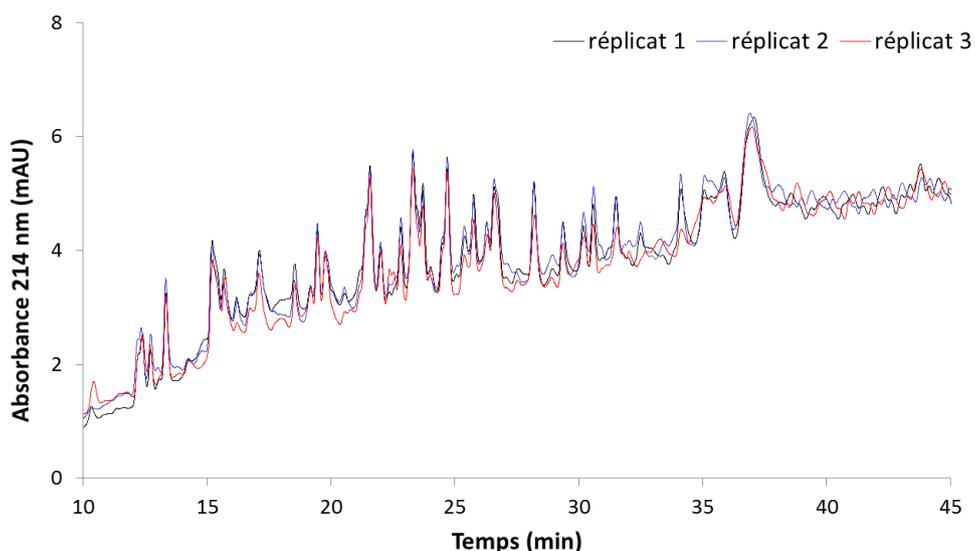


Figure 45 : Etude de la répétabilité d'injection du système chromatographique Thermo Fischer Scientific.

Injection : 3 x 1 pmol de digestat de BSA en mode UDP. Pré-colonne : Agilent Zorbax 300SB-C18, 1 mm x 17 mm, 5 μ m. Colonne : Agilent Zorbax SB-C18, 500 μ m x 15 cm, 5 μ m. Solvant A : H₂O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 4 μ L/min. Gradient : gradient BSA (Tableau 9). Détection : 214 nm, détecteur Thermo Fischer Scientific.

- **Transfert de méthode : optimisation de la collecte de fraction**

Scellage des plaques de collecte

Un problème que nous avons rencontré avec l'injecteur Thermo Fischer Scientific est un problème de condensation excessive, à l'intérieur du passeur réfrigéré à 5°C, lorsque la température et l'hygrométrie ambiantes sont élevées. Contrairement au passeur ou au collecteur Agilent Technologies, le passeur Thermo Fischer Scientific est ouvert à l'environnement extérieur et seul un capot s'ouvre et se referme en fonction du déplacement de l'aiguille, mais le passeur n'est jamais fermé de façon hermétique (Figure 46). De ce fait, l'eau contenue dans l'air ambiant se condense sur les parois de l'injecteur refroidi.



Figure 46 : Photos du passeur d'échantillon de la chaîne U3000 (Thermo Fischer Scientific).

Ceci est très gênant pour nos analyses. En effet certain de nos gradients durent trois heures et la plaque de collecte se remplit alors d'environ 3 à 4 μL d'eau de condensation, ce qui peut apporter des contaminations dans nos fractions collectées au cours de ces analyses. Il était donc impossible de réaliser la collecte dans les mêmes conditions que sur le système Agilent Technologies. Plusieurs solutions ont été envisagées : augmenter la température du passeur d'échantillon à 10°C pour éviter la condensation, placer la chaîne HPLC dans une pièce climatisée ou filmer les plaques de collecte pour empêcher les puits de se remplir. La première solution n'a pas permis de régler le problème, en effet, même à une température de 10°C la condensation était toujours présente. Une température encore plus élevée n'était pas envisageable car elle pouvait provoquer une dégradation des fractions collectées. La seconde solution n'a pas été mise en œuvre, car elle n'aurait probablement pas apporté d'amélioration. En effet, le laboratoire dispose d'une seconde chaîne U 3000 placée dans une pièce climatisée. La condensation à l'intérieur de l'injecteur est observée malgré la climatisation. C'est donc la troisième solution qui a été mise en œuvre : toutes nos plaques de collecte ont été scellées avec un film aluminium avant chaque injection.

Positionnement de l'aiguille

Un second aspect qui a nécessité quelques réglages lors de la collecte de fractions est la position de l'aiguille. En effet, nous avons observé que si la profondeur de pénétration de l'aiguille dans le puits de collecte n'était pas adaptée au débit de solvant, à la période de collecte et à la plaque 96 puits utilisée, des pertes ou des contaminations étaient induites (Figure 47).

Cette profondeur avait été ajustée auparavant pour le prélèvement de l'échantillon à partir d'une plaque 96 puits lors de l'injection. Dans ce cas, il est important de régler la profondeur de pénétration au maximum afin d'atteindre le fond du puits et ne pas risquer de prélever de l'air si le volume présent dans le puits correspond exactement au volume à injecter. Cependant, ce réglage n'est pas adapté pour la collecte de fractions car il engendre des contaminations croisées dues au fait que l'aiguille plonge dans toutes les fractions les unes après les autres et que dans un contexte de collecte le rinçage n'est pas envisageable. Au contraire, si l'aiguille ne pénètre pas assez profondément lors de la collecte, la dernière goutte d'une fraction ne tombe pas forcément dans le puits et est emportée avec l'aiguille. Cette goutte peut par la suite être déposée sur le film aluminium lorsque l'aiguille se retire ou tomber dans le puits de collecte suivant.

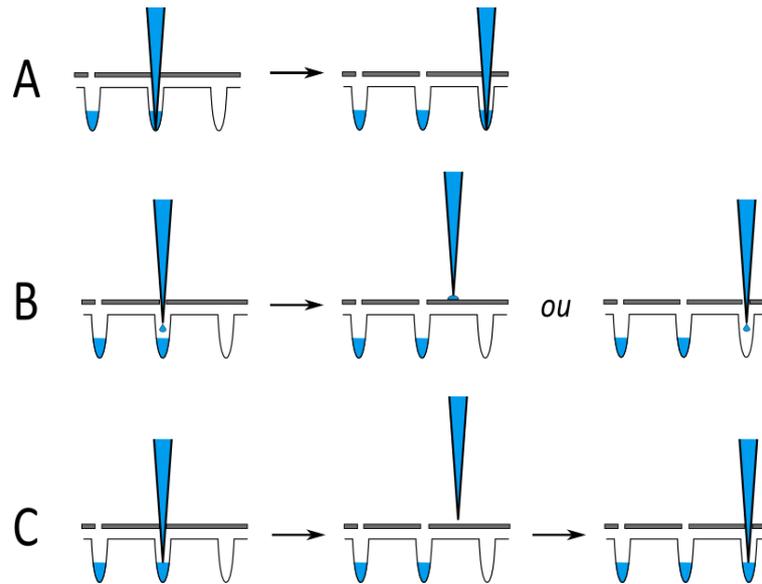


Figure 47 : Schématisation des problèmes rencontrés lors de la collecte dans des plaques scellées et de la solution apportée.

(A) : Mise en évidence des problèmes de contaminations croisées. (B) : mise en évidence des pertes d'échantillon. (C) : Ajustement de la profondeur de l'aiguille dans le puits de collecte.

La profondeur de pénétration de l'aiguille a été réglée de manière à ce que le niveau de liquide dans le puits en fin de période de collecte arrive à l'extrémité de l'aiguille en jouant sur deux paramètres : *sample height* (distance entre l'aiguille et le fond du puits) et *sample height offset* (distance entre le fond du puits et la face inférieure de la plaque de collecte) (Figure 48).

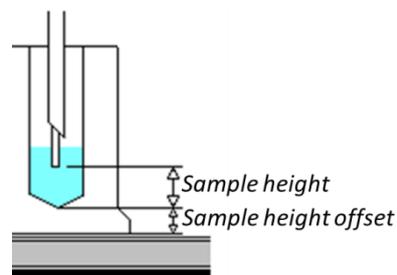


Figure 48 : Définition des paramètres *sample height* et *sample height offset*.

Dans le programme utilisé pour une analyse, il faut donc veiller à ce que les paramètres de pénétration de l'aiguille soient adaptés au début pour le prélèvement de l'échantillon à séparer (*sample height* = 0 mm et *sample height offset* = 0 mm), et qu'ils soient adaptés à la collecte de fractions au moment où celle-ci débute (*sample height* = 1 mm et *sample height offset* = 0,5 mm).

- **Transfert de méthode : optimisation de la détection**

Le troisième point qui nous a posé problème lors de ce transfert de méthode est la différence de sensibilité entre les deux systèmes. En effet, comme nous pouvons l'observer sur la Figure 49, le

signal UV (214 nm) obtenu après injection dans les mêmes conditions (Tableau 9) de 1 pmole de digestat de BSA montre une perte d'intensité d'un facteur 5, en moyenne, avec le système Thermo Fischer Scientific.

Etant donné que le nouveau système devait être dédié, au sein du laboratoire, aux analyses de faible quantité de glandes salivaires de tiques, il n'était pas satisfaisant d'observer une telle perte de sensibilité entre les deux systèmes. Nous avons alors effectué différents tests afin de déterminer l'origine de ce phénomène.

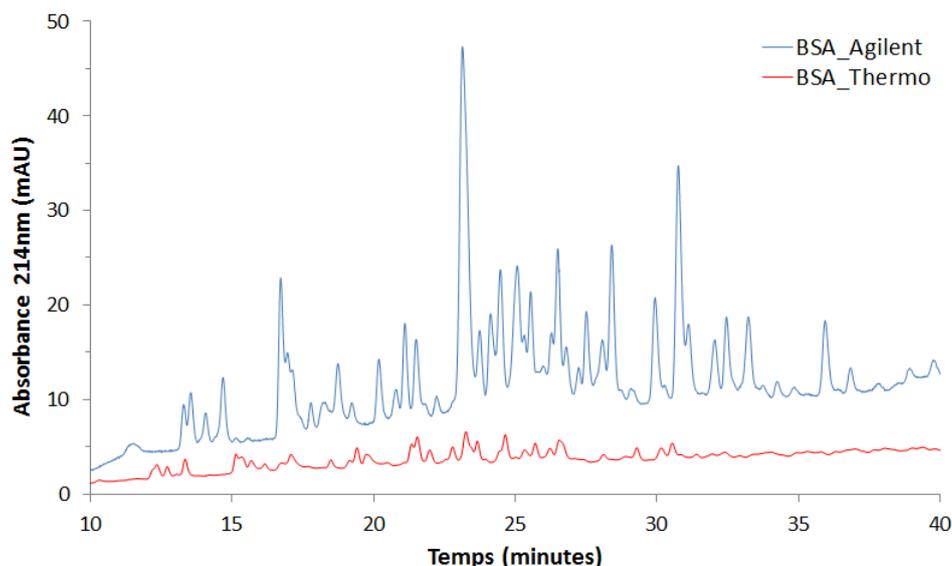


Figure 49 : Différence de sensibilité des systèmes chromatographiques étudiés.

Injection : 1 pmol de digestat de BSA sur les systèmes Agilent Technologies (bleu) et Thermo Fischer Scientific (rouge).
 Pré-colonne : Agilent Zorbax 300SB-C18, 1 mm x 17 mm, 5 μ m. Colonne : Agilent Zorbax SB-C18, 500 μ m x 15 cm, 5 μ m.
 Solvant A : H₂O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 11 μ L/min. Gradient : gradient BSA (Tableau 9).
 Détection : 214 nm.

Dans un premier temps, nous avons relevé que le seul paramètre qui différait entre les deux systèmes était le volume de la cellule du détecteur UV (Tableau 9). Elle était de 45 nL pour le détecteur Thermo Fischer Scientific alors qu'elle était de 500 nL pour le détecteur Agilent Technologies. Le volume de la cellule UV pourrait expliquer notre problème de sensibilité. En effet, en réduisant le volume de la cellule, c'est-à-dire en diminuant la section de celle-ci il est plus difficile de focaliser le faisceau incident (Zagatto *et al.*, 2011). Les faisceaux incidents qui se dispersent au sein de la cellule ont une tendance plus forte à s'écraser sur les parois de celle-ci lorsque la section de la cellule est plus petite, malgré un chemin optique identique. Ainsi une plus petite quantité de lumière atteint la photodiode et donc le signal est moins intense. Cependant, il ne faut pas oublier que si le volume de la cellule UV est trop grand, cela peut conduire à une perte de résolution. En effet, les composés venant d'être séparés sur la colonne sont dilués au sein de la cellule engendrant un mélange de ces composés et une résolution plus faible. Afin de savoir si l'origine de la perte de signal pouvait être affectée au volume de la cellule du détecteur UV du système Thermo Fischer Scientific, nous avons réalisé plusieurs injections de digestat de BSA dans les mêmes conditions avec

une cellule de volume 180 nL. Ces analyses nous ont montré que nous obtenions, comme attendu, une moins bonne résolution par rapport à la cellule de 45 nL, sans pour autant obtenir un gain en sensibilité. Le faible volume de la cellule UV n'était donc pas à l'origine de la perte de sensibilité avec le système Thermo Fischer Scientific.

Nous avons alors remis en cause notre programme d'injection UDP et envisagé que seule une très faible quantité de digestat était réellement injectée sur le système Thermo Fischer Scientific et non la picomole désirée. Le volume prélevé pour ces injections était de 1 μ L. Nous avons alors comparé des injections de 1 μ L de digestat de BSA (équivalent 1 pmol) selon le mode UDP avec une boucle de 20 μ L et selon le mode *full loop* avec une boucle de 1 μ L. Nous pouvons observer sur la Figure 50 que les deux injections ont donné un chromatogramme similaire. Le signal obtenu après une injection en mode *full loop* est légèrement plus intense et mieux résolu que celui obtenu pour le mode UDP, mais il est toujours beaucoup plus faible que celui obtenu sur la chaîne Agilent Technologies. Ces résultats montrent que ce problème de perte de sensibilité n'est pas causé par le mode d'injection UDP. De plus ce résultat nous a assuré que nous n'avions pas de perte d'échantillon au niveau de l'injecteur et a orienté la recherche de l'origine du problème vers la détection.

Nous avons également testé différentes longueurs d'onde (214 nm, 220 nm, 200 nm) pour évaluer l'influence de celle-ci sur la détection de notre échantillon de digestat de BSA. Aucune des longueurs d'onde testées n'a permis d'atteindre la sensibilité du système Agilent Technologies.

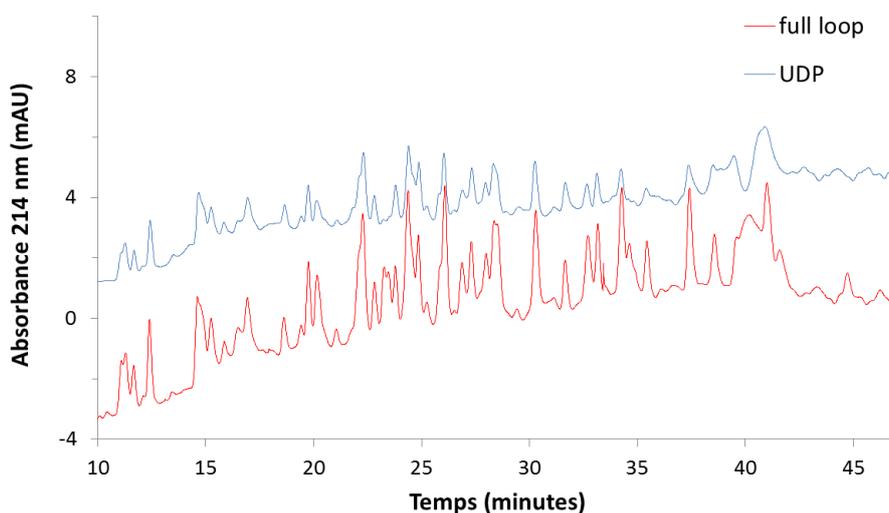


Figure 50 : Influence du mode d'injection sur le signal UV.

Injection : 1 pmol de digestat de BSA sur le système Thermo Fischer Scientific en mode UDP (bleu) et *Full loop* (rouge).
Pré-colonne : Agilent Zorbax 300SB-C18, 1 mm x 17 mm, 5 μ m. Colonne : Agilent Zorbax SB-C18, 500 μ m x 15 cm, 5 μ m.
Solvant A : H₂O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 11 μ L/min. Gradient : gradient BSA (Tableau 9).
Détection : 214 nm, détecteur Thermo Fischer Scientific.

Finalement, l'origine de la perte de signal a été trouvée en plaçant le détecteur Agilent Technologies sur la chaîne Thermo Fischer Scientific (travaux réalisés en collaboration avec Gilles Schnell). Nous avons comparé le signal obtenu pour un digestat de 4 pmol de BSA à celui obtenu avec le détecteur Thermo Fischer Scientific. Nous pouvons observer sur la Figure 51 une perte d'un facteur 5 en moyenne entre la chaîne U 3000 équipée du détecteur Agilent Technologies ou du détecteur Thermo Fischer Scientific, toutes choses étant égales par ailleurs. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer cette perte, notamment la géométrie différente de la cellule de mesure, ou un traitement de signal effectué en direct par le détecteur Agilent Technologies. Cette question n'a pas été élucidée par Thermo Fischer Scientific et reste aujourd'hui en suspens.

Ces tests nous ont cependant montré que la baisse de signal était uniquement due à un problème de détection des molécules et non à une perte de matériel biologique. En dépit du faible signal observé en UV, la quantité de matériel biologique était présente dans les fractions et nous pouvions utiliser ce nouveau système pour l'analyse d'extraits de glandes salivaires de tiques.

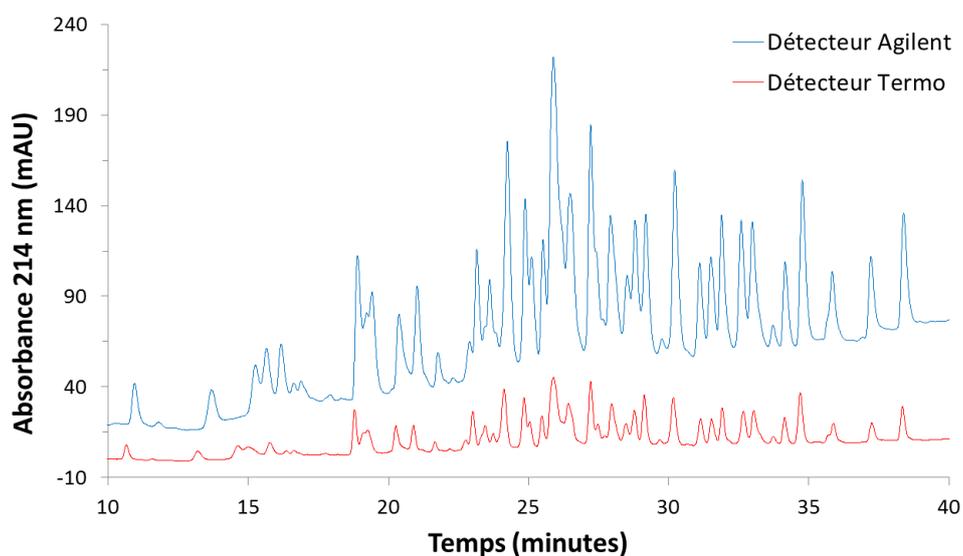


Figure 51 : Influence du détecteur sur le signal UV.

Injection : 4 pmol de digestat de BSA en mode UDP sur le système Thermo Fischer Scientific muni du VWD-3400RS (Thermo Fischer Scientific) (rouge) ou du détecteur 1315A DAD (Agilent Technologies) (bleu). Pré-colonne : Dionex Acclaim PepMap C18, 500 μm x 15 mm. Colonne : Dionex Acclaim PepMap C18, 300 μm x 15 cm, 3 μm . Solvant A : H₂O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. Gradient : gradient BSA (Tableau 9). Détection : 214 nm

Transfert de méthode : changement de colonne

Afin d'augmenter la sensibilité du nouveau système, nous avons décidé d'utiliser une colonne de plus faibles diamètre interne et granulométrie. Nous avons tout d'abord remplacé la colonne Agilent Zorbax SB-C18, 500 μm x 15 cm, 5 μm par une colonne Dionex Acclaim PepMap C18, 300 μm x 15 cm, 3 μm . Nous avons observé un gain de sensibilité d'un facteur 2 en moyenne ainsi qu'une bonne répétabilité avec plusieurs injections successives de 4 pmol d'un digestat de BSA (Figure 52).

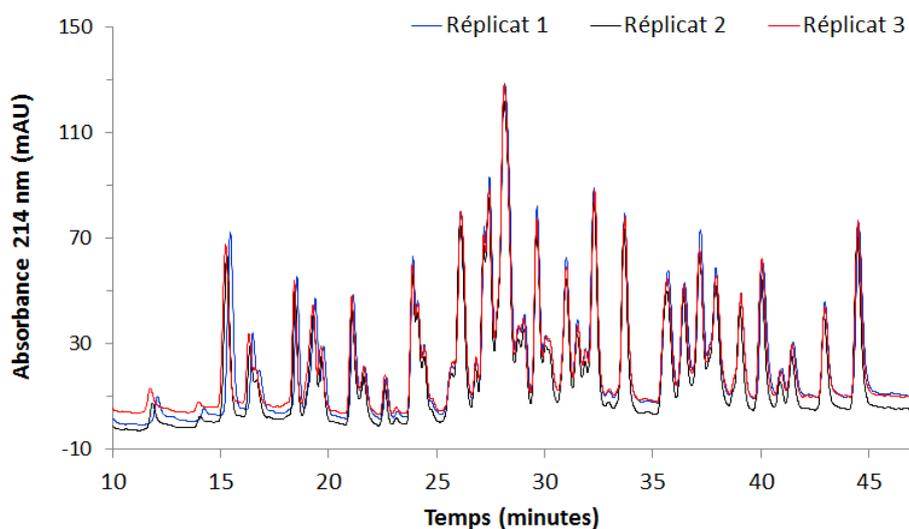


Figure 52 : Etude de répétibilité sur la colonne Dionex Acclaim PepMap C18, 3 µm.

Injection : 3 fois 8 pmol de digestat de BSA en mode UDP. Pré-colonne : Dionex Acclaim PepMap C18, 500 µm x 15 mm. Colonne : Dionex Acclaim PepMap C18, 300 µm x 15 cm, 3 µm. Solvant A : H₂O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 4 µL/min. Gradient : gradient BSA (Tableau 9). Détection : 214 nm, détecteur Thermo Fischer Scientific.

Nous avons également testé une colonne de granulométrie encore plus faible : Dionex Acclaim PepMap C18, 300 µm x 15 cm, **2 µm**. Lors de l'utilisation de ce type de colonne, nous nous sommes heurtés à un problème de répétibilité. En effet, comme nous pouvons l'observer sur la Figure 53, les temps de rétention des molécules éluées en début de gradient ne sont pas du tout répétables. Une augmentation du temps d'équilibration dans les conditions initiales n'a pas permis d'améliorer cette répétibilité. Ce phénomène a été observé sur plusieurs colonnes de granulométrie 2 µm que nous avons testées. En regardant plus précisément le profil de pression au cours de l'analyse, nous avons observé une instabilité de pression en début de gradient pouvant expliquer nos variations de temps de rétention. Après avoir testé plusieurs colonnes Dionex Acclaim PepMap C18, 300 µm x 15 cm, 2 µm, ce problème a finalement été attribué à un défaut de remplissage de la phase stationnaire de ces colonnes et nous avons pris la décision de ne plus les utiliser.

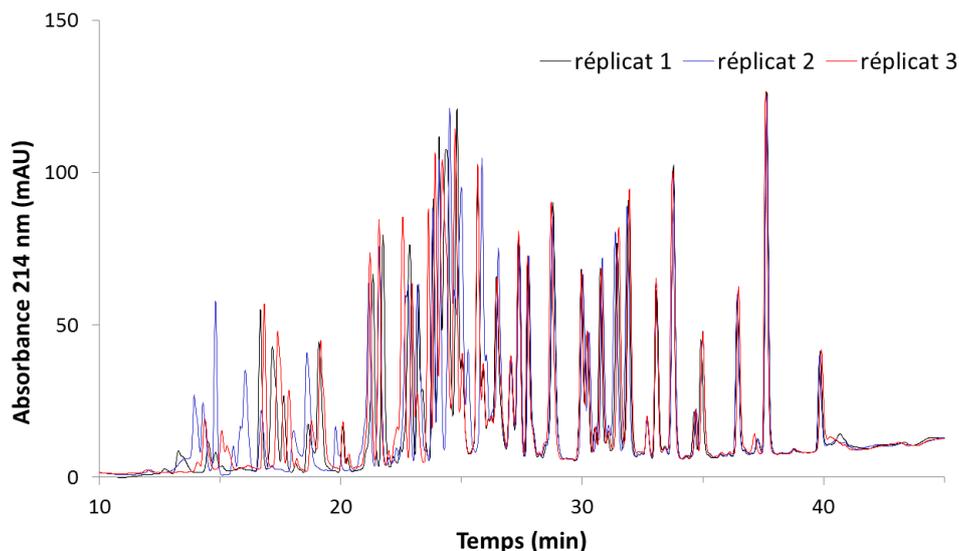


Figure 53 : Etude de répétibilité sur la colonne Dionex Acclaim PepMap C18, 2 μ m.

Injection : 3 fois 8 pmol de digestat de BSA en mode UDP. Pré-colonne : Dionex Acclaim PepMap C18, 500 μ m x 15 mm. Colonne : Dionex Acclaim PepMap C18, 300 μ m x 15 cm, 2 μ m. Solvant A : H₂O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 4 μ L/min. Gradient : gradient BSA (Tableau 9). Détection : 214 nm, détecteur Thermo Fischer Scientific.

F/ Conclusion

Dans cette partie nous avons mis au point une méthode de séparation par HPLC d'extraits de glandes salivaires de tiques, nous permettant d'analyser une très faible quantité d'échantillon biologique (< 2 tiques) (Figure 54). La stratégie retenue comporte une détection UV des peptides/protéines et une collecte de fractions. Dans l'optique d'identifier les molécules présentes dans ces fractions, nous avons optimisé les conditions de digestion et retenu un tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8,8.

Le transfert de la méthode vers la nouvelle chaîne HPLC U 3000 (Thermo Fischer Scientific) a nécessité des optimisations (mode d'injection, paramètres de collecte) et de nombreux tests afin de comprendre l'origine de la perte de signal par rapport à la chaîne Agilent Technologies.

Dans le cadre de notre étude des extraits de glandes salivaires de tiques, les deux systèmes ont été utilisés. La Figure 55 indique la répartition des analyses faites sur les deux chaînes chromatographiques.

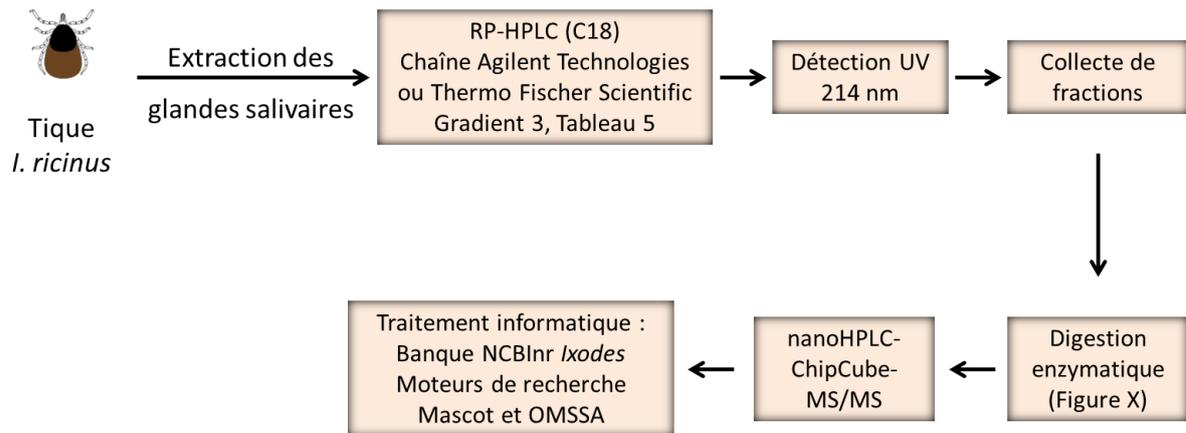


Figure 54 : Stratégie d'analyse des extraits de glandes salivaires et d'identification des protéines.

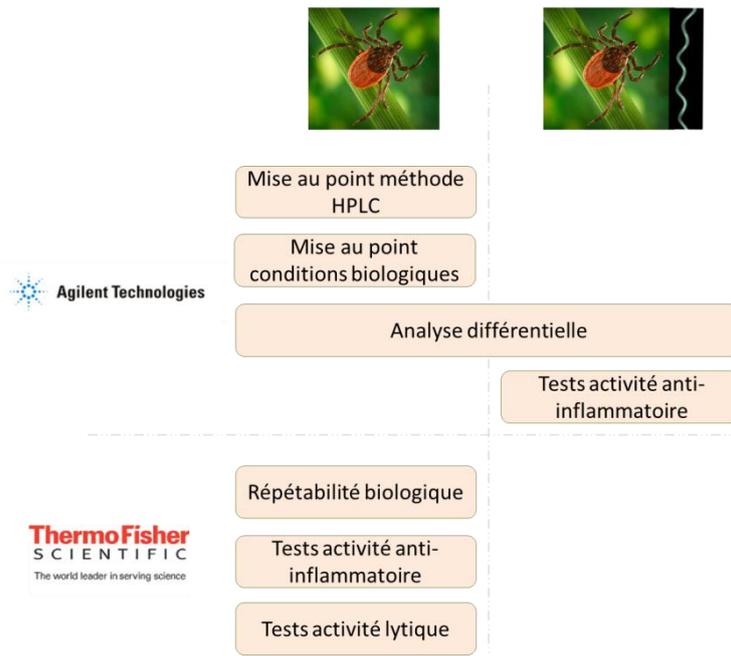


Figure 55 : Schéma des études menées sur les extraits de glandes salivaires.

Les systèmes Thermo Fischer Scientific et Agilent Technologies ont été employés pour l'analyse des extraits de glandes salivaires non infectées (gauche) et infectées par la bactérie *Borrelia* (droite).

III- Tests de l'immunité innée cutanée

Dans le cadre de l'étude des interactions entre la peau, les bactéries *Borrelia* et la tique, nos collaborateurs à l'Institut de bactériologie ont développé des modèles *in vitro* de culture cellulaire de kératinocytes (KCs), cellules majoritaires de l'épiderme, et de fibroblastes (FBs), cellules majoritaires du derme (Marchal, 2010). Des tests de l'activité anti-inflammatoire ont ensuite été développés sur les KCs (Marchal, 2010 ; Kern, 2011) et sur les FBs (Marchal, 2010 ; Schramm, 2012) afin d'étudier le rôle de ces cellules lors de la réponse inflammatoire à *Borrelia* et l'effet potentiel de la salive de tique.

Les KCs sont la première barrière physique rencontrée par les pathogènes et jouent un rôle important dans le mécanisme de l'immunité innée. En effet, ces cellules possèdent des récepteurs TLR (*Toll Like Receptors*) qui reconnaissent des motifs microbiens caractéristiques, les PAMP (*Pathogens Associated Molecular Patterns*) et initient la réponse immunitaire par l'activation de la voie de signalisation NF- κ B pathway (Ebnet *et al.*, 1997). Ainsi des molécules inflammatoires telles que les peptides anti-microbiens (AMP), les cytokines et les chimiokines sont produites (Pivarcsi *et al.*, 2004 ; Miller, 2008). L'induction de ces molécules témoigne de l'inflammation. Au contraire, l'observation de la diminution de leur production dans un contexte d'inflammation atteste de l'activité anti-inflammatoire.

Les tests développés consistent à suivre par test ELISA l'induction par des KCs humains de molécules pro-inflammatoires, comme les AMPs β -défensine 2 (hBD2, *Human Beta Defensin*) et cathélicidine LL-37, ou la chimiokine InterLeukine-8 (IL-8). Nos collaborateurs ont montré d'une part que la bactérie *Borrelia burgdorferi* induisait une forte réponse inflammatoire des KCs humains primaires issus de prépuce avec la production de hBD2 et de chimiokine IL-8, et d'autre part, que la présence d'extraits bruts de glandes salivaires de tiques inhibait cette réponse inflammatoire (Marchal *et al.*, 2009b).

Bien que les KCs soient la première ligne de défense de la peau, la tique ancre ses pièces piqueuses jusqu'au derme. Par ailleurs, au cours de l'infection, la bactérie est injectée au niveau du derme. Il est donc naturel d'étudier l'impact de l'infection sur les fibroblastes (FBs). Plusieurs études ont montré le rôle des FBs dans la régulation de l'hémostase, de l'inflammation (Sorrell *et al.*, 2009) et de la réponse immunitaire au niveau cutané (Saalbach *et al.*, 2010), notamment lors de l'inflammation par *Borrelia* (Zhao *et al.*, 2007). Contrairement aux KCs, très peu d'études portent sur le rôle des FBs dans la transmission de *B. burgdorferi*. Les tests effectués par nos collaborateurs consistent à suivre par ELISA l'induction de molécules pro-inflammatoire par des FBs humains primaires. En 2009, ils ont montré que l'incubation de la bactérie *B. burgdorferi* avec des FBs induisait la production de IL-8 et des deux AMPs hBD2 et LL-37 (Marchal *et al.*, 2009b). En 2012, ils ont complété cette étude en montrant, non seulement que la présence d'extraits bruts de glandes salivaires de tiques avec différentes souches de *Borrelia* inhibait la production d'IL-8, mais également qu'un effet cytotoxique était induit sur les FBs (Figure 56)(Schramm *et al.*, 2012).

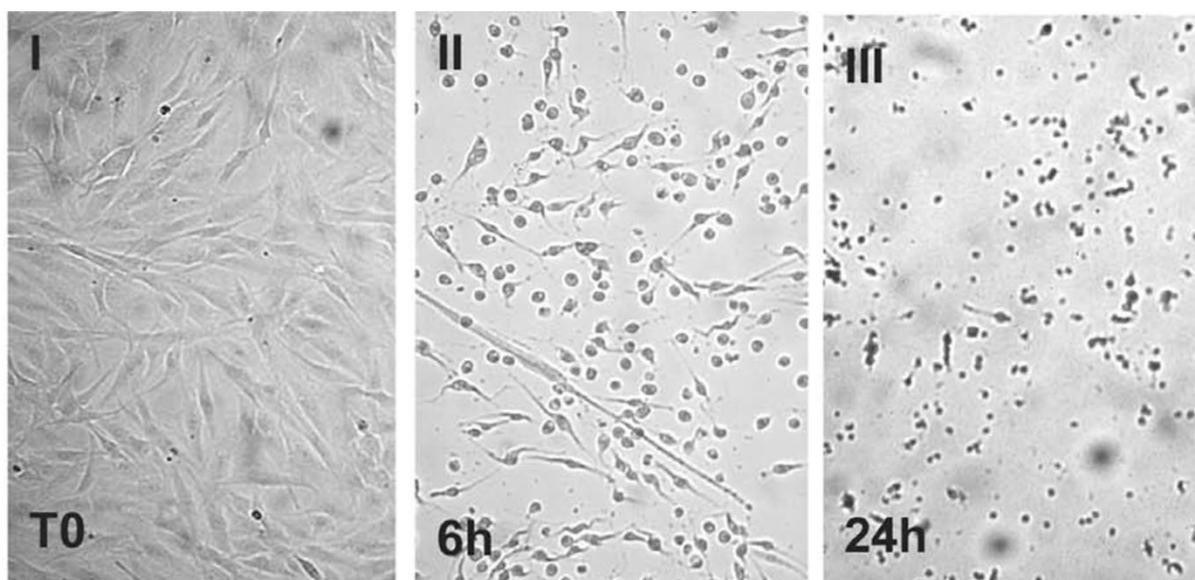


Figure 56 : Effet cytotoxique des extraits de glandes salivaires d'*I. ricinus*.

D'après (Schramm *et al.*, 2012). La culture cellulaire de FB (I) a été stimulée par un extrait de glandes salivaires d'*I. ricinus*. Un effet cytotoxique est induit, visible après 6h d'incubation (II) et complet après 24h d'incubation (III). Les images ont été grossies 100 fois.

IV- Choix du statut des tiques

Ayant été réalisée avant l'acquisition de la chaîne chromatographique U 3000 (Thermo Fischer Scientific), l'étude présentée dans ce paragraphe a été menée sur la chaîne Agilent Technologies.

Dans notre appellation, le statut des tiques se rapporte à leur stase de développement et à leur régime alimentaire.

A/ Influence de la stase de développement de la tique

Les stases de développement de la tique les plus étudiées, sont les stases nymphale et adulte. En effet, étant donné la faible probabilité d'infection trans-ovarienne de la tique *I. ricinus* (Richter *et al.*, 2012), les larves ne sont que très peu vectrices de *Borrelia* pour les mammifères, notamment pour l'homme, qui n'est pas l'hôte préférentiel de cette stase. La stase nymphale présente donc l'intérêt d'être le premier stade du cycle de développement de la tique, pour lequel elle devient vectrice de *Borrelia*, pathogène pour l'homme, et elle est de ce fait particulièrement étudiée (Peterková *et al.*, 2008 ; Schuijt *et al.*, 2011). De plus, les nymphes sont, dans la nature, plus prépondérantes que les adultes.

La tique adulte est aussi étudiée. En effet, elle est également vectrice de *Borrelia* chez l'homme et quelques études ont montré que l'évolution de la tique au cours de son cycle de développement pouvait montrer des mécanismes d'interactions et un profil protéique différent de ceux observés à la stase nymphale (Pedra *et al.*, 2006 ; Vančová *et al.*, 2010b).

Afin de comparer ces deux stases de développement chez *I. ricinus*, des tiques nymphes (GSnymph) et adultes (GSadulte) ont été nourries pendant 5 jours sur leur hôte préférentiel, souris pour les nymphes et lapin pour les adultes. Puis, les extraits de glandes salivaires de l'équivalent de 2,5 tiques ont été analysés par microHPLC-UV dans les conditions optimisées (Figure 57).

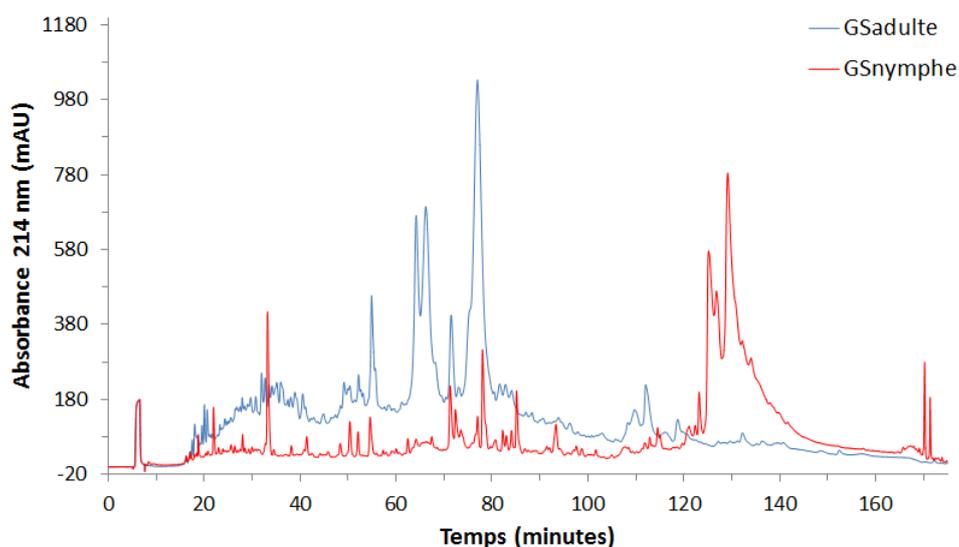


Figure 57 : Influence de la stase de développement sur les chromatogrammes d'extraits de glandes salivaires.

Injections : Equivalents de 2,5 tiques non infectées nymphes (rouge, GSnymphes) et adultes (bleu, GSadulte). Pré-colonne : Agilent Zorbax 300SB-C18, 1 mm x 17 mm, 5 μ m. Colonne : Agilent Zorbax SB-C18, 500 μ m x 15 cm, 5 μ m. Solvant A : H₂O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 11 μ L/min. Gradient : gradient 3 du Tableau 6. Détection : 214 nm.

Le signal obtenu pour les extraits de glandes salivaires de tiques adultes est plus intense sur toute la première partie du chromatogramme, de 0 à 120 min. En fin de gradient, c'est le signal correspondant aux nymphes qui est plus intense. Nous observons un profil UV très différent entre ces deux stases, avec de nombreux pics induits chez la tique adulte. De plus, l'intensité globalement plus importante pour les tiques adultes, traduit une quantité de peptides/protéines plus importante. Il faut également noter que la dissection des tiques adultes est plus aisée, en raison de leur taille plus importante. Ceci est un aspect non négligeable, car la difficulté de prélèvement des glandes salivaires peut provoquer la perte de matériel biologique si nous n'arrivons pas à les récupérer en totalité, ou alors la contamination de l'échantillon si nous n'arrivons pas à séparer les glandes salivaires de l'intestin de la tique par exemple.

Compte tenu de ces observations, nous avons décidé de poursuivre nos recherches sur des tiques *Ixode ricinus* adultes plutôt que sur des nymphes.

B/ Influence du repas sanguin

Plusieurs études ont montré que l'expression protéique et antigénique au niveau de la salive de tique, dépendait de différents paramètres, notamment la condition de repas sanguin et la durée de ce repas (Lawrie *et al.*, 2001 ; Narasimhan *et al.*, 2007 ; Vančová *et al.*, 2010b). Nous avons donc évalué l'influence d'un repas sanguin de trois jours (GSJ+3) sur le chromatogramme d'extraits de glandes salivaires par rapport à l'absence de repas sanguin (GSng) (Figure 58).

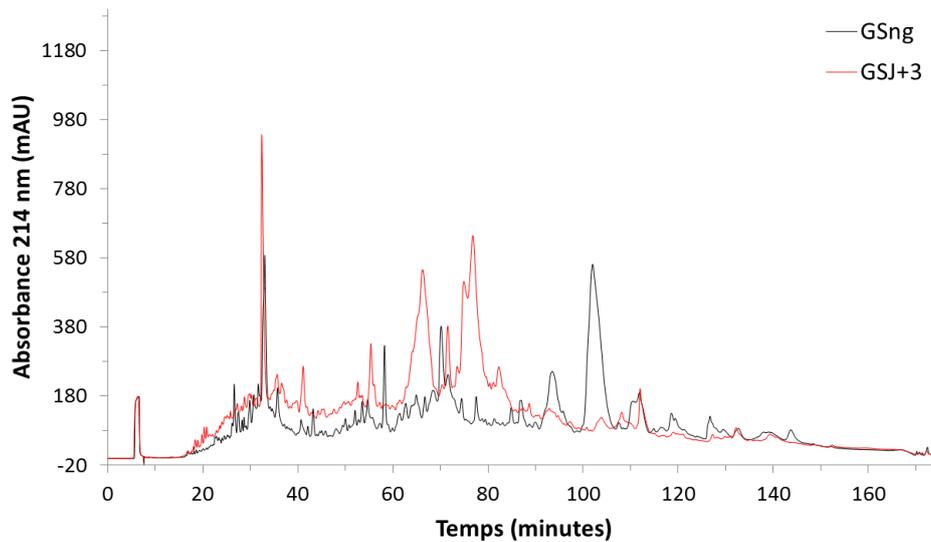


Figure 58 : Influence du repas sanguin sur les chromatogrammes d'extraits de glandes salivaires.

Injections : Equivalents de 2,5 tiques non infectées ayant réalisé un repas sanguin de trois jours (rouge, GSJ+3) et n'ayant pas eu de repas sanguin (noir, GSng). Pré-colonne : Agilent Zorbax 300SB-C18, 1 mm x 17 mm, 5 μ m. Colonne : Agilent Zorbax SB-C18, 500 μ m x 15 cm, 5 μ m. Solvant A : H₂O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 11 μ L/min. Gradient : gradient 3 du Tableau 6. Détection : 214 nm.

Nous observons un effet de la condition de repas sanguin de la tique sur le signal UV. En effet, certains pics sont induits après le repas sanguin, par exemple vers 65 min et 75 min, alors que d'autres sont réprimés, par exemple vers 95 min et 105 min. Ceci nous confirme donc que le repas sanguin modifie la composition des extraits de glandes salivaires, dû à une différence de protéines sécrétées ou à la présence de protéines de l'hôte, et qu'il faudra en tenir compte lors de notre analyse différentielle. Comme la tique infectée va transmettre la bactérie au cours d'un repas sanguin, il est important de travailler dans des conditions modélisant cette infection lors de notre étude. De plus, la réalisation par la tique d'un repas sanguin apporte l'avantage d'une sécrétion plus abondante de salive par la tique, ce qui augmente le volume d'échantillon disponible pour nos analyses et le confort de la dissection des glandes salivaires de tiques par nos collaborateurs. Toutes les analyses d'extraits de glandes salivaires qui seront menées dans la suite de ce manuscrit, seront donc réalisées sous la condition d'un repas sanguin.

C/ Influence de la durée du repas sanguin

Le repas sanguin de la tique adulte sur un hôte dure en moyenne 8 à 10 jours. De la même façon qu'entre les différentes stases de la tique, ou qu'entre les tiques nourries ou non, l'expression protéique évolue au cours du repas sanguin (Lawrie *et al.*, 2001 ; Vančová *et al.*, 2010b).

Afin d'évaluer l'influence de la durée du repas sanguin de la tique, nous avons effectué, comme précédemment, une étude comparative entre différentes durées de repas sanguin (Figure 59) : 3 jours (GSJ+3), 5 jours (GSJ+5) et 7 jours (GSJ+7). Nous avons envisagé d'étudier une durée de repas sanguin plus longue, mais l'obtention de l'échantillon biologique s'est avérée complexe. En effet, étant très proche de la durée maximale, les tiques se décrochent naturellement de l'hôte avant d'atteindre le dernier point désiré.

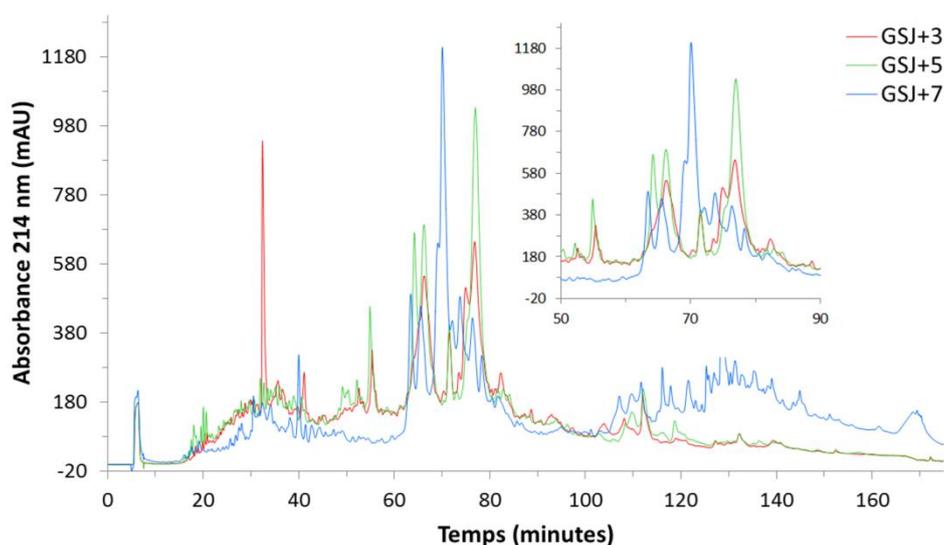


Figure 59 : Influence de la durée repas sanguin sur les chromatogrammes d'extraits de glandes salivaires.

Injection : Equivalents de 2,5 tiques non infectées ayant eu un repas sanguin de trois jours (rouge, GSJ+3), de cinq jours (vert, GSJ+5) et de sept jours (bleu, GSJ+7). Pré-colonne : Agilent Zorbax 300SB-C18, 1 mm x 17 mm, 5 μ m. Colonne : Agilent Zorbax SB-C18, 500 μ m x 15 cm, 5 μ m. Solvant A : H₂O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 11 μ L/min. Gradient : gradient 3 du Tableau 6. Détection : 214 nm. Le chromatogramme inséré correspond à un agrandissement entre 50 et 90 min.

Comme attendu, nous observons sur la Figure 59 une influence de la durée du repas sur les chromatogrammes. La zone la plus affectée par ces variations se situe entre 50 et 90 min (en insert dans la figure), où le profil UV montre, par exemple, un fort pic induit à J+7 vers 70 min. De manière générale, nous observons un profil très similaire entre les tiques à J+3 et J+5 sur l'ensemble du chromatogramme. Le profil à J+7 montre davantage de différences, notamment dans la zone indiquée précédemment et à partir de 115 min où le signal est plus intense.

Il est intéressant de noter que le repas sanguin de la tique *Ixodes* se déroule en deux temps. Au début du repas sanguin, le prélèvement du sang de l'hôte est lent et la tique se prépare en vue de l'ingestion d'une quantité importante de sang (expansion de l'idiosome). Puis, au cours des derniers jours du repas, où la majeure partie du sang est ingérée, le prélèvement est plus rapide (Nuttall *et al.*, 2000). La transition entre ces deux phases se déroule généralement entre 5 et 6 jours. Ceci pourrait donc expliquer la différence de profil observée après un repas sanguin de sept jours. Cette hypothèse a déjà été proposée par Lawrie et Nuttall, après avoir observé que des tiques *I. ricinus* adultes

nourries pendant 5 jours présentaient un nombre élevé d'antigènes par rapport à des tiques *I. ricinus* adultes nourries moins longtemps (Lawrie *et al.*, 2001).

Pour la suite de notre étude, nous avons décidé de travailler sur des extraits de glandes salivaires de tiques nourries pendant 3 ou 5 jours, qui sont des durées suffisantes pour modéliser l'infection d'un hôte par la bactérie et sont classiquement utilisée dans la littérature (De Silva *et al.*, 1995 ; Crippa *et al.*, 2002). Une durée plus longue, 7 jours dans notre cas, augmente la probabilité de perte de l'échantillon, causée par un rejet de la tique par l'animal hôte ou un dessèchement de celle-ci sur l'animal.

D/ Conclusion

Dans cette partie nous avons mis en place notre modèle biologique. Après avoir étudié l'influence de la stase de développement, du repas sanguin et de sa durée, nous avons retenu les tiques adultes nourries sur lapin pendant 3 ou 5 jours, durées suffisantes pour la transmission de la bactérie.

Ce modèle biologique sera utilisé par la suite pour des analyses différentielles entre des tiques infectées ou non par la bactérie *Borrelia*, puis pour des études plus particulières sur des extraits de glandes salivaires de tiques non infectées.

V- Analyses différentielles d'extraits de glandes salivaires de tiques infectées ou non par la bactérie *Borrelia*

Le but de cette étude était d'identifier dans la salive de tique des molécules induites ou surexprimées par l'infection. L'hypothèse était que ces molécules pouvaient être impliquées dans la transmission de la bactérie à l'organisme hôte et la faciliter. Pour ce faire, nous avons réalisé une analyse chromatographique différentielle d'extraits de glandes salivaires de tiques infectées ou non par la bactérie *Borrelia* (GS pos vs GS neg).

Quelques analyses différentielles sur des vecteurs infectés ou non par des pathogènes ont été décrits dans la littérature et ont permis d'identifier des molécules régulées par l'infection (Choumet *et al.*, 2007 ; Lefevre *et al.*, 2007 ; Rachinsky *et al.*, 2008 ; Patramool *et al.*, 2012).

Ayant été réalisée avant l'acquisition de la chaîne chromatographique U 3000 (Thermo Fischer Scientific), l'étude présentée dans ce paragraphe a été menée sur la chaîne Agilent Technologies.

A/ Analyses différentielles

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, la durée du repas sanguin de la tique influence l'expression protéique et peptidique. Nous avons décidé de mener nos analyses différentielles dans différentes conditions de durée de repas, 3 jours (J+3) et 5 jours (J+5). Les résultats obtenus pour les tiques nourries pendant 5 jours sont présentés en Figure 60.

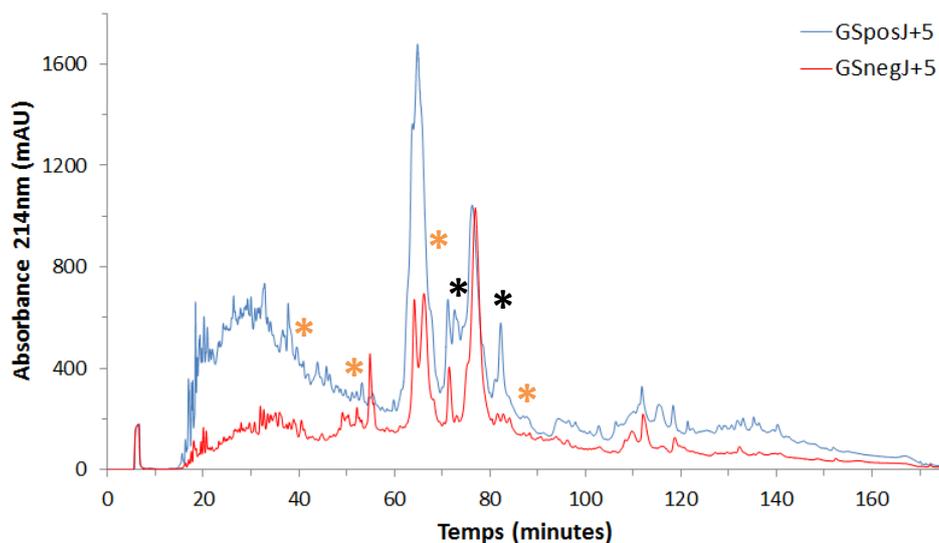


Figure 60 : Analyse différentielle d'extraits de glandes salivaires de tiques infectées ou non par *Borrelia*.

Injections : Equivalents de 2,5 tiques non infectées (rouge, GSnegJ+5), et infectées (bleu, GSposJ+5) après un repas de cinq jours. Pré-colonne : Agilent Zorbax 300SB-C18, 1 mm x 17 mm, 5 μ m. Colonne : Agilent Zorbax SB-C18, 500 μ m x 15 cm, 5 μ m. Solvant A : H₂O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 11 μ L/min. Gradient : gradient 3 du Tableau 6. Détection : 214 nm. Les astérisques noirs désignent les pics induits par l'infection. Les astérisques orange désignent les fractions ayant une activité anti-inflammatoire.

Les chromatogrammes de la Figure 60 montrent l'induction de plusieurs pics, indiqués par *, lorsque les tiques sont infectées. De même pour les tiques nourries pendant trois jours, plusieurs pics induits ont été observés (non montré). Seul le pic à 73-74 min a été observé à J+3 et J+5. Il a donc montré un intérêt particulier, et l'identification des protéines contenues dans cette fraction (tiques infectées à J+3 et J+5) a révélé la présence de deux protéines de tique : une protéine de 10 kDa (91 acides aminés), **putative anticoagulant Salp9-like, gi|67083696** et une protéine de 6,7 kDa (59 acides aminés), **conserved hypothetical protein, gi|241848133** (Tableau 10). Cependant, ces deux protéines ont été identifiées à l'aide des mêmes peptides : FFFNGER et EGCDYYCWNAETK. Si l'on compare les séquences de ces deux protéines à l'aide du programme BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool for Protein), on constate que ces protéines ne sont pas totalement identiques mais présentent une forte homologie de séquence. Seuls les acides aminés 3 et 38 de la protéine de 6,7 kDa sont différents par rapport à la séquence C-terminale (entre les acides aminés 33 et 91) de la protéine de 10 kDa (Figure 61), ce qui donne un pourcentage de similitude de 97 %. Au vu de cette homologie, nous ne pouvons pas savoir si ces deux protéines sont présentes dans la fraction, ou seulement l'une d'entre elles.

Ces deux protéines présentent une homologie de séquence avec la protéine Salp9Pac et avec une protéine de 9,8 kDa mise en évidence par le groupe de E. Fikrig (Narasimhan *et al.*, 2002). Dans cette étude, une approche similaire à la nôtre a été réalisée. La salive de tique adulte *I. scapularis* a été séparée par chromatographie sur phase inverse, puis les pics détectés en UV ont été collectés et l'activité anticoagulante des fractions a été testée. Une molécule de 9,8 kDa a été identifiée et les 15 premiers acides aminés ont été séquencés par dégradation d'Edman. Cette séquence a montré une forte homologie avec la protéine Salp14 (81% d'identité), de masse moléculaire 13,9 kDa et possédant une activité anticoagulante, et avec la protéine Salp9Pac (93% d'identité), de masse moléculaire 9,3 kDa ne possédant pas d'activité anticoagulante confirmée. Les auteurs ont alors proposé l'existence dans la salive de tique d'une famille de protéines anticoagulantes paralogues, inhibitrices de la protéase à sérine. Ceci a été confirmé par Valenzuela *et al.* (Valenzuela *et al.*, 2002). Les deux protéines que nous avons identifiées appartiennent à cette famille de protéines.

Chez les tiques infectées à J+5, deux autres protéines avec une extrémité poly-lysine ont été identifiées dans les fractions induites chez les tiques infectées : une protéine de 14,4 kDa (127 acides aminés), **putative salivary protein with polylysine tail**, et une protéine sécrétée de 16,9 kDa (153 acides aminés), **secreted salivary gland peptide, putative**. De la même façon, nous ne pouvons pas conclure quant à l'identification d'une de ces protéines par rapport à l'autre étant donné qu'elles ont été identifiées à partir des mêmes peptides et que ces protéines présentent une forte homologie entre leur premier et leur centième acide aminé (89% similitude) (Figure 61). Chez les tiques infectées à J+3, trois autres protéines ont été identifiées : une protéine de 16,8 kDa, **ribosomal protein L27A, putative**, une protéine sécrétée de 59,8 kDa, **FOF1-type ATP synthase, alpha subunit, putative**, et une protéine sécrétée de 18 kDa (153 acides aminés), **40S ribosomal protein S10, putative**. Pour ces cinq protéines supplémentaires, aucune activité anti-inflammatoire n'a été décrite dans la littérature.

Les protéines contenues dans les fractions éluées au même temps de rétention (73-74 min) chez les tiques non infectées, après un repas de 3 ou 5 jours, ont également été caractérisées (Tableau 10). De manière intéressante, les protéines *putative anticoagulant Salp9-like* et *conserved hypothetical protein* ont également été identifiées chez les tiques non infectées après les deux durées de repas. Les autres protéines identifiées chez les tiques non infectées (protéines ribosomales) n'ont pas été retrouvées dans la littérature comme ayant une activité sur la réponse inflammatoire.

	Protéines identifiées	Numéro d'accension	Masse (Da)	Peptides	% rec	Identification
GSposJ+5	<i>putative anticoagulant Salp9-like</i>	gi 67083696	10 020	FFFGNGER-EGCDYYCWNAETK	23,10	O/M
	<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241848133	6 755	FFFGNGER-EGCDYYCWNAETK	35,59	M
	<i>secreted salivary gland peptide, putative</i>	gi 242000128	16 964	RRPQDTNCNYCR-RPQDTNCNYCR	7,80	O
	<i>putative salivary protein with polylysine tail</i>	gi 67083481	14 254	RRPQDTNCNYCR-RPQDTNCNYCR	9,45	O
GSposJ+3	<i>putative anticoagulant Salp9-like</i>	gi 67083696	10 020	FFFGNGER-EGCDYYCWNAETK	23,10	O/M
	<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241848133	6 755	FFFGNGER-EGCDYYCWNAETK	35,59	M
	<i>ribosomal protein L27A, putative</i>	gi 241681373	16 785	APVIDIVK	5,41	O
	<i>FOF1-type ATP synthase, alpha subunit, putative</i>	gi 241705635	59 828	VVDALGNPIDGK-APGIIPR	3,42	O/M
	<i>40S ribosomal protein S10, putative</i>	gi 241813650	18 067	KGDVGP GTDTNFDFR	9,62	O
GSnegJ+5	<i>putative anticoagulant Salp9-like</i>	gi 67083696	10 020	FFFGNGER-EGCDYYCWNAETK-SWDKFFFGNGER	27,50	O/M*
	<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241848133	6 755	FFFGNGER-EGCDYYCWNAETK	35,59	M
	<i>ribosomal protein L27A, putative</i>	gi 241681373	16 785	LKDDTAGKAPVIDIVK-APVIDIVK	10,80	O/M

	Protéines identifiées	Numéro d'accension	MM (Da)	Peptides	% rec	Identification
GSnegJ+3	<i>putative anticoagulant Salp9-like</i>	gi 67083696	10 020	SWDKFFFGNGER-EGCDYYCWNAETK- FFFGNGER	27,50	O/M*
	<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241848133	6 755	SWDKFFFGNGER-EGCDYYCWNAETK	27,5	M
	<i>60S ribosomal protein L14, putative</i>	gi 240978971	17 324	AVVDGPSTGVPR	7,95	O
	<i>Full=40S ribosomal protein S21</i>	gi 75029844	9 228	LAKDDGYIPK	12,00	O
	<i>ribosomal protein L27A, putative</i>	gi 241681373	16 785	LKDDTAGKAPVIDIVK	10,80	O
	<i>protein kinase, putative</i>	gi 241741186	106 077	QLNIELK	0,74	M

Tableau 10 : Identification des protéines de la fraction éluée à 73-74 min dans les différentes conditions testées.

GSposJ+5 et GSposJ+3 : Extrait de glandes salivaires de tiques infectées après un repas de 5 ou 3 jours, respectivement. GSnegJ+5 et GSnegJ+3 : Extrait de glandes salivaires de tiques non infectées après un repas de 5 ou 3 jours, respectivement. Le nom et le numéro d'accension des protéines identifiées sont conformes aux notations NCBI. La masse moléculaire (MM) est exprimée en Dalton. Pour chaque protéine, les peptides ayant permis l'identification sont énumérés. Le pourcentage de recouvrement (% rec.) représente la couverture en acides aminés des peptides identifiés par rapport à la séquence totale de la protéine. Les moteurs de recherche Mascot (M) et OMSSA (O) ont été utilisés pour l'identification à partir de la banque NCBI *Ixodes*. M* : L'identification à l'aide du moteur de recherche Mascot a été obtenue à partir des deux premiers peptides présentés.



Figure 61 : Alignement de séquence des protéines identifiées dans la le pic induit à 73-74 min chez les tiques infectées après un repas sanguin de 5 jours.

L'alignement a été réalisé à l'aide du programme BLASTP. Les acides aminés en noir sont partagés par les deux séquences alignées. Les acides aminés en bleu ne sont pas partagés. Les acides aminés en rouge ne sont pas partagés mais sont définis comme « positifs ».

B/ Tests d'activité sur KCs

Parallèlement à la caractérisation des molécules présentes dans les pics induits par l'infection, nous avons testé l'activité anti-inflammatoire des fractions des chromatogrammes des tiques infectées. L'activité anti-inflammatoire de chaque fraction de l'extrait GSposJ+5 a été testée par nos collaborateurs (A. Kern, N. Boulanger) sur les KCs en suivant la production d'IL-8 par test ELISA suite à un stimulus inflammatoire par *Borrelia* (Marchal *et al.*, 2009b).

Ces tests ont mis en évidence le potentiel anti-inflammatoire de 8 fractions, réparties sur 4 zones du chromatogramme (Figure 60, fractions *), que nous dénommerons par la suite zones 1, 2, 3 et 4 par ordre chronologique d'élution (entre 14,25 % et 15,75 % d'ACN, 16,75 % et 17,25 % d'ACN, 23,75 % et 24,25 % d'ACN, 26,25 % et 26,75 % d'ACN, respectivement). Comme précédemment, les protéines contenues dans ces fractions ont été identifiées par digestion et nanoLC-MS/MS. Nous avons également identifié les molécules présentes dans les fractions correspondantes des extraits GSnegJ+5, GSposJ+3 et GSnegJ+3 mais l'activité des fractions issues de ces extraits n'a pas été testée. L'ensemble des protéines identifiées est rassemblé dans le Tableau 11.

Nous pouvons remarquer que nous retrouvons les deux protéines *putative anticoagulant Salp9-like* et *conserved hypothetical protein* dans la zone 3 de tous les extraits. Pour l'extrait GSposJ+5, ces protéines sont également identifiées dans la zone 4. Les autres protéines identifiées n'ont pas d'activité décrite dans la littérature.

Extrait GS	Zone	Protéines identifiées	Numéro d'accension	Masse (Da)	Peptides identifiés	% rec.	Identification
GSposJ+5	2	<i>40S ribosomal protein S14, putative</i>	gi 241836194	16 102	IEDVTPIPSDSTR	8,61	O
	3	<i>putative anticoagulant Salp9-like</i>	gi 67083696	10 020	EGCDYYCWNAETK- FFFGNGER	23,10	O/M
		<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241848133	6 755	EGCDYYCWNAETK- FFFGNGER	35,59	M
		<i>putative anticoagulant Salp9-like</i>	gi 67083696	10 020	FFFGNGER- EGCDYYCWNAETK	23,10	O/M
		<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241848133	6 755	FFFGNGER- EGCDYYCWNAETK	35,59	M
	1	<i>histone H1, putative</i>	gi 240952152	17 825	SEAEVSKPAATPK	7,56	O
GSnegJ+5	3	<i>putative anticoagulant Salp9-like</i>	gi 67083696	10 020	FFFGNGER- EGCDYYCWNAETK	23,10	O/M
		<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241848133	6 755	FFFGNGER- EGCDYYCWNAETK	35,59	M
		<i>translation elongation factor EF-1 alpha/Tu, putative</i>	gi 241647495	50 736	LPLQDVYK- QTVAVGVK	3,68	O
	4	<i>GTP-binding nuclear protein RAN1, putative</i>	gi 241833067	25 194	EAQNTSLPDEDDDDL	6,79	O/M
		<i>rho GDP dissociation inhibitor, putative</i>	gi 241626775	23 524	SLKDIVEADKEDTSLQK	8,25	O
		<i>actin</i>	gi 164472819	41 750	AVFPSIVGRPR- AGFAGDDAPR	5,59	O
	4	<i>ribosomal protein S19, putative</i>	gi 241618566	16 501	DVEQQAQFVR	6,00	M
		<i>beta tubulin</i>	gi 241151391	26 234	IMNTFSVVPSPK	5,02	M
GSposJ+3	1	<i>histone H1, putative</i>	gi 240952152	17 825	SEAEVSKPAATPK	7,56	O
	3	<i>putative anticoagulant Salp9-like</i>	gi 67083696	10 020	FFFGNGER- EGCDYYCWNAETK	23,10	O/M
		<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241848133	6 755	FFFGNGER- EGCDYYCWNAETK	35,59	M
		<i>40S ribosomal protein S27, putative</i>	gi 241714817	13 845	DLLNPSPEDER	8,94	O

Extrait GS	Zone	Protéines identifiées	Numéro d'accension	Masse (Da)	Peptides identifiés	% rec.	Identification
GSposJ+3	4	<i>heat shock protein, putative</i>	gi 241998026	72 577	TDVDEIVLVGGSTR- KTDVDEIVLVGGSTR	2,28	O/M
		<i>ribosomal protein S19, putative</i>	gi 241618566	16 501	DVEQQAFVR	6,00	O/M
		<i>FOF1-type ATP synthase, beta subunit, putative</i>	gi 241729762	60 717	IPSAVGYQPTLATDMGMTMQR	3,73	O
		<i>ribosomal protein L3, putative</i>	gi 241859209	44 614	LVVNNAATDYDTSNK	3,85	M
GSnegJ+3	1	<i>histone H1, putative</i>	gi 240952152	17 835	SEAEVSKPAATPK	7,56	O/M
	2	<i>40S ribosomal protein S14, putative</i>	gi 241836194	16 102	IEDVTPIPSDSTR- IEDVTPIPSDSTRR	9,27	O
		<i>putative anticoagulant Salp9-like</i>	gi 67083696	10 020	SWDKFFFGNGER- EGCDYYCWNAETK- FFFGNGER	27,50	O/M*
	3	<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241848133	6 755	SWDKFFFGNGER- EGCDYYCWNAETK	35,59	M
		<i>GTP-binding nuclear protein RAN1, putative</i>	gi 241833067	25 294	EAQNTSLPDEDDDDL	6,79	O/M
		<i>ribosomal protein L31, putative</i>	gi 241122570	17 008	STLNEVVTR	7,03	M
	4	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative</i>	gi 241999408	35 991	GAAQNIIPASTGAAKAVGK- GAAQNIIPASTGAAK- AVGKVIPELNGK	8,08	O
		<i>actin</i>	gi 164472819	41 750	AVFPSIVGRPR- AGFAGDDAPR	5,59	O/M
		<i>beta tubulin</i>	gi 241151391	26 234	IMNTFSVVPSPK	5,02	M

Tableau 11 : Identification des protéines dans les fractions montrant une activité anti-inflammatoire.

GSposJ+5 et GSposJ+3 : Extrait de glandes salivaires de tiques infectées après un repas de 5 ou 3 jours, respectivement. GSnegJ+5 et GSnegJ+3 : Extrait de glandes salivaires de tiques non infectées après un repas de 5 ou 3 jours, respectivement. Les zones 1, 2, 3, et 4 correspondent respectivement aux fractions éluées entre 14,25 % et 15,75 % d'ACN, 16,75 % et 17,25 % d'ACN, 23,75 % et 24,25 % d'ACN, 26,25 % et 26,75 % d'ACN. Le nom et le numéro d'accension des protéines identifiées sont conformes aux notations NCBI. La masse moléculaire (MM) est exprimée en Dalton. Pour chaque protéine, les peptides ayant permis l'identification sont énumérés. Le pourcentage de recouvrement (% rec.) représente la couverture en acides aminés des peptides identifiés par rapport à la séquence totale de la protéine. Les moteurs de recherche Mascot (M) et OMSSA (O) ont été utilisés pour l'identification. M* : L'identification à l'aide du moteur de recherche Mascot a été obtenue à partir des deux premiers peptides présentés.

C/ Conclusion

L'analyse différentielle et les tests d'activité biologique menés dans ce paragraphe nous ont permis de mettre en évidence, non seulement des pics induits lors de l'infection de la tique par la bactérie *Borrelia*, mais également des fractions actives dotées d'un pouvoir anti-inflammatoire au niveau des KCs.

Les tests d'activité anti-inflammatoire n'ont pu être réalisés qu'avec les extraits de glandes salivaires de tiques infectées à J+5. Afin de suivre l'évolution des molécules impliquées dans l'inflammation cutanée, il faudrait réaliser ces mêmes tests sur des fractions issues d'extraits de glandes salivaires de tiques nourries plus ou moins longtemps et d'extraits de glandes salivaires de tiques non infectées aux durées de repas sanguin correspondantes.

Nous avons identifié deux protéines homologues de type Salp9 à la fois dans un pic induit par l'infection et dans des fractions ayant une activité anti-inflammatoire. La protéine Salp9 appartient à une famille de protéines dont certaines possèdent une activité anticoagulante. Les deux protéines identifiées ont été retrouvées non seulement dans les extraits de glandes salivaires de tiques infectées, mais également dans les tiques non infectées. Ceci montre que la sécrétion de ces protéines est intrinsèque à la salive de tique et qu'elles sont potentiellement surexprimées lors de l'infection.

Ces résultats nous ont conduits à revoir notre stratégie initiale et à ne pas nous limiter à une analyse différentielle entre des tiques infectées ou non. Nous avons décidé d'explorer un peu plus les molécules contenues dans les extraits de glandes salivaires de tiques non infectées, avant d'étudier l'influence de l'infection sur ces molécules.

VI- Analyses d'extraits de glandes salivaires de tiques non infectées

Dans cette partie, nous nous intéresserons, dans un premier temps, à la reproductibilité biologique des échantillons d'extraits de glandes salivaires de tiques afin de déterminer la représentativité d'extraits issus d'un nombre très faible de tiques. Dans un second temps, nous mènerons des études biologiques sur des fractions d'extraits de glandes salivaires de tiques non infectées afin d'identifier les molécules de salives de tiques possédant une activité biologique.

La réalisation de ces analyses correspond à l'acquisition de notre nouveau système chromatographique. Les études menées ici ont donc été mises en œuvre sur le système Thermo Fischer Scientific.

A/ Etude de la reproductibilité biologique

Dans le paragraphe II de ce chapitre, nous avons mis au point une méthode d'analyse d'extraits de glandes salivaires de tiques permettant d'atteindre notre objectif qui était de travailler à partir de faibles quantités de matériel biologique. Cependant, à ce stade, il devenait indispensable d'étudier la reproductibilité biologique de notre modèle. Ceci n'avait pas pu être réalisé auparavant en raison de quantités de matériel insuffisantes. Afin d'évaluer les variations entre les individus, nous avons réalisé une étude de reproductibilité biologique entre différents extraits de glandes salivaires de tiques et à partir d'une quantité initiale de tiques faible.

Pour cette étude, nous disposons de trois échantillons, correspondant chacun à l'extrait de glandes salivaires de deux tiques. Ces échantillons ont été analysés dans les mêmes conditions chromatographiques (Figure 62).

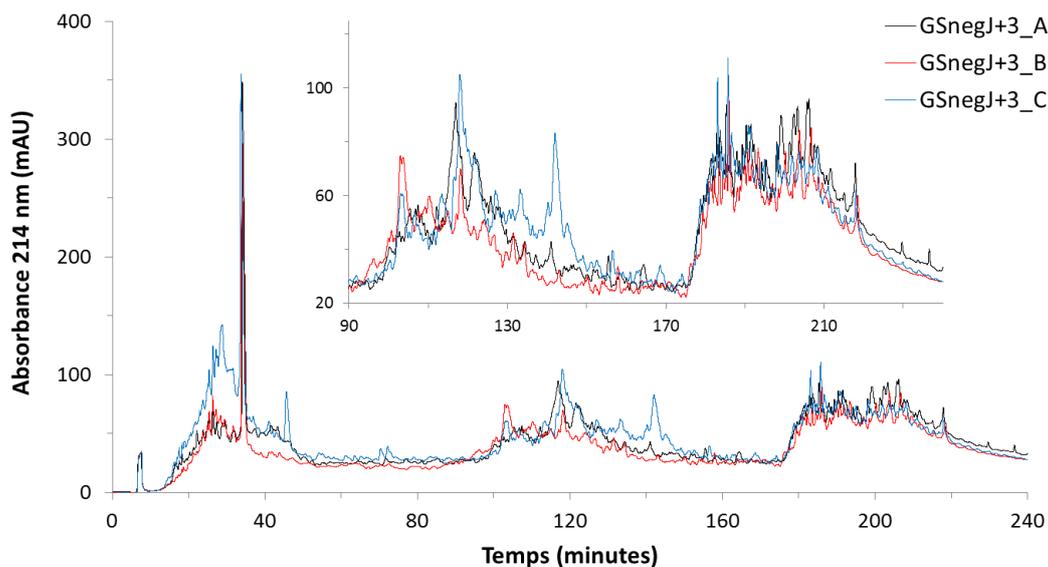


Figure 62 : Etude de la reproductibilité biologique sur des extraits de glandes salivaires de tiques.

Injections : Equivalents de 2 tiques non infectées après un repas de trois jours. Pré-colonne : Dionex Acclaim PepMap C18, 500 μm x 15 mm, 5 μm . Colonne : Dionex Acclaim PepMap C18, 300 μm x 15 cm, 3 μm . Solvant A : H_2O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. Gradient : isocratique à 2 % de B pendant 5 min. Gradient de 2 % à 9,5 % de B en 15 min. Gradient de 9,5 % à 24,5 % de B en 150 min. Gradient de 24,5 % à 59,5 % de B en 70 min. Détection : 214 nm. Le chromatogramme inséré correspond à un agrandissement entre 90 et 240 min.

Nous pouvons observer une variabilité entre les différents individus. Par exemple, l'échantillon C, présente de nombreux pics supplémentaires par rapport aux deux autres échantillons. Cette étude ayant été réalisée à partir de tiques collectées dans la nature par nos collaborateurs, nous l'avons reproduite sur des tiques « élevées » en laboratoire. Nous avons obtenu des résultats similaires, à savoir une variation significative entre les échantillons (non montré). Etant donné les résultats de bonne répétabilité technique décrits précédemment (injections successives du même échantillon), cette variabilité ne pouvait pas être attribuée à l'instrumentation mais uniquement à la faible reproductibilité biologique.

Ces études nous ont montré qu'il n'était pas pertinent de travailler sur des échantillons de deux individus. Pour la suite de nos travaux, nous avons donc décidé de réaliser des « pools » d'au moins 6 tiques afin de moyenniser cette variabilité inter-individus. Les profils obtenus lors de l'analyse différentielle entre des extraits de glandes salivaires de tiques infectées ou non par la bactérie ont alors été remis en cause. Néanmoins, en raison de la difficulté pour nos collaborateurs d'obtenir des tiques infectées, il n'a pas encore été possible de reproduire cette étude sur des « pool » de 6 tiques pour les extraits de tiques infectées.

B/ Tests sur kératinocytes et sur fibroblastes

Comme nous l'avons fait pour les extraits de glandes salivaires infectées, nous avons étudié l'activité, sur les kératinocytes, des fractions d'un extrait de glandes salivaires non infectées. De plus, nos collaborateurs ayant récemment mis en évidence une activité lytique d'un extrait de glandes salivaires sur les fibroblastes (Schramm *et al.*, 2012), nous avons également testé l'activité de ces fractions sur les fibroblastes. Suite à de nombreux problèmes de robustesse avec certaines colonnes Dionex nous avons décidé, dans cette partie, de ne plus utiliser les colonnes Dionex. Nous l'avons remplacée par une colonne Agilent Technologies (Agilent Zorbax 300SB-C18, 300 μm x 15 cm, 3,5 μm).

Tests in vitro sur les kératinocytes

Comme précédemment l'activité anti-inflammatoire de chaque fraction de l'extrait GSnegJ+5 a été testée sur les KCs. Ces tests ont révélé le potentiel inflammatoire de 5 fractions d'extraits de glandes salivaires de tiques non infectées (Figure 63). Ces fractions actives, sont éluées entre 65 et 83 min, soit à des pourcentages d'ACN de 20,75 % et 25,25 %. Les zones d'éluion des fractions mises en évidence dans le cas présent ne peuvent pas précisément être comparées à celles obtenues lors de l'analyse différentielle (Figure 63). En effet, les conditions de séparation ne sont pas les mêmes : phase stationnaire C18 différente, diamètre interne plus faible, granulométrie plus faible, débit plus faible. Cependant, il est intéressant d'observer que les fractions actives se situent dans la même zone d'éluion (19,5 % et 27 % d'ACN) que les zones 3 et 4 lors de l'analyse différentielle. Les protéines présentes dans ces fractions ont été identifiées, et les résultats sont consignés dans le Tableau 12.

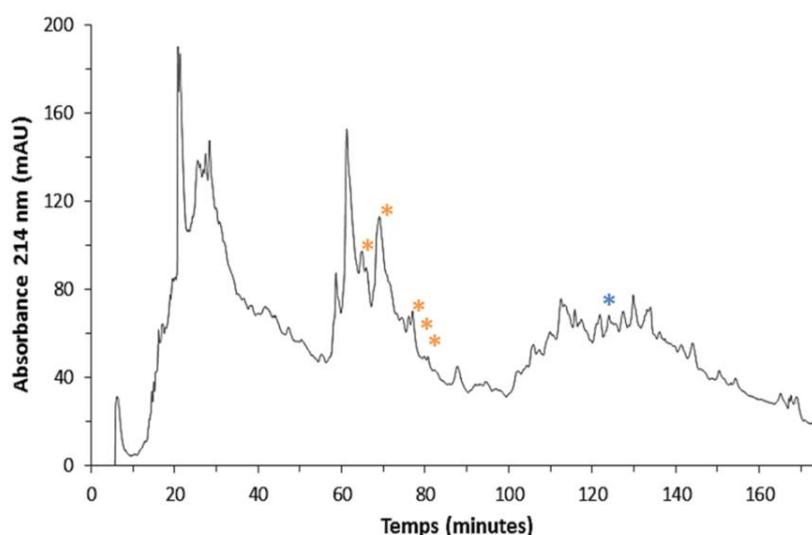


Figure 63 : Analyse d'extraits de glandes salivaires de tiques non infectées.

Injections : Equivalents de 3 tiques non infectées après un repas de trois jours, à partir d'un pool de 24 tiques. Pré-colonne : Dionex Acclaim 300 C18, 500 μm x 15 mm, 5 μm . Colonne : Agilent Zorbax 300SB-C18, 300 μm x 15 cm, 3,5 μm . Solvant A : H_2O + 0,05 % TFA. Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. Débit : 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. Gradient : gradient 3 du Tableau 6. Détection : 214 nm. Les astérisques orange désignent les fractions ayant une activité anti-inflammatoire sur KCs. Les astérisques bleus désignent la fraction ayant une activité lytique sur FBs.

Fractions	Protéines identifiées	Numéro d'accèsion	Masse (Da)	Peptides identifiés	% rec.	Identification
1	<i>putative salivary secreted protein with polyK tail</i>	gi 67083505	13 861	EGCDYYCWNAETK-SWDQFFFGNGER	20,00	M
	<i>salivary secreted protein</i>	gi 22164186	13 470	EGCDYYCWNAETK-SWDQFFFGDGER	20,70	O/M
	<i>putative anticoagulant Salp9-like</i>	gi 67083696	10 020	EGCDYYCWNAETK-SWDKFFFGNGER	27,50	M
2	<i>secreted salivary gland protein 2 precursor</i>	gi 45593710	13 388	DGETCFYNNNGDR-EGCDFYCWNSDTSR	21,70	M
	<i>putative salivary secreted protein with polyK tail</i>	gi 67083505	13 861	EGCDYYCWNAETK-SWDQFFFGNGER	20,00	O
3	<i>actin</i>	gi 164472819	16 020	AGFAGDDAPR	6,94	O/M
	<i>secreted salivary gland protein 2 precursor</i>	gi 45593710	13 388	DGETCFYNNNGDR	10,00	M
	<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241640416	37 734	RSQINLQEKPLLK	3,95	M
4	<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241177232	14 508	VEEAAKEAEAEATA	11,40	M
	<i>secreted salivary gland protein 2 precursor</i>	gi 45593710	13 388	DGETCFYNNNGDR-EGCDFYCWNSDTSR	21,70	O/M
5	<i>actin</i>	gi 164472819	41 807	AGFAGDDAPR	2,66	O/M
	<i>elongation factor, putative</i>	gi 241781537	79 093	DSLPLDLQYFDK	1,69	M
	<i>secreted salivary gland protein 2 precursor</i>	gi 45593710	13 388	DGETCFYNNNGDR	10,00	M

Tableau 12 : Identification des protéines dans les fractions montrant une activité anti-inflammatoire.

Les fractions 1, 2, 3, 4, 5 correspondent aux fractions actives éluées entre 20,75 et 25,25 % d'ACN. Le nom et le numéro d'accèsion des protéines identifiées sont conformes aux notations NCBI. La masse moléculaire (MM) est exprimée en Dalton. Pour chaque protéine, les peptides ayant permis l'identification sont énumérés. Le pourcentage de recouvrement (% rec.) représente la couverture en acides aminés des peptides identifiés par rapport à la séquence totale de la protéine. Les moteurs de recherche Mascot (M) et OMSSA (O) ont été utilisés pour l'identification à partir de la banque NCBI de *Ixodes*.

Parmi les protéines identifiées dans les fractions actives, nous pouvons noter la présence, de manière récurrente, des protéines *secreted salivary gland protein 2 precursor*, *putative anticoagulant Salp9-like*, *salivary secreted protein*, *putative salivary secreted protein with polyK tail*, identifiées à partir d'un set de peptides similaires. Nous pouvons noter une forte homologie de séquence du côté N-terminal entre ces différentes protéines (Tableau 13). Un minimum de 70 % d'identité, et 80% de similitude, est obtenu entre les protéines *secreted salivary gland protein 2 precursor* et *putative anticoagulant Salp9-like*. Cette homologie peut s'étendre à la protéine de 9,8 kDa mise en évidence par Narasimhan *et al.* dans la salive de tique adulte *I. scapularis* (Narasimhan *et al.*, 2002).

	A	B	C	D
A : secreted salivary gland protein 2 precursor, gi 45593710, 120 aa	-			
B : putative anticoagulant Salp9-like, gi 67083696, 91 aa	70% identité 80% positif (1-90)	-		
C : salivary secreted protein, gi 22164186 121 aa	72% identité 83% positif (1-93)	78% identité 86% positif (1-90)	-	
D : putative salivary secreted protein with polyK tail, gi 67083505, 125 aa	71% identité 82% positif (1-93)	80% identité 85% positif (1-89)	92% identité 97% positif (1-93)	-
E : Salp9Pac, gi 22652868, 102 aa	71% identité 81% positif (1-90)	90% identité 93% positif (1-91)	76% identité 86% positif (1-90)	78% identité 85% positif (1-89)

Tableau 13 : Alignement de séquence de protéines identifiées dans les fractions montrant une activité anti-inflammatoire.

L'alignement des protéines a été réalisé avec le programme BLASTP. Les protéines identifiées à partir d'un set de peptides similaires ont été comparées entre elles et à la protéine Salp9Pac.

Tests in vitro sur les fibroblastes

Nous avons testé l'activité lytique des fractions d'extraits de glandes salivaires de tiques non infectées en observant le changement morphologique des FBs au cours du temps (tests réalisés par F. Schramm). Ces tests ont révélé l'activité lytique d'une seule fraction (éluée à 125-127 min, soit entre 42 % et 43 % d'ACN) (Figure 63). Nous avons reproduit cette expérience sur des fractions d'un extrait indépendant de glandes salivaires de tique non infectées et avons confirmé l'activité lytique de cette fraction.

Les protéines identifiées dans cette fraction sont présentées dans le Tableau 14. Parmi ces protéines, nous pouvons noter la présence de deux protéines intéressantes impliquées dans l'apoptose cellulaire : la **protéine ribosomale S27a** et le **cytochrome C**.

Il a été montré que la protéine ribosomale S27a se liait à la protéine MDM2 (*murine double minute 2* homologue) au niveau de son domaine centra acide (Sun *et al.*, 2011). Cette interaction induit une inhibition de l'ubiquitination et de la dégradation de p53 par MDM2. Cette protéine alors activée est impliquée dans l'apoptose cellulaire (Sheikh *et al.*, 2000).

Le cytochrome C est un facteur pro-apoptotique présent dans la membrane interne de la mitochondrie (Garrido *et al.*, 2006). Lorsque cette protéine est libérée dans le cytosol par la mitochondrie, elle forme le complexe apoptosome avec la protéine Apaf-1 (*apoptosis-protease activating factor 1*) qui sera à l'origine de l'activation de caspases (caspase-9 ou caspase-3 entre autres), donc de l'apoptose. Il a été montré, sur une sous population de FBs, qu'un stimulus apoptotique induisait la libération de cytochrome C dans le cytosol et que l'activation de la caspase-9 était nécessaire dans le processus de l'apoptose (Akasaka *et al.*, 2005).

Les autres protéines identifiées dans la fraction active n'ont pas d'activité décrite dans la littérature qui pourrait être reliée à la lyse des FBs.

Protéines identifiées	Numéro d'accension	Masse (Da)	Peptides identifiés	% rec.	Identification
<i>heat shock protein, putative</i>	gi 240972667	88 644	APQHVDPPVLASR	1,63	O/M
<i>cuticular protein, putative</i>	gi 240980298	17 239	AAYELPDGAELLVGSVK	10,40	O/M
<i>heat shock protein, putative</i>	gi 241153675	71 148	NALESYSFNIK	1,70	O/M
<i>small heat shock protein, putative</i>	gi 241860225	17 405	ALFPLLNR	5,19	O/M
<i>40S ribosomal protein S27A, putative</i>	gi 240952274	68 506	TITLEVEPSDTIENVK	2,63	M
<i>carbonic anhydrase, putative</i>	gi 241736959	30 853	YTDYDGNMGPLR	4,33	M
<i>putative secreted salivary peptide of 9.41 kDa</i>	gi 51011396	11 576	TLTVEGCNVR	9,90	M
<i>protein disulfide isomerase, putative</i>	gi 241749561	56 894	FIDTDGEYGK KGTNEAVEYNGER	4,60	O/M
<i>cytochrome c</i>	gi 51011608	12 079	TGQAAGFSYTDANR TQDRGDLIAYLEQSTK	27,50	O/M

Tableau 14 : Identification des protéines dans la fraction dotées d'une activité lytique

Cette fraction a été éluée entre 125 et 127 minutes soit entre 42 % et 43 % d'ACN sur le chromatogramme présenté en (Figure 63).

Le nom et le numéro d'accension des protéines identifiées sont conformes aux notations NCBI. La masse moléculaire (MM) est exprimée en Dalton. Pour chaque protéine, les peptides ayant permis l'identification sont énumérés. Le pourcentage de recouvrement (% rec.) représente la couverture en acides aminés des peptides identifiés par rapport à la séquence totale de la protéine. Les moteurs de recherche Mascot (M) et OMSSA (O) ont été utilisés pour l'identification à partir de la banque NCBI *lxodes*.

Suite à ces résultats très intéressants, nous nous sommes concentrés sur la fraction à effet lytique et sur l'isolement de la protéine responsable de cette activité. Une stratégie d'isolement par des chromatographies successives aurait nécessité des tests d'activité après chaque cycle de chromatographie et une consommation importante de matériel biologique. Au vu de la faible quantité de matériel dont nous disposons, nous avons préféré réaliser une séparation unique avec un gradient d'ACN plus lent dans la zone d'intérêt et démarrant à un pourcentage d'ACN plus élevé (gradient 4, Tableau 15).

Lors de ces analyses, nous nous sommes heurtés à un problème de précipitation des protéines lors de la préparation d'échantillon, particulièrement au moment de la concentration des extraits de glandes salivaires de tiques et lors de leur reprise dans l'eau acidifiée. Cette précipitation a engendré à la fois la perte de protéines, notamment les protéines hydrophobes (perte du signal en UV à partir d'un pourcentage d'ACN de 30 %) et la perte de l'activité lytique des extraits de glandes salivaires car

la fraction active est éluée à 42-43 % d'ACN. Une tentative de reprise du précipité dans une solution d'ACN 50 % et TFA 0,1 % a permis de resolubiliser une partie du précipité (récupération du signal pour les hauts pourcentages d'ACN sur le chromatogramme) et n'a permis de retrouver qu'une activité partielle (lyse des cellules moins nette). Ceci nous a conduits à revoir notre protocole de préparation d'échantillon et à éviter toute étape de concentration avant l'injection.

Finalement, un gradient démarrant à 36 % d'ACN et étalé dans la zone d'intérêt (gradient 4, Tableau 15) n'a pas permis de retrouver d'activité lytique dans aucune des fractions. Afin d'évaluer si cette perte d'activité n'était pas liée au pourcentage initial d'ACN, nous avons testé un gradient étalé dans la zone d'intérêt avec les mêmes conditions initiales que le gradient 3 (gradient 5, Tableau 15). Comme auparavant, aucun effet lytique n'a été observé.

Cette perte d'activité peut également s'expliquer par l'**étalement du gradient** et la répartition de la protéine d'intérêt sur deux fractions consécutives. Dans ce cas, la quantité de molécule active dans une fraction est peut être à la limite de la sensibilité des tests d'activité. Ces résultats peuvent également suggérer une **synergie** de plusieurs protéines à l'origine de l'effet lytique sur les FBs. Des investigations sont actuellement en cours pour répondre à ces hypothèses. Des quantités plus importantes de matériel biologique sont notamment en cours d'analyse.

Gradient 3		Gradient 4		Gradient 5	
Temps (min)	% solvant B	Temps (min)	% solvant B	Temps (min)	% solvant B
0	2	0	36	0	2
5	2	5	36	5	2
20	9,5	105	46	20	9,5
100	29,5			100	29,5
160	59,5			285	48

Tableau 15 : Gradients testés pour l'isolement de la protéine à effet lytique.

Solvant A : H₂O + 0,05 % TFA, Solvant B : ACN + 0,045 % TFA. La pente du gradient dans la zone de la fraction d'intérêt est de 0,5 % ACN/min pour le gradient 3 et de 0,1 % ACN/min pour les gradients 4 et 5.

C/ Conclusion

Nous avons montré qu'il était nécessaire de travailler à partir d'un lot d'au moins six tiques pour compenser la variabilité biologique des échantillons.

L'analyse d'extraits de glandes salivaires de tiques non infectées a permis de mettre en évidence des fractions à activité anti-inflammatoire au niveau des KCs. D'autre part, nous avons mis en évidence une fraction montrant un effet cytotoxique sur les FBs. L'analyse protéomique de ces différentes fractions a permis d'identifier des protéines appartenant à la famille des protéines de type Salp9 potentiellement anti-inflammatoires, ainsi que deux protéines reliées à l'apoptose, potentiellement responsables de l'effet cytotoxique sur les FBs. Lors de nos premières tentatives d'isolement de la protéine à effet lytique, nous avons mis en évidence un possible effet synergique entre plusieurs molécules. Cette hypothèse reste à confirmer. En parallèle, il sera nécessaire de réaliser l'isolement et l'identification de la ou des protéines responsables de l'activité anti-inflammatoire sur les KCs.

Enfin, cette étude sur les extraits de glandes salivaires de tiques non infectées devra être étendue à l'étude d'extraits de glandes salivaires de tiques infectées par *Borrelia*, afin d'étudier l'impact de l'infection sur ces différentes protéines anti-inflammatoires ou cytotoxiques.

Le Tableau 16 page suivante récapitule l'ensemble des protéines identifiées à partir d'extraits de glandes salivaires de tiques dans ce chapitre.

Protéines identifiées	Numéro d'accèsion	Tique nourries pendant 3 jours		Tique nourries pendant 5 jours	
		Non infectées (GSnegJ+3)	Infectées (GSposJ+3)	Non infectées (GSnegJ+5)	Infectées (GSposJ+5)
<i>putative anticoagulant Salp9-like</i>	gi 67083696	✓	✓	✓	✓
<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241848133	✓	✓	✓	✓
<i>ribosomal protein L27A, putative</i>	gi 241681373	✓	✓	✓	
<i>histone H1, putative</i>	gi 240952152	✓	✓	✓	
<i>heat shock protein, putative</i>	gi 240972667 gi 241153675 gi 241998026	✓	✓		
<i>GTP-binding nuclear protein RAN1, putative</i>	gi 241833067	✓		✓	
<i>Actin</i>	gi 164472819	✓		✓	
<i>beta tubulin</i>	gi 241151391	✓		✓	
<i>40S ribosomal protein S14, putative</i>	gi 241836194	✓			✓
<i>ribosomal protein S19, putative</i>	gi 241618566		✓	✓	
<i>60S ribosomal protein L14, putative</i>	gi 240978971	✓			
<i>cuticular protein, putative</i>	gi 240980298	✓			
<i>Full=40S ribosomal protein S21</i>	gi 75029844	✓			
<i>protein kinase, putative</i>	gi 241741186	✓			
<i>ribosomal protein L31, putative</i>	gi 241122570	✓			
<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative</i>	gi 241999408	✓			
<i>salivary secreted protein</i>	gi 22164186	✓			
<i>putative salivary secreted protein with polyK tail</i>	gi 67083505	✓			
<i>secreted salivary gland protein 2 precursor</i>	gi 45593710	✓			
<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241640416	✓			
<i>conserved hypothetical protein</i>	gi 241177232	✓			
<i>40S ribosomal protein S27A, putative</i>	gi 240952274	✓			
<i>carbonic anhydrase, putative</i>	gi 241736959	✓			
<i>putative secreted salivary peptide of 9.41 kDa</i>	gi 51011396	✓			
<i>protein disulfide isomerase, putative</i>	gi 241749561	✓			
<i>elongation factor, putative</i>	gi 241781537	✓			
<i>small heat shock protein, putative</i>	gi 241860225	✓			
<i>cytochrome c</i>	gi 51011608	✓			
<i>40S ribosomal protein S27, putative</i>	gi 241714817		✓		
<i>FOF1-type ATP synthase, beta subunit, putative</i>	gi 241705635		✓		
<i>ribosomal protein L3, putative</i>	gi 241859209		✓		

Protéines identifiées	Numéro d'accèsion	Tique nourries pendant 3 jours		Tique nourries pendant 5 jours	
		Non infectées (GSnegJ+3)	Infectées (GSposJ+3)	Non infectées (GSnegJ+5)	Infectées (GSposJ+5)
<i>40S ribosomal protein S10, putative</i>	gi 241813650		✓		
<i>FOF1-type ATP synthase, alpha subunit, putative</i>	gi 241729762		✓		
<i>translation elongation factor EF-1 alpha/Tu, putative</i>	gi 241647495			✓	
<i>rho GDP dissociation inhibitor, putative</i>	gi 241626775			✓	
<i>secreted salivary gland peptide, putative</i>	gi 242000128				✓
<i>putative salivary protein with polylysine tail</i>	gi 67083481				✓

Tableau 16 : Tableau récapitulatif des protéines identifiées dans des extraits de glandes salivaires de tiques.

Chapitre IV : Développement d'une méthode diagnostique par spectrométrie de masse LC-SRM

Les méthodes actuelles de diagnostic de la maladie de Lyme sont tardives et consistent en la détection indirecte de la bactérie par ELISA ou Western-blot. Le diagnostic le plus précoce de la maladie s'appuie uniquement sur l'observation clinique du patient, avec en particulier l'observation d'un érythème migrant. Le besoin d'une méthode diagnostique précoce se fait donc ressentir, attesté par les différentes études visant à améliorer les cultures bactériennes (Liveris *et al.*, 2011) ou à développer des méthodes sérodiagnostiques ciblant des épitopes spécifiques de *Borrelia burgdorferi* (Arnaboldi *et al.*, 2013).

Dans ce contexte, nous avons envisagé au cours de ma thèse le développement d'une méthode diagnostique, par spectrométrie de masse LC-SRM, à partir de biopsies cutanées.

I- Introduction

La spectrométrie de masse SRM (*Selected Reaction Monitoring*) est une méthode sensible et spécifique permettant la détection et/ou la quantification de molécules. En protéomique, cette technique a émergé depuis une dizaine d'années et de nombreuses études de biomarqueurs dans des fluides biologiques (sang, plasma, urine...) ont été décrites (Kuzyk *et al.*, 2009 ; Surinova *et al.*, 2011 ; Huillet *et al.*, 2012 ; Resson *et al.*, 2012 ; Magiera *et al.*, 2013).

Dans le cadre des maladies à transmission vectorielle, les études par spectrométrie de masse SRM sont rares, voire inexistantes. L'intérêt pour cette stratégie commence néanmoins à émerger : dans une étude récente, l'approche protéomique ciblée par LC-SRM a été employée pour valider des candidats biomarqueurs de *Plasmodium falciparum* dans le plasma, mis en évidence précédemment par une approche protéomique shotgun (Thézénas *et al.*, 2013). Cette étude a permis de valider un nouveau biomarqueur pour le diagnostic de l'infection par le protozoaire : la protéine hypoxanthine phosphoribosyltransferase (pHPRT).

Dans notre cas, l'objectif est la détection de protéines spécifiques de *Borrelia* afin d'établir un diagnostic précoce de l'infection. Lorsque la tique pique, les bactéries *Borrelia* sont injectées au niveau cutané dans l'organisme hôte. Elles vont se développer dans la peau avant de se disséminer dans le reste de l'organisme. La peau représente alors l'élément de choix pour la détection précoce de la bactérie chez l'hôte.

La première partie de ce chapitre présentera la peau, acteur de la maladie de Lyme particulièrement étudié ici. Les deux parties suivantes présenteront les étapes clés du développement d'une méthode de spectrométrie de masse SRM, et les caractéristiques du système microLC-SRM utilisé dans notre laboratoire. Ensuite, nous détaillerons les différentes optimisations et évaluations de performances réalisées lors de l'installation du couplage. Nous exposerons les optimisations de la préparation d'échantillon et la mise en œuvre de la méthode LC-SRM pour la détection de *Borrelia*. Enfin, nous appliquerons ces différents développements à l'analyse de biopsies de peau de souris infectées par *Borrelia*.

II- La peau

La peau constitue la première barrière de protection de l'organisme face à l'environnement extérieur, notamment les agents pathogènes. Elle est structurée en différentes strates de la surface externe vers la surface la plus interne (Figure 64).

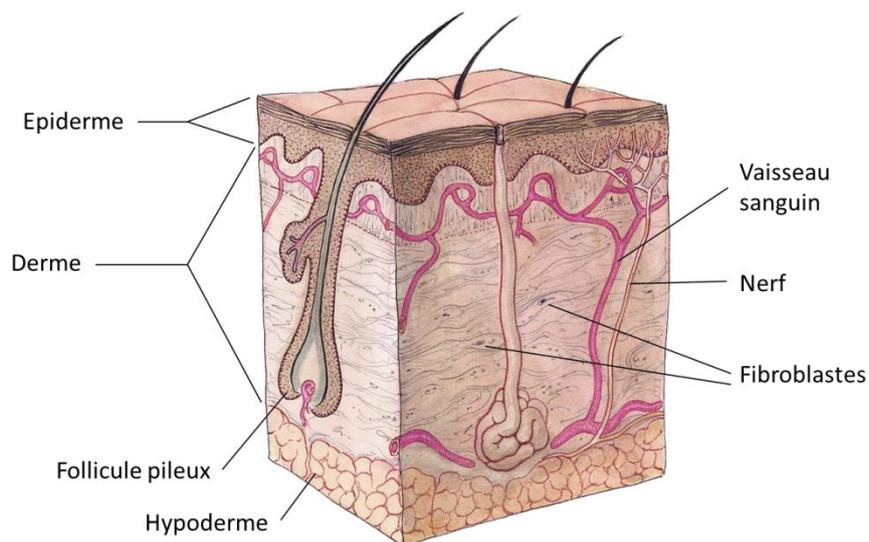


Figure 64 : Coupe de la peau.

D'après National Institute of General Medical Sciences, <http://www.nigms.nih.gov/>.

La partie la plus superficielle est dénommée **épiderme**, principalement constituée de kératinocytes et qui ne contient pas de vaisseaux sanguins. Les fonctions principales de l'épiderme sont de protéger l'organisme contre les agressions mécaniques ou les radiations lumineuses et de jouer un rôle important dans le mécanisme de l'immunité innée en initiant la réponse immunitaire par l'activation de la voie de signalisation NF- κ B pathway (Ebnet et al., 1997) lors de la reconnaissance de motifs PAMP caractéristiques d'agents pathogènes. L'épiderme humain est constitué de 6 à 10 couches de cellules, pour une épaisseur de plus de 100 μ m (Khavari, 2006). L'épiderme est relié à une couche interne plus épaisse : le **derme**. Le derme est un tissu conjonctif constitué majoritairement de fibroblastes entourés par une matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire est constituée de 77 % de collagène et de 4 % d'élastine (Hussain et al., 2013). Le rôle du collagène et de l'élastine est d'assurer la cohérence et l'élasticité du derme. Contrairement à l'épiderme, le derme est irrigué par les vaisseaux sanguins. Il constitue donc la couche visée par les tiques qui vont y ancrer leur pièce piqueuse afin de prélever le sang de l'hôte mais également d'injecter sa salive potentiellement infectée par la bactérie *Borrelia*. Chez l'homme, l'épaisseur du derme dépend de la localisation et peut atteindre quelques millimètres. Enfin, la couche la plus profonde de la peau est l'**hypoderme**. Il est principalement constitué de tissu adipeux et est abondamment vascularisé. L'hypoderme a pour fonction majeure de protéger thermiquement et mécaniquement l'organisme.

Nous nous intéresserons dans ce chapitre et dans le suivant à la détection de la bactérie *Borrelia* au niveau du derme. Le derme correspond d'une part à la profondeur au niveau de laquelle la

bactérie est injectée. D'autre part, le modèle animal que nous utiliserons, la souris, possède un épiderme de très faible épaisseur par rapport à l'épiderme humain (3 couches de cellules, soit une épaisseur inférieure à 25 μm (Khavari, 2006)). La Figure 65 représente un comparatif entre la peau murine et la peau humaine. Bien que beaucoup plus fin, le derme murin permet de modéliser le derme humain afin d'étudier les interactions *Borrelia*/peau.

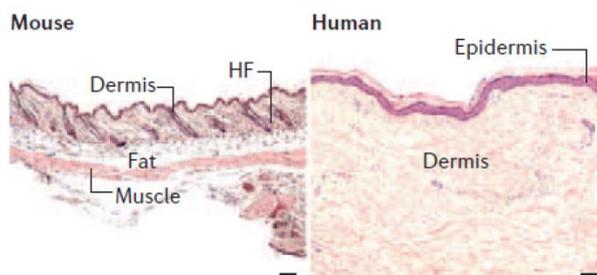


Figure 65 : Comparaison entre peau murine et peau humaine.

D'après (Khavari, 2006). Des coupes histologiques de peau dorsale du modèle murin (à gauche) et du modèle humain (à droite) sont présentées. La barre noire représente 100 μm . Epiderme : *Epidermis*. Derme : *Dermis*. Hypoderme : *Fat*. Muscle : *Muscle*. Follicules pileux : HF.

III- Etapes cruciales du développement d'une méthode SRM

Comme nous l'avons abordé dans le chapitre II, le développement d'une méthode SRM passe par plusieurs étapes cruciales (Figure 30) qui vont maintenant être détaillées.

Sélection des protéines et des peptides d'intérêt

Le choix des protéines d'intérêt est principalement guidé par la problématique biologique d'un projet de recherche. Ce choix peut être basé sur des résultats préliminaires de protéomique *shotgun* ayant mis en évidence des biomarqueurs potentiels. Il peut également être guidé par des résultats de génomique, de transcriptomique, ou encore d'immunologie (Western-blot, ELISA).

La seconde étape est la sélection des peptides d'intérêt issus de la digestion des protéines d'intérêt. Ces peptides doivent représenter de façon optimale l'ensemble des protéines sélectionnées afin de pouvoir les détecter et les quantifier. Il est important de sélectionner des peptides **protéotypiques** (Mallick *et al.*, 2007), c'est-à-dire des peptides uniques à la protéine d'intérêt et facilement détectables par spectrométrie de masse. Le caractère d'unicité du peptide peut être vérifié par comparaison de la séquence d'acides aminés du peptide avec l'ensemble des séquences des protéines des organismes concernés lors de l'analyse. Par exemple, dans le cas de maladies à transmission vectorielle comme la maladie de Lyme, différents organismes entrent en jeu (vecteur, pathogène, hôte) et la séquence du peptide ne doit appartenir qu'à une seule protéine de ces trois protéomes.

La détection par spectrométrie de masse dépend majoritairement de l'efficacité d'ionisation et du ratio m/z du peptide concerné. Dans une optique de quantification, des paramètres supplémentaires sont à prendre en considération pour le choix des peptides protéotypiques : l'influence des étapes de préparation d'échantillon (existence dans la séquence du peptide de sites d'omission de coupure par l'enzyme de digestion, solubilisation des peptides après digestion) et des étapes de séparation par HPLC (hydrophobicité des peptides). Le cas idéal pour le choix des peptides est celui où nous disposons des protéines cibles pures. La digestion enzymatique et la réponse des peptides tryptiques en LC-MS peuvent alors directement être testées. Malheureusement, cette situation est relativement rare. Pour pallier cette difficulté, de nombreux outils informatiques ont été développés par différents groupes de recherche pour aider à choisir les peptides précurseurs les plus adaptés. Deux catégories d'outils se distinguent : les outils basés sur des observations expérimentales, dit empiriques, et les outils prédictifs. Les outils empiriques sont principalement des banques protéiques de dépôt, alimentées par l'ensemble de la communauté des protéomistes à partir de données MS/MS. Parmi ces banques nous pouvons citer PeptideAtlas (Deutsch *et al.*, 2008), Pride (Vizcaino *et al.*, 2009), GPMDB (*Global Proteom Machine Database*) (Craig *et al.*, 2004) ou encore GAPP (*Genome Annotating Proteomic Pipeline*) (Shadforth *et al.*, 2006). Les outils prédictifs, tels que PeptideSieve

(Mallick *et al.*, 2007), ESPredictor (Fusaro *et al.*, 2009) ou STEPP (Webb-Robertson *et al.*, 2008), ont été développés dans les cas où très peu de données, voire aucune, sont disponibles. Afin de prédire le comportement des peptides en LC et en MS, ces approches statistiques prennent en compte les propriétés physico-chimiques des peptides, la charge, l'hydrophobie,...

D'autres paramètres relatifs à la séquence en acides aminés sont à prendre en compte pour le choix des peptides précurseurs (Gallien *et al.*, 2011 ; Picotti *et al.*, 2012). Généralement les peptides d'environ dix acides aminés sont préférés. Les peptides sujets aux modifications post-traductionnelles, comme les glycosylations ou les phosphorylations, ou aux modifications pouvant survenir lors de la préparation d'échantillon, comme l'alkylation des cystéines ou l'oxydation des méthionines, sont à prendre en compte avec précaution pour la quantification. En effet, comme ils peuvent être présents sous différentes formes, la quantification peut être sous-évaluée. Néanmoins, l'étude de tels peptides reste envisageable en adaptant la stratégie d'analyse. Par exemple, Simon *et al.* ont montré qu'il était possible de quantifier de manière absolue un peptide contenant une méthionine, en insérant une étape d'oxydation de l'échantillon avec de l'acide performique juste après l'étape de digestion enzymatique (Simon *et al.*, 2012).

Outre la nature des peptides choisis, se pose la question du nombre de peptides à sélectionner. Un peptide représente seulement une infime partie de la protéine et ne signale pas forcément des modifications au niveau protéique comme le clivage ou la présence d'isoformes de séquence. La sélection d'un seul peptide peut alors ne pas représenter la présence effective de la protéine considérée et la quantification se trouve biaisée. Ces inconvénients peuvent être minimisés en choisissant plusieurs peptides par protéine, couvrant une majorité de la séquence, à la fois dans les zones conservées et variables dans le cas de variants.

Sélection des transitions

Lorsque les peptides représentatifs des protéines d'intérêt ont été sélectionnés il faut procéder à la sélection des transitions entre les peptides précurseurs et leurs fragments obtenus après fragmentation CID. Elle consiste en la sélection (i) du rapport m/z du précurseur, paramétré au niveau du premier quadripôle, et (ii) de rapports m/z des fragments, paramétrés au niveau du troisième quadripôle. Bien que le calcul des rapports m/z des fragments soit assez simple, il est important de choisir les fragments observés les plus intenses, maximisant ainsi la sensibilité de la technique. Le choix des transitions peut également influencer sur la spécificité. Étant donnée la complexité des échantillons en protéomique et la forte probabilité d'avoir des peptides isobariques (même masse donc même rapport m/z), des interférences sont fréquentes. Il paraît donc inapproprié de raisonner sur une seule transition pour la détection d'une protéine en SRM (Picotti *et al.*, 2012). Généralement, au minimum deux, voire trois, transitions sont sélectionnées. Les fragments y monochargés ayant un rapport m/z supérieur à celui du peptide précurseur doublement ou triplement chargé sont préférés (Gallien *et al.*, 2011). Les ions b ne sont pas privilégiés car ils ont tendance à engendrer des fragmentations secondaires au sein de la cellule de collision, ce qui induit

une perte d'information au niveau du signal obtenu pour ces transitions. Cependant, une étude a montré que les ions *b* peuvent tout de même être envisagés, à condition d'optimiser au maximum leur détection, notamment en ajustant l'énergie de collision (Holstein Sherwood *et al.*, 2011).

Tout comme pour la sélection des peptides protéotypiques, le cas idéal est celui où l'on dispose des peptides purifiés afin de choisir les transitions les plus intenses observées en SRM. Si ce n'est pas le cas, il existe là aussi des outils, empiriques ou prédictifs, d'aide à la sélection. Parmi les outils prédictifs, citons MRmaid (Mead *et al.*, 2009), MRMer (Martin *et al.*, 2008), TIQAM (Lange *et al.*, 2008a) et le logiciel Skyline (MacLean *et al.*, 2010a). Pour les outils empiriques, ceux présentés précédemment (PeptideAtlas, Pride, GPMDB, GAPP), basés sur des résultats de spectrométrie de masse en tandem, peuvent être utilisés. D'autres interfaces ont également été développées spécifiquement pour le choix de transitions en SRM : SRMAtlas, MaRiMba (Sherwood *et al.*, 2009a) ou encore MRmaid. Nous pouvons ici nous poser la question de la représentativité des fragments observés expérimentalement. Généralement les données de spectrométrie de masse en tandem contenues dans les banques de dépôt empiriques sont acquises sur des pièges à ions, des Orbitraps ou des Q-TOF, alors que les données de protéomique ciblée se font sur des instruments de type QqQ ou Q-Trap. L'intensité des fragments obtenus va dépendre du type d'instrument et des paramètres d'acquisition. Cependant, une étude de Sherwood *et al.* a montré une forte corrélation en intensité entre les ions *y* observés sur un spectre MS/MS obtenu à partir d'un piège à ions et l'intensité des fragments suivis en SRM sur un triple quadripôle (Sherwood *et al.*, 2009b). Ceci justifie l'utilisation de banques spectrales pour le développement de méthode SRM. De plus l'utilisation de données expérimentales reste préférable par rapport à l'utilisation de données théoriques.

Validation des transitions

Lorsque les transitions ont été choisies, il est important de vérifier expérimentalement leur profil chromatographique. En effet, la matrice biologique peut avoir une forte influence sur le signal, qui n'est pas prise en compte dans les outils prédictifs ou lors de l'analyse des protéines d'intérêt purifiées. Tout d'abord, il est possible d'observer un effet sur l'intensité du signal, celui-ci peut être fortement réprimé ou même amélioré en présence de la matrice. Ensuite, la matrice peut induire des interférences *via* des espèces co-éluées avec le peptide précurseur et partageant une transition avec celui-ci. Différentes stratégies ont été développées pour valider que les transitions suivies décrivent bien le peptide d'intérêt.

Lorsqu'un signal est détecté pour l'ensemble des transitions d'un peptide, l'identité de celui-ci peut être confirmée par un spectre de fragmentation MS/MS *full scan* (Unwin *et al.*, 2005). Le spectre ainsi obtenu est soumis à une recherche dans les banques de données afin de valider l'identification du peptide d'intérêt. Cette stratégie a été appelée MIDAS (*Multiple reaction monitoring-Initiated Detection And Sequencing*) ou SRM-triggered MS/MS (Lange *et al.*, 2008b). Par rapport à l'identification par LC-MS/MS classique, elle présente l'avantage d'être spécifique et de permettre l'identification de peptides peu abondants d'un échantillon complexe (Lange *et al.*, 2008a).

Cependant, le mode d'acquisition *MS/MS full scan* sur un triple quadripôle présente une sensibilité réduite par rapport au mode SRM ce qui peut compliquer l'identification des protéines minoritaires, détectées en SRM mais pas en *MS/MS*. De plus, la mesure *MS/MS full scan* est consommatrice en temps et perturbe le cycle d'acquisition des données SRM. Dans une optique de quantification, le temps perdu pour l'acquisition du spectre *MS/MS* influence le résultat final puisque moins de points SRM peuvent être acquis. Cette influence est d'autant plus importante si le nombre de peptides précurseurs suivis est grand, et si l'instrument utilisé est de type QqQ (Gallien *et al.*, 2011). En effet, avec ces spectromètres de masse, le temps d'acquisition d'un spectre *MS/MS full scan* est relativement long.

Une seconde stratégie, dénommée *intelligent Selected Reaction Monitoring (iSRM)* et visant également la validation des transitions par l'identification du peptide précurseur, a été développée récemment (Kiyonami *et al.*, 2011). Son objectif est de construire un spectre de fragmentation composite à partir d'un nombre important de transitions suivies pour un peptide. L'acquisition des données se déroule en deux temps. Tout d'abord deux ou trois transitions, appelées transitions primaires, sont mesurées pour ce peptide. Ensuite, lorsqu'un seuil de détection de ces transitions primaires est atteint, huit à dix transitions supplémentaires, appelées transitions secondaires, sont mesurées ponctuellement une à deux fois au cours du pic d'élution du peptide. Les transitions primaires sont utilisées pour la quantification du peptide et l'ensemble des transitions primaires et secondaires sont utilisées pour la construction d'un pseudo spectre de fragmentation *MS/MS* à partir de l'aire du pic chromatographique de chaque transition. Cette stratégie permet de ne pas suivre l'ensemble des transitions d'un peptide tout au long de l'analyse et de s'affranchir de la mesure d'un spectre *MS/MS*, permettant ainsi de consacrer le plus de temps possible pour la mesure d'un grand nombre de peptides précurseurs.

La validation des transitions peut également se faire sans identification du peptide précurseur par un spectre *MS/MS* ou pseudo *MS/MS*, dans la mesure où certaines contraintes sont appliquées pour l'évaluation des données. Les premiers paramètres à prendre en compte sont la conservation du temps de rétention du peptide, la vérification de la co-élution des différentes transitions et la forme du pic des différentes transitions. Il faut ensuite veiller aux propriétés de fragmentation et vérifier que l'intensité entre les différents fragments mesurés garde les mêmes proportions. Dans le cas où l'on dispose de peptides standards marqués, l'ensemble de ces vérifications est facilité et la confiance dans le résultat est accrue. En effet, ces peptides standards ont la même séquence que le peptide cible, mais sont marqués sur un des acides aminés. Les deux peptides se distinguent par leur différence de masse et ils ont les mêmes propriétés physico-chimiques : ils présentent le même temps de rétention et les mêmes rapports d'intensité entre leurs différentes transitions. Les peptides standards peuvent donc être ajoutés à l'échantillon et le suivi des transitions du peptide léger et du peptide lourd au cours du temps permet de distinguer entre le signal d'un peptide peu abondant et le signal d'un ion interférent. Cette stratégie de validation idéale est aujourd'hui privilégiée et largement utilisée, particulièrement depuis que des peptides standards commercialisés, comme les peptides PEPotecs (Thermo Fischer Scientific), sont devenus plus accessibles financièrement.

Optimisation des transitions

Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode SRM, et ainsi améliorer la limite de détection des peptides d'intérêt, les paramètres d'acquisition peuvent être optimisés. Certains paramètres dépendent du peptide précurseur comme la tension appliquée dans la source lors de l'ionisation (tension de cône ou *declustering potential*), d'autres des transitions, comme l'énergie de collision. L'efficacité de fragmentation dépend aussi de la nature et de la pression du gaz de collision. Cependant, ces deux derniers paramètres ne sont généralement pas modifiés en fonction de l'échantillon analysé (Gallien *et al.*, 2011). Si la tension de cône est trop élevée, les peptides peuvent se fragmenter dans la source, induisant une perte de signal due aux fragments formés qui ne sont pas sélectionnés dans le premier quadripôle. Au contraire, si elle est trop basse, les peptides ne sont pas efficacement transférés vers l'analyseur. Si l'on augmente l'énergie de collision, l'efficacité de fragmentation du peptide précurseur augmente, induisant une augmentation de l'intensité des fragments détectés dans le troisième quadripôle. Il existe cependant une limite à ne pas dépasser causée par l'apparition de fragmentation secondaire. Les valeurs de l'énergie de collision et de tension de cône dépendent essentiellement du rapport m/z et de la charge du peptide précurseur. Il existe donc des corrélations, fonction de la charge, entre l'énergie de collision ou la tension de cône et le rapport m/z du précurseur. Différentes études ont été menées afin de déterminer l'influence de l'optimisation de l'énergie de collision ou de la tension de cône (Sherwood *et al.*, 2009c ; MacLean *et al.*, 2010b ; Picotti *et al.*, 2010 ; Holstein Sherwood *et al.*, 2011). Ces études montrent que la différence entre le signal obtenu avec l'énergie de collision optimisée et celui obtenu avec l'énergie de collision par défaut (à partir d'équations de corrélation) est relativement faible. Les études de MacLean *et al.* et Holstein Sherwood *et al.* montrent une amélioration moyenne de l'aire sous les pics inférieure à 10 % sur un ensemble de 30 peptides (20 doublement chargés et 10 triplement chargés) et de 22 peptides triplement chargés, respectivement. Picotti *et al.* montrent un gain d'intensité inférieur à 50 % pour 71 % des peptides dans le cas de l'énergie de collision et pour 97 % des peptides dans le cas de la tension de cône sur une centaine de peptides. L'étude de Sherwood *et al.* est plus optimiste, montrant une amélioration de l'aire sous les pics d'au moins 30 % pour 59 % des 90 transitions suivies dans le cas de l'énergie de collision. Cependant, dans cette étude, l'optimisation a été menée au niveau de chaque transition et non pas au niveau du peptide précurseur. Ceci implique que chaque transition peut présenter une énergie de collision optimale différente et que les gains obtenus pour chaque transition d'un même peptide ne sont pas homogènes. Par exemple, pour un peptide donné, une transition peut présenter une amélioration de 234 % alors qu'une autre ne montre pas d'amélioration (Sherwood *et al.*, 2009c). La conclusion qui semble se dégager de l'ensemble de ces études est qu'il est nécessaire d'optimiser ces deux paramètres uniquement lorsqu'une sensibilité particulièrement élevée est désirée (Picotti *et al.*, 2012).

Multiplexage

Les analyses par LC-SRM permettent de suivre simultanément un nombre élevé de transitions. Cet atout de multiplexage est particulièrement intéressant par rapport aux techniques de quantification exposées dans le chapitre II. Cependant, le nombre de transitions pouvant être suivies lors d'une analyse par LC-SRM n'est pas illimité. Au cours de l'analyse, les transitions sélectionnées sont mesurées les unes après les autres et ce cycle de mesure est répété au cours du temps. Le temps consacré à la mesure d'une transition est appelé **temps de scan (scan time)**, ou **dwel time** selon les fabricants, et le temps consacré à la mesure de l'ensemble de toutes les transitions est appelé **temps de cycle (cycle time)**. Ce temps de cycle va directement dépendre du **nombre total de transitions** sélectionnées pour l'ensemble des peptides et de la valeur du temps de scan :

$$\text{temps de cycle} = \text{nombre de transitions} \times \text{temps de scan}$$

Si l'on veut augmenter le nombre de transitions suivies, il faut augmenter le temps de cycle ou diminuer le temps de scan. Cependant, nous ne pouvons pas jouer indéfiniment sur ces paramètres. En effet, afin de conserver la fiabilité des résultats, il est important que le pic chromatographique de chacune des transitions soit défini par un minimum d'une dizaine de points. Cela implique que le temps de cycle ne doit pas dépasser une valeur limite. Par exemple, pour des pics chromatographiques de 15 à 30 s, l'écart de temps entre deux mesures consécutives pour une transition donnée ne doit pas excéder 1,5 à 3 s. Quant au temps de scan, plus il est faible, plus l'intensité des transitions sera faible, conduisant à une diminution du rapport signal sur bruit et à perte de sensibilité. A titre d'exemple, pour un temps de scan acceptable de **20 ms** et un temps de cycle de **3 s**, le nombre maximal de transitions pouvant être mesurées est de **150**, soit **50 peptides** précurseurs si nous choisissons trois transitions par peptide et **17 protéines** si nous choisissons 3 peptides par protéine. Ceci soulève donc une limitation de la stratégie.

Afin d'augmenter le nombre de protéines qui peuvent être ciblées, la mesure de transitions en fonction du temps de rétention du peptide précurseur, appelée acquisition en mode **scheduled SRM**, a été développée. Connaissant le temps de rétention des peptides précurseurs, nous pouvons limiter la mesure des transitions sur une fenêtre de temps restreinte à quelques min autour du temps de rétention connu. Le nombre de transitions pouvant être mesurées au cours d'une seule analyse est alors fortement augmenté. Pour les mêmes temps de cycle et de scan que précédemment, nous pouvons suivre un maximum de 150 transitions mais à un temps donné, ce qui signifie qu'elles peuvent changer au cours du temps et résulter en un suivi d'un nombre accru de protéines et donc un encore meilleur multiplexage.

Méthodes de quantification

De nombreuses stratégies de quantification par SRM couplé à l'utilisation de peptides de référence isotopiquement marqués (SID, *Stable Isotope Dilution*) ont été développées au cours de ces dernières années. Elles impliquent l'ajout d'une quantité connue d'un isotope stable marqué (¹³C, ¹⁵N) de la

protéine ou du peptide à quantifier. Ces peptides marqués présentent l'avantage d'être co-élués en HPLC et de subir les mêmes mécanismes de fragmentation par rapport aux peptides légers. La mesure simultanée en mode d'acquisition SRM des peptides lourds et légers, après digestion enzymatique, permet de déterminer la quantité du peptide léger, et donc de la protéine par extrapolation, en utilisant le peptide lourd comme standard interne. Ces stratégies sont aujourd'hui les méthodes de référence pour la quantification absolue de protéines d'intérêt.

La première stratégie développée, qui reste la plus appliquée, utilise des peptides marqués de haute qualité, de grande pureté et quantifiés précisément, dénommés **peptides AQUA™** (*Absolute QUAntification*), dont la séquence est identique aux peptides ciblés. Cette stratégie a été présentée par l'équipe de Steven Gygi à Boston en 2003 et permet une quantification très précise (Gerber *et al.*, 2003). Toutefois le coût élevé des peptides AQUA™ limite leur utilisation. Aujourd'hui une large gamme de peptides marqués sont disponibles commercialement : des peptides AQUA™ marqués (purs et précisément quantifiés, lyophilisés ou en solution avec différentes précisions de concentration), et des peptides marqués dont la quantité est déterminée plus grossièrement, ou *crude peptide* (non purifiés, lyophilisés ou en solution). Le développement de ces derniers a permis de rendre abordable la quantification relative et la validation des méthodes de quantification à l'aide de peptides synthétiques marqués. Une seconde limitation à l'utilisation de cette stratégie est l'étape de digestion enzymatique appliquée aux protéines endogènes. En effet, une digestion incomplète conduit à la perte d'information pour certains peptides légers et à la sous-estimation de la quantité réelle de protéines étant donné que le peptide marqué ne subit pas cette étape. De plus, il faut faire attention aux modifications pouvant survenir sur le peptide léger lors de la traduction de la protéine ou au cours de la préparation d'échantillon, et qui ne seront pas présentes sur le peptide lourd. Dans un tel cas, l'utilisation d'un peptide lourd modifié est possible. L'utilisation de protéines marquées a alors été envisagée afin de s'affranchir de ces limitations.

En 2005, la stratégie **QconCAT** (*Quantification conCATamer*) a été présentée par Beynon *et al.* (Beynon *et al.*, 2005). Les peptides d'intérêt sont concaténés, représentant ainsi une protéine fictive. Le gène synthétique codant cette protéine fictive est ensuite exprimé chez *Escherichia coli* dans un milieu contenant des lysines et des arginines marquées. Après purification et détermination précise de la quantité, la protéine fictive marquée peut être ajoutée dans l'échantillon avant l'étape de digestion enzymatique. La plus grosse limitation de cette stratégie est l'étape de digestion qui dépend de la séquence de la protéine. Les peptides générés par la digestion de la protéine QconCAT ne sont peut-être pas représentatifs des peptides réellement générés à partir des protéines d'intérêt. La quantification est alors biaisée. Cependant, une protéine QconCAT permet de cibler plusieurs protéines avec un seul standard. En général, entre dix et trente protéines peuvent être représentées (Simpson *et al.*, 2012).

En 2007, Brun *et al.* ont développé la méthode **PSAQ™** (Brun *et al.*, 2007). Cette méthode fait également appel à la synthèse de protéines marquées, mais il s'agit ici de l'équivalent des protéines d'intérêt, entièrement marquées. Ces protéines standards représentent parfaitement les protéines d'intérêt et peuvent donc être ajoutées dans l'échantillon le plus tôt possible dans le processus de

préparation d'échantillon. Contrairement aux deux méthodes précédentes, cette stratégie prend en compte l'influence des étapes de préfractionnement réalisées en amont de la digestion enzymatique et pouvant introduire des pertes des protéines d'intérêt. Les deux protéines, endogène et PSAQTM, vont subir les mêmes étapes et les mêmes pertes. La quantification des protéines d'intérêt est donc extrêmement précise. Cependant, les protéines PSAQTM sont exprimées par un organisme différent de celui de la protéine d'intérêt. Des différences de structure ou de modifications post-traductionnelles peuvent alors survenir, pouvant affecter l'efficacité de l'enzyme de digestion. Il faut également noter que les standards nécessaires pour les stratégies QconCAT et PSAQTM sont plus difficiles à obtenir et beaucoup plus chers que les peptides AQUATM.

IV-Présentation du couplage

L'ensemble des analyses LC-SRM présentées dans ce chapitre ont été réalisées sur un couplage microHPLC Ultimate 3000/ triple quadripôle TSQ Vantage™ (Thermo Fischer Scientific), acquis par notre laboratoire en septembre 2011.

La chaîne chromatographique U 3000 présentée ici est de configuration différente par rapport à celle utilisée lors de l'analyse des extraits de glandes salivaires de tiques (chapitre III). Les principales modifications sont le passeur d'échantillon qui fonctionne uniquement en mode injecteur (pas de collecte), l'absence de détecteur UV, et l'utilisation de la pompe NCP-3500RS CAP, intégrant une pompe de chargement pour la pré-concentration et une pompe à gradient binaire haute pression. Pour la séparation des peptides, une pré-colonne Dionex Acclaim PepMap100 C18, 500 µm x 15 mm et une colonne Dionex Acclaim PepMap100 C18, 300 µm x 15 cm, 3 µm ont été utilisées avec le système de solvants suivants : H₂O/ACN 98:2, 0,1 % FA comme solvant aqueux lors du chargement sur la pré-colonne et lors de l'élution, et ACN/H₂O 98:2, 0,1 % FA comme solvant organique lors de l'élution. Le débit de chargement a été fixé à 50 µL/min et le débit de séparation à 5 µL/min.

L'interface de couplage entre la microHPLC et le spectromètre de masse ESI-MS est une sonde HESI-II™ (*Heated-ElectroSpray Ionisation*) (Figure 66). Cette interface développée par Thermo Fischer Scientific, permet de coupler une chaîne HPLC avec un spectromètre de masse Thermo Fischer Scientific pour un débit de solvant de 1 µL/min à 1 mL/min. Le principe de cette sonde est d'utiliser la technique d'ionisation electrospray stabilisée par un flux de gaz de nébulisation (*sheath gaz*), en combinaison avec un flux de gaz auxiliaire chauffé. Les deux gaz ont la particularité d'arriver de façon coaxiale autour de l'aiguille métallique d'introduction de l'échantillon. Le gaz de nébulisation entoure directement l'aiguille métallique et induit la nébulisation du liquide en fines gouttelettes. Le gaz auxiliaire chauffé, plus éloigné de l'aiguille, assiste le gaz auxiliaire lors de la désolvatation des gouttelettes. En fonction du débit de solvant utilisé, cette nouvelle génération de sonde permet l'utilisation de deux types d'aiguille : une aiguille de diamètre interne de 76 µm, adaptée pour les faibles débits (1-10 µL/min) et une de 102 µm de diamètre interne, adaptée pour les débits plus importants (5-1000 µL/min).

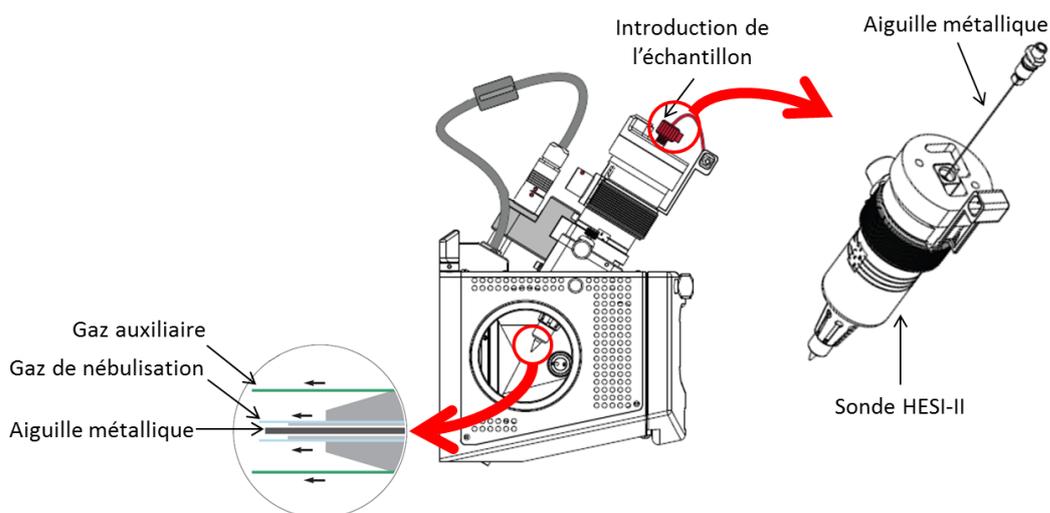


Figure 66 : Sonde HESI-II™ (Thermo Fischer Scientific).

L'échantillon est introduit sous forme liquide à l'extrémité d'une aiguille métallique. Une différence de potentiel est appliquée entre l'extrémité opposée de cette aiguille et l'interface avec l'analyseur du spectromètre de masse, provoquant la formation d'un cône de Taylor et de gouttelettes chargées. La formation de ces gouttelettes est stabilisée par un flux de gaz de nébulisation enveloppant l'aiguille métallique. La désolvatation des gouttelettes est assistée par un flux de gaz auxiliaire chauffé, coaxial à l'aiguille métallique et plus éloigné par rapport au flux de gaz de nébulisation.

Le TSQ Vantage™ est un spectromètre de masse de type ESI-QqQ (source electrospray, analyseur triple quadripôle). Il se distingue de la génération précédente de triple quadripôle Thermo Fischer Scientific (TSQ Quantum™) par l'interface de transfert des ions entre la source et l'analyseur. La lentille *tube lens* et le skimmer sont remplacés par une série de lentilles désaxées appelée *S-lens* et une dernière lentille appelée *Exit-lens* (Figure 67). Le capillaire de transfert est court avec un diamètre large ce qui permet de transférer un maximum d'ions. La sortie du capillaire de transfert est désaxée par rapport aux lentilles *S-lens*, ce qui permet de piéger les molécules neutres et les molécules de solvant qui encrassent le système et risquent de diminuer la sensibilité. De plus, l'utilisation d'un bloc de lentilles espacées, plutôt qu'une lentille continue, permet d'améliorer l'efficacité de pompage des molécules de solvant résiduelle dans le faisceau d'ions. L'ensemble des lentilles *S-lens* permet de focaliser les ions chargés positivement jusqu'à la lentille *Exit-lens*. Les ions sont ensuite transférés vers un ensemble d'un quadripôle plat (Q00, similaire à une lentille) d'une lentille (L0) et d'un quadripôle court (Q0). L'ensemble du tube de transfert, de la lentille L0 et des deux quadripôles Q00 et Q0 permet de focaliser et transférer les ions vers le quadripôle Q1. Entre chaque quadripôle (Q0, Q1, Q2 et Q3), les ions sont focalisés à l'aide de lentilles (L11, L12, L21, L22, L23, L31, L32 et L33). Enfin, à la sortie du quadripôle Q3, les ions frappent une dynode de conversion et les électrons résultants sont transférés vers un multiplicateur d'électrons.

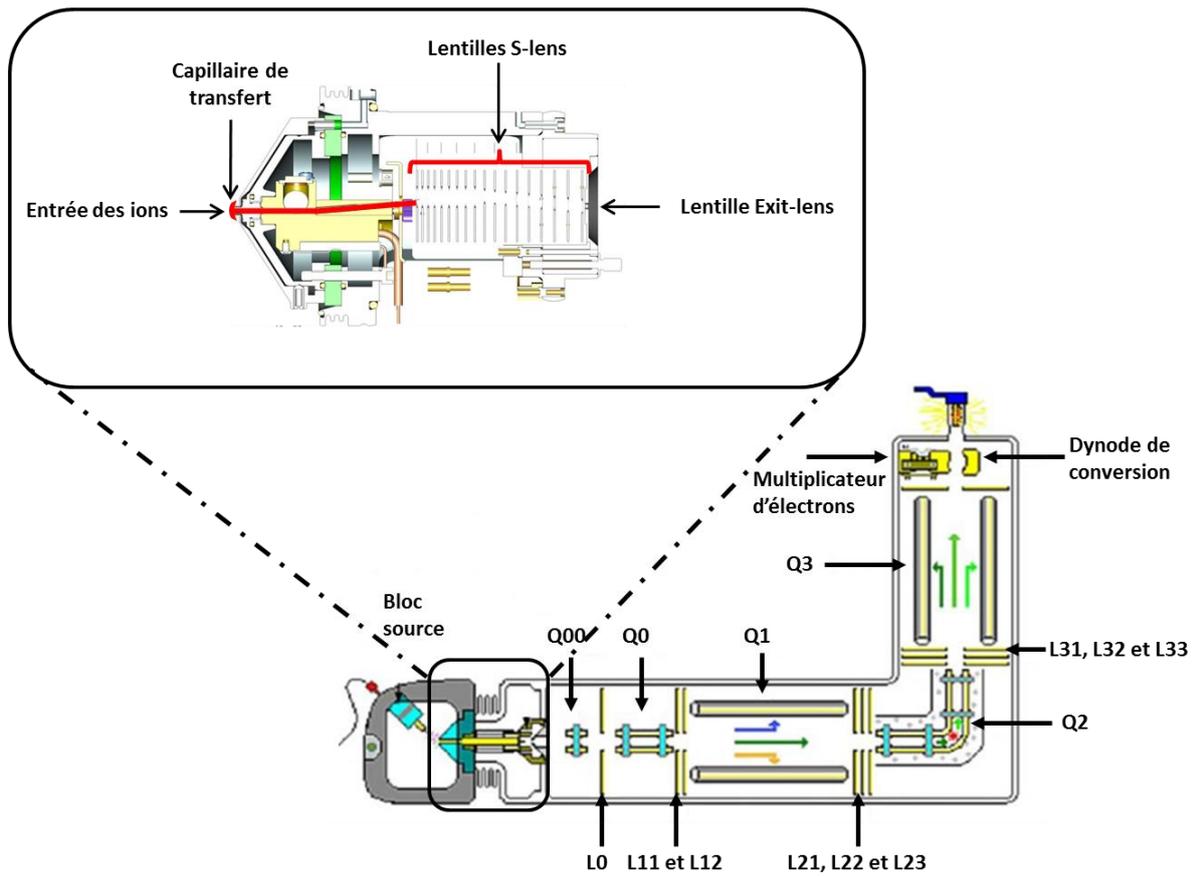


Figure 67 : Schéma du spectromètre de masse TSQ Vantage™ (Thermo Fischer Scientific).

Adapté de Thermo Fischer Scientific. Les ions entrent dans la source par l'interface HESI-II™, sont transférés vers l'analyseur par l'intermédiaire d'un capillaire de transfert, d'un bloc de lentilles *S-lens* et *Exit-lens*, d'un quadripôle Q00, d'une lentille L0, d'un quadripôle Q0 et de deux lentilles L11 et L12. L'analyseur est composé de trois quadripôles, Q1, Q2 et Q3. Entre ces quadripôles les ions sont focalisés à l'aide des lentilles L21, L22, L23, L31, L32 et L33. En sortie de Q3, les ions sont convertis en électrons par la dynode de conversion et les électrons sont transférés vers un multiplicateur d'électrons.

V- Evaluation des performances du système

Lors de l'installation, il a été nécessaire de procéder à des optimisations du système et de tester ses limites de performances. Pour cela nous avons commencé par évaluer la répétabilité des temps de rétention des peptides. Ce paramètre est particulièrement important si on souhaite réaliser des analyses en mode *scheduled* SRM. Dans un second temps, nous avons étudié la sensibilité du système puis l'influence de deux paramètres de l'analyseur (temps de scan, résolution).

L'ensemble des évaluations de performances a été réalisé sur un digestat tryptique de BSA. Afin de s'affranchir de la possible perte de matériel sur les parois des tubes lors de la préparation des échantillons de faibles concentrations, le digestat de BSA a été mélangé avec un échantillon plus complexe : un digestat de levures *Saccharomyces cerevisiae*. Ceci permet également de mimer un échantillon complexe comme le seront les échantillons biologiques par la suite.

A/ Evaluation de la répétabilité du système

La répétabilité a été évaluée par des injections successives en LC-SRM d'un digestat de BSA et de levures. Vingt-six peptides tryptiques de la BSA ont été choisis à partir de données obtenues en LC-MS/MS, et quatre transitions par peptide, dont le rapport m/z du fragment monochargé est supérieur à celui du précurseur doublement chargé, ont été sélectionnées (Tableau 17). Pour le peptide 5, seules trois transitions satisfaisant la condition sur le rapport m/z ont pu être sélectionnées. Un total de 103 transitions a donc été suivi en mode *scheduled* SRM et l'étude de la répétabilité a porté sur le temps de rétention et la somme des aires des transitions pour chacun des peptides. L'étude sur les temps de rétention permet de tester les conditions chromatographiques et celle sur l'aire des pics permet de tester l'injection et la stabilité du signal MS. Les critères de validation pour la détection d'un peptide ont été les suivants : observation d'un minimum de trois transitions co-éluées et absence d'ambiguïté avec un pic interférent. Les peptides ne remplissant pas ces critères n'ont pas été pris en compte pour les calculs de répétabilité.

Peptide (séquence)	m/z précurseur	m/z fragments	Peptide (séquence)	m/z précurseur	m/z fragments
<u>1</u> (DDSPDLPK)	443,7	771,4	<u>11</u> (HPEYAVSVLLR)	642,4	1 049,6
		656,4			920,5
		569,3			757,5
		472,3			686,4
<u>2</u> (AEFVEVTK)	461,7	851,4	<u>12</u> (ECCDKP LLEK)	646,3	1 162,5
		722,4			1 002,5
		575,3			842,5
		476,3			727,5
<u>3</u> (DLGEEHFK)	487,7	859,4	<u>13</u> (HLVDEPQNLIK)	653,4	1 055,6
		746,3			956,5
		689,3			841,5
		560,3			712,4
<u>4</u> (QTALVELLK)	507,8	886,6	<u>14</u> (TVMENFVAFV DK)	708,3	1 215,6
		785,5			1 068,5
		714,5			939,5
		601,4			825,4
<u>5</u> (NECF LSHK)	517,7	920,4	<u>15</u> (SLHTLFGDELCK)	710,4	1 082,5
		791,4			981,5
		631,3			868,4
					721,3
<u>6</u> (QNCDQFEK)	534,7	940,4	<u>16</u> (YICDNQDTISSK)	722,3	1 167,5
		826,3			1 007,5
		666,3			892,4
		551,3			778,4
<u>7</u> (SHCIAEVEK)	536,8	985,5	<u>17</u> (TCVADESHAGCEK)	732,3	1 103,4
		848,4			1 032,4
		688,4			917,4
		575,3			788,3
<u>8</u> (EACFAVEGPK)	554,3	978,5	<u>18</u> (LGEYGFQNALIVR)	740,4	1 180,6
		907,4			1 017,6
		747,4			960,6
		600,3			813,5
<u>9</u> (CCTESLVNR)	569,8	978,5	<u>19</u> (ETYGDMADCCCK)	747,8	1 101,4
		818,4			1 044,3
		717,4			929,3
		588,3			782,3
<u>10</u> (LVNELTEFAK)	582,3	951,5	<u>20</u> (EYEATLEECCA K)	751,8	1 081,5
		837,4			1 010,4
		708,4			909,4
		595,3			796,3

Peptide (séquence)	m/z précurseur	m/z fragments	Peptide (séquence)	m/z précurseur	m/z fragments
<u>21</u> (VPQVSTPTLVEVSR)	756,4	1 088,6	<u>24</u> (YNGVFQECQAEDK)	874,4	1 314,5
		1 001,6			1 167,4
		900,5			1 039,4
		803,5			910,3
<u>22</u> (DDPHACYSTVFDK)	777,8	1 227,5	<u>25</u> (ECCHGDLLECADDR)	875,3	1 163,5
		1 090,5			1 106,5
		1 019,4			991,4
		859,4			878,4
<u>23</u> (LKPDPTLTCDEFK)	788,9	1 123,5	<u>26</u> (LFTFHADICTLPDTEK)	954,5	1 262,6
		1 026,4			1 191,5
		912,4			1 076,5
		811,4			963,4

Tableau 17 : Listes des transitions suivies pour la BSA.

Vingt-six peptides tryptiques (1 à 26) doublement chargés ont été sélectionnés pour un total de 103 transitions.

Une première étude sur huit injections successives de digestat de 10 fmol de BSA et 0,9 µg de levures a été réalisée en mode *scheduled* SRM. L'analyse des temps de rétention a montré des variations élevées pour certains peptides, avec des écarts moyens de 20 à 30 secondes entre les temps de rétention maximum et minimum observés sur la totalité des injections. Dans le cas du peptide 24, cette variation a atteint 72 secondes. Ces variations élevées de temps de rétention ont été confirmées à plusieurs reprises et dans différentes conditions (échantillon, quantité injectée). Il était inacceptable d'observer de telles variations en chromatographie liquide, d'autant plus que nous voulions travailler en mode *scheduled* SRM, c'est-à-dire définir des fenêtres de temps restreintes pour l'acquisition des transitions. Ce mode implique non seulement la connaissance du temps de rétention de chacun des peptides, mais également la stabilité de ces temps de rétention entre plusieurs analyses afin qu'ils ne sortent pas de la fenêtre de temps définie.

Nous avons dans un premier temps incriminé la colonne en place. En effet, ayant eu auparavant des problèmes de robustesse avec certaines colonnes Dionex, nous pensions être confrontés au même problème. Nous avons alors comparé les résultats obtenus avec deux colonnes Dionex (Dionex Acclaim PepMap100 C18, 300 µm x 15 cm, 3 µm) et une colonne Agilent (Agilent Zorbax SB-C18, 300 µm x 15 cm, 3,5 µm). Les tests ont été réalisés avec ou sans étape de pré-concentration. Les résultats obtenus étaient comparables. Le problème de répétabilité des temps de rétention ne venait donc pas de la colonne ou de la pré-colonne. Par ailleurs, une augmentation de la rapidité du gradient nous a permis d'améliorer légèrement les coefficients de variation des temps de rétention. Cette

observation nous a donc orientés vers un problème d'application du gradient pour de faibles pentes de gradient.

Ce problème de gradient mal délivré peut s'expliquer par différents dysfonctionnements au niveau de la pompe : la chambre de mélange, la tête de pompe ou le restricteur de débit. De très nombreux tests ont été effectués et c'est finalement le remplacement du restricteur de débit qui a permis d'obtenir une bonne stabilité en temps de rétention entre les analyses en mode *full scan* MS.

Une nouvelle étude de répétabilité en mode *scheduled* SRM a donc été réalisée avec 23 injections successives de digestat de 100 fmol de BSA et 0,9 µg de levures. Le Tableau 18 regroupe l'ensemble des résultats pour chaque peptide. Nous pouvons observer que sur les 26 peptides ciblés, seuls 22 ont été détectés sans ambiguïté. Deux peptides n'ont pas été détectés (peptide 6 et 17) et les traces SRM des deux derniers peptides (peptide 5 et 19) présentaient des pics interférents ne nous permettant pas de valider le temps de rétention (Figure 68). La non détection du peptide 6 a été attribuée à l'influence de la complexité du mélange (digestat de levures) et sera discutée à nouveau par la suite. Nous pouvons observer que, pour les peptides détectés, les coefficients de variation en temps de rétention entre les 23 injections sont inférieurs à 0,5 % et que la variation maximale observée est de 0,18 min (11 sec) pour le peptide 12. Ces résultats prouvent la nette amélioration apportée par le changement de restricteur de débit. Pour la somme des aires des transitions, les coefficients de variation sont inférieurs à 20 % pour l'ensemble des peptides. La majorité des peptides (20/22 détectés et validés) ont un coefficient inférieur à 10 %. Le seuil habituellement rencontré en LC-SRM est ≤ 20 % (Whiteaker *et al.*, 2011 ; Percy *et al.*, 2013).

La Figure 69 montre, à titre d'exemple, les résultats obtenus pour le peptide 10 sur un ensemble de dix injections. Nous pouvons observer que le temps de rétention de ce peptide est stable (variation entre 18,89 et 18,93 min et CV = 0,1 %), et que la somme des aires des transitions varie entre $4,6 \cdot 10^6$ et $4,9 \cdot 10^6$ (CV = 4,1 %).

Peptide	Séquence	Peptide (m/z)	Tr moyen (min)	Variation max Tr (min)	CV % Tr	Aire moyenne des transitions	CV % aire
<u>1</u>	DDSPDLPK	443,7	10,1	0,08	0,2	717 166	6,0
<u>2</u>	AEFVEVTK	461,7	12,1	0,06	0,1	4 153 735	4,2
<u>3</u>	DLGEEHFK	487,7	9,9	0,14	0,3	366 266	11,4
<u>4</u>	QTALVELLK	507,8	21,1	0,09	0,1	1 091 984	3,9
<u>5</u>	NECFLSHK	517,7	Interf.	-	-	-	-
<u>6</u>	QNCDQFEK	534,7	nd	-	-	-	-
<u>7</u>	SHCIAEVEK	536,8	8,2	0,04	0,2	182 310	6,2
<u>8</u>	EACFAVEGPK	554,3	12,5	0,10	0,2	221 126	5,5
<u>9</u>	CCTESLVNR	569,8	9,6	0,10	0,3	1 120 589	4,4
<u>10</u>	LVNELTEFAK	582,3	18,9	0,06	0,1	4 963 790	4,1
<u>11</u>	HPEYAVSVLLR	642,4	18,1	0,13	0,2	72 409	19,5
<u>12</u>	ECCDKPILLEK	646,3	9,2	0,18	0,5	28 499	9,5
<u>13</u>	HLVDEPQNLIK	653,4	14,1	0,09	0,1	1 398 907	4,2
<u>14</u>	TVMENFVAFVDK	708,3	21,2	0,14	0,2	157 445	9,5
<u>15</u>	SLHTLFGDELCK	710,4	18,3	0,09	0,1	772 176	5,3
<u>16</u>	YICDNQDTISSK	722,3	9,7	0,09	0,3	892 310	6,0
<u>17</u>	TCVADESHAGCEK	732,3	nd	-	-	-	-
<u>18</u>	LGEYGFQNALIVR	740,4	22,6	0,08	0,1	1 372 479	4,5
<u>19</u>	ETYGDMADCCEK	747,8	Interf.	-	-	-	-
<u>20</u>	EYEATLEECCA K	751,8	11,4	0,09	0,2	1 323 112	3,8
<u>21</u>	VPQVSTPTLVEVSR	756,4	17,9	0,07	0,1	70 073	5,6
<u>22</u>	DDPHACYSTVFDK	777,8	13,8	0,09	0,2	223 007	4,5
<u>23</u>	LKPDPN TLCDEFK	788,9	15,6	0,10	0,2	200 525	4,1
<u>24</u>	YNGVFQECQAEDK	874,4	12,6	0,08	0,2	482 532	4,6
<u>25</u>	ECCHGDLLECADDR	875,3	11,6	0,11	0,3	72 784	9,9
<u>26</u>	LFTFHADICTLPDTEK	954,5	21,2	0,09	0,1	26 290	7,4

Tableau 18 : Répétabilité du système LC-SRM U 3000/ TSQ Vantage™ sur un digestat de BSA.

23 injections successives de digestat de 100 fmol de BSA et 0,9 µg de levures ont été réalisées. 26 peptides ont été suivis au cours du temps. Pour chaque peptide, la somme des aires des transitions et le temps de rétention (Tr) ont été moyennés sur les 23 injections. Dans chaque cas, le coefficient de variation (CV %) a été calculé. Pour le temps de rétention, la variation maximal (différence entre le temps de rétention le plus grand et le plus petit) a été déterminée. nd = non détecté. Interf. : peptide présentant des interférences.

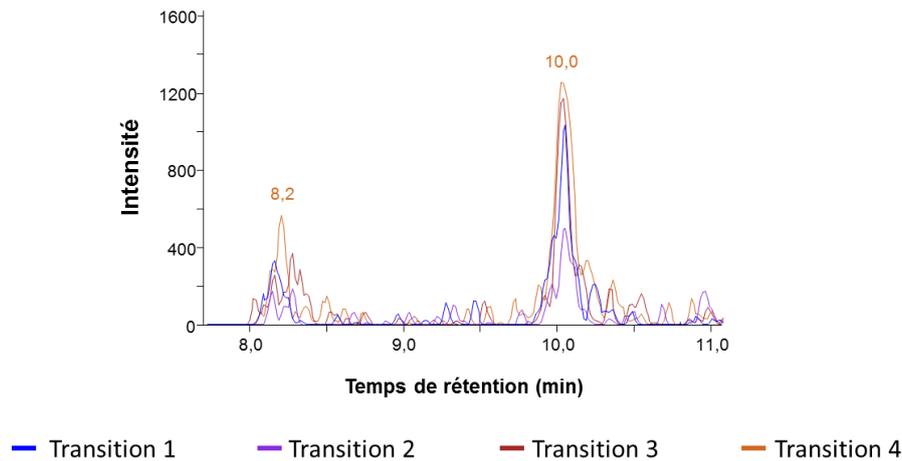


Figure 68 : Interférence observée pour le peptide 19, ETYGDMDACEK.

Les traces SRM des quatre transitions suivies pour ce peptide après injection d'un digestat de 100 fmol de BSA et 0,9 µg de levures sont présentées (747,8/1 101,4, 747,8/1 044,3, 747,8/929,3, 747,8/782,3 = transition 1, 2, 3, 4, respectivement). Ces traces présentent deux pics à 8,2 min et 10,0 min où l'ensemble des quatre transitions sont co-éluées.

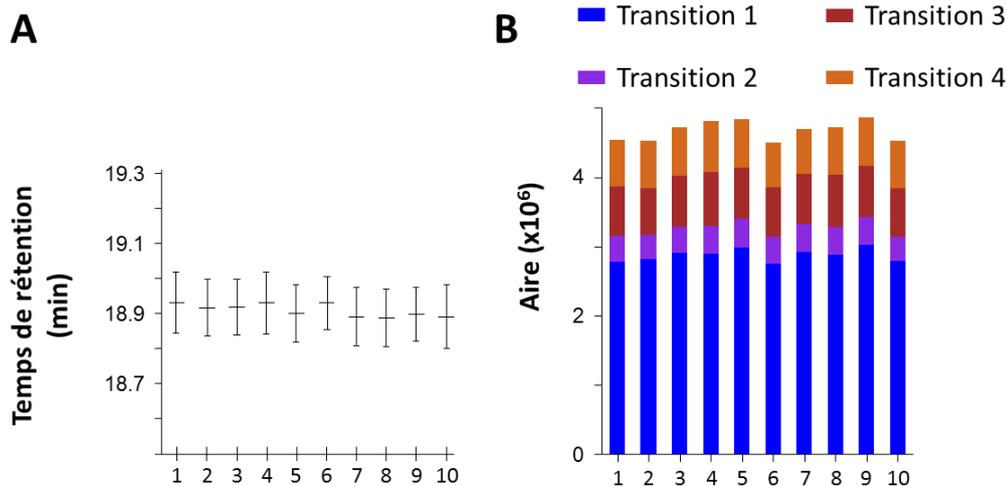


Figure 69 : Répétabilité du temps de rétention et de la somme des aires des transitions du peptide LVNELTEFAK.

Dix injections d'un digestat de 100 fmol de BSA et 0,9 µg de levures sont présentées. Quatre transitions ont été suivies pour ce peptide (582,3/951,5, 582,3/837,4, 582,3/708,4, 582,3/595,3 = transition 1, 2, 3, 4, respectivement). (A) : Temps de rétention obtenus pour chacune des injections. Les barres horizontales représentent les temps au sommet du pic de la transition la plus intense. Les barres verticales représentent l'écart type des temps de rétention des quatre transitions du peptide. (B) : Sommes des aires des transitions pour chacune des injections. La contribution de chaque transition est indiquée par le code couleur dans chaque barre de l'historgramme.

Les résultats obtenus ont montré que le système utilisé était répétable en temps de rétention (répétabilité du système chromatographique) et en quantité de signal détecté (répétabilité de l'injecteur et du signal en spectrométrie de masse).

B/ Evaluation de la sensibilité du système

La sensibilité du couplage LC-SRM a été évaluée grâce à l'injection d'un digestat de BSA en quantité croissante de 100 amol jusqu'à 500 fmol. Comme précédemment, pour prévenir d'une possible perte de matériel sur les parois des tubes et pour mimer un échantillon complexe, le digestat de BSA a été mélangé avec un digestat de levures *S. cerevisiae*. Trois solutions de digestat de BSA et de levures ont été préparées à différentes concentrations en BSA (100 fmol/ μ L, 10 fmol/ μ L et 1 fmol/ μ L) et à concentration constante en levures (0,9 μ g/ μ L). Différents volumes de ces solutions ont été injectés de manière à couvrir la gamme spécifiée (Tableau 19). Comme lors de l'étude de répétabilité, 103 transitions correspondant à 26 peptides tryptiques de BSA ont été suivies au cours du temps. De la même façon, nous avons observé que les traces SRM des peptides 19 et 5 présentaient des interférences et le peptide 6 n'a pas été détecté. L'évaluation de la sensibilité a été réalisée à partir des 23 autres peptides.

Concentration BSA (fmol/ μ L)	Volume injecté (μ L)	Quantité de digestat de BSA injectée (fmol)	Quantité de digestat de levure injectée (μ g)
100	5	500	4,50
	2,5	250	2,25
	1	100	0,90
	0,75	75	0,67
	0,5	50	0,45
10	2,5	25	2,25
	1	10	0,90
	0,75	7,5	0,67
	0,5	5	0,45
1	2,5	2,5	2,25
	1	1	0,90
	0,75	0,75	0,67
	0,5	0,5	0,45
	0,25	0,25	0,22
	0,1	0,1	0,09

Tableau 19 : Quantités de BSA et de levures injectées lors de l'étude de sensibilité.

Différents volumes des solutions mères à 100, 10 ou 1 fmol/ μ L de digestat de BSA + levures ont été injectés. Les quantités de digestat de BSA et de digestat de levures correspondantes sont indiquées.

La Figure 70 montre que la majorité des peptides ont été détectés jusqu'à une quantité de 5 fmol de digestat de BSA injectée. Nous avons ainsi montré que la limite de détection obtenue pour la majorité des peptides était de 5 fmol et que, pour certains peptides, elle pouvait être abaissée à 100 amol (peptide 10 et 18).

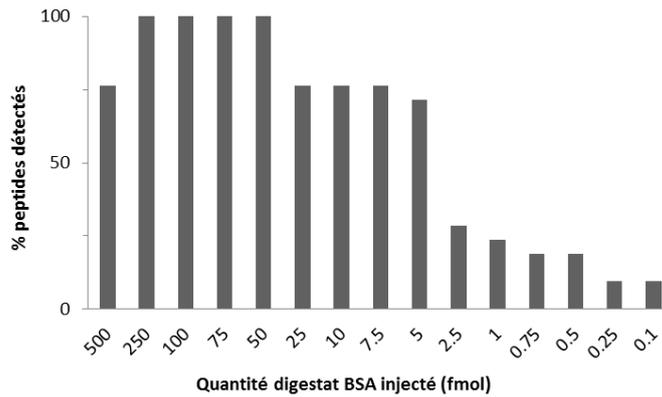


Figure 70 : Evaluation de la sensibilité du système LC-SRM.

Le pourcentage de peptides détectés relatif au nombre maximum de peptides détectés et validés est présenté en fonction de la quantité de digestat de BSA injectée.

Nous pouvons remarquer sur la Figure 70 que 75 % des peptides seulement ont été détectés pour 500 fmol injectées alors que 100 % le sont pour les concentrations suivantes. Ceci a été expliqué par une influence du volume d'injection et plus particulièrement de la quantité de matrice (digestat de levures) qui a été injectée. Comme l'indique le Tableau 19, la même solution mère a été utilisée pour les premières quantités injectées (500 fmol à 50 fmol), mais les volumes d'injection étaient différents. Une quantité différente de matrice a donc été injectée dans chaque cas et peut avoir une influence sur la détection des peptides de BSA. En effet, nous pouvons observer sur la Figure 71 que la forte quantité de digestat de levure injectée dans le premier cas (500 fmol BSA, 4,5 µg de levures) provoque une saturation de la colonne qui a pour conséquence de diminuer légèrement les temps de rétention, notamment pour les peptides hydrophobes élués tardivement. Les analyses ayant été réalisées en mode *scheduled*, le peptide 15 a été élué en dehors de la fenêtre de temps d'acquisition spécifiée. Pour les injections à 250 fmol de BSA / 2,25 µg de levures et 50 fmol de BSA / 0,45 µg de levures, le temps de rétention est plus élevé et se situe dans la fenêtre d'acquisition. Cette observation montre l'importance de la matrice des échantillons sur le comportement d'un peptide. Il est alors primordial, lors d'une phase d'optimisation, de travailler dans des conditions mimant au maximum les conditions des échantillons biologiques à analyser.

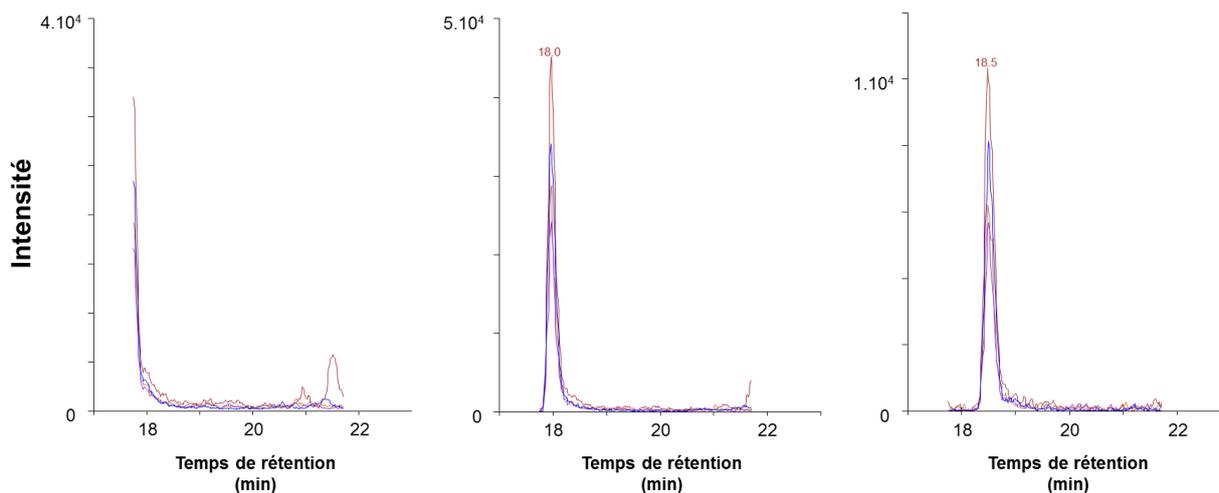


Figure 71 : Influence de la matrice sur le temps de rétention du peptide 15.

Les traces chromatographiques des quatre transitions du peptide 15 sont présentées pour des quantités de digestat de BSA injectées de 500 fmol, 250 fmol et 50 fmol.

C/ Optimisation des paramètres du spectromètre de masse

Temps de scan

Nous avons vu précédemment (partie II) que les analyses par LC-SRM sont limitées par le nombre de transitions suivies au cours du temps, limitant ainsi le nombre de peptides et de protéines ciblés. Cette limitation est principalement due au fait que plus le nombre de transitions est élevé, plus le temps passé à scanner l'ensemble des transitions (temps de cycle) est grand et ainsi plus la fréquence de mesure d'une transition donnée est petite. Les pics chromatographiques obtenus sont alors caractérisés par un nombre moins important de points. Or, dans une optique de quantification ces pics doivent être définis par au moins 8 à 10 points. Le temps de cycle est défini par le produit du nombre de transitions et du temps passé pour réaliser la mesure d'une transition (temps de scan). Afin d'obtenir un temps de cycle plus faible, le temps de scan peut être diminué. Cependant, un temps de scan trop faible affecte le signal obtenu, induisant ainsi une forte perte de sensibilité.

Afin de déterminer le temps de scan optimal pour le TSQ VantageTM, nous avons réalisé une étude de l'influence de ce paramètre sur le signal obtenu (somme de l'aire des transitions) pour deux injections. Les résultats obtenus pour des valeurs de 5, 10, 15 et 20 ms de temps de scan sont présentés sur la Figure 72. Entre 10, 15 et 20 ms de temps de scan, les variations sur le signal sont inférieures à 25 %. Pour un temps de scan de 5 ms, la perte de signal, par rapport à la valeur maximale obtenue, varie entre 36 % (peptide 10) et 65 % (peptide 7) selon les peptides.

D'après Gallien *et al.*, le temps de scan optimum est de l'ordre de 10 à 15 ms (Gallien *et al.*, 2011). Dans notre étude, nous avons montré que la variation en sensibilité obtenue entre 15 et 20 ms est faible : 5 % en moyenne. La perte obtenue est de 13 % en moyenne pour un temps de scan de 10 ms, et de 48 % pour 5 ms. Pour notre système, la valeur minimale du temps de scan a été établie à 10 ms.

Si le nombre de transitions suivies n'est pas trop élevé, il n'est pas nécessaire de se placer à la limite minimale du temps de scan, un temps de scan de 20 ms reste raisonnable. En effet, plus la fréquence de scan est importante, plus la qualité du résultat va dépendre de la stabilité du spray.

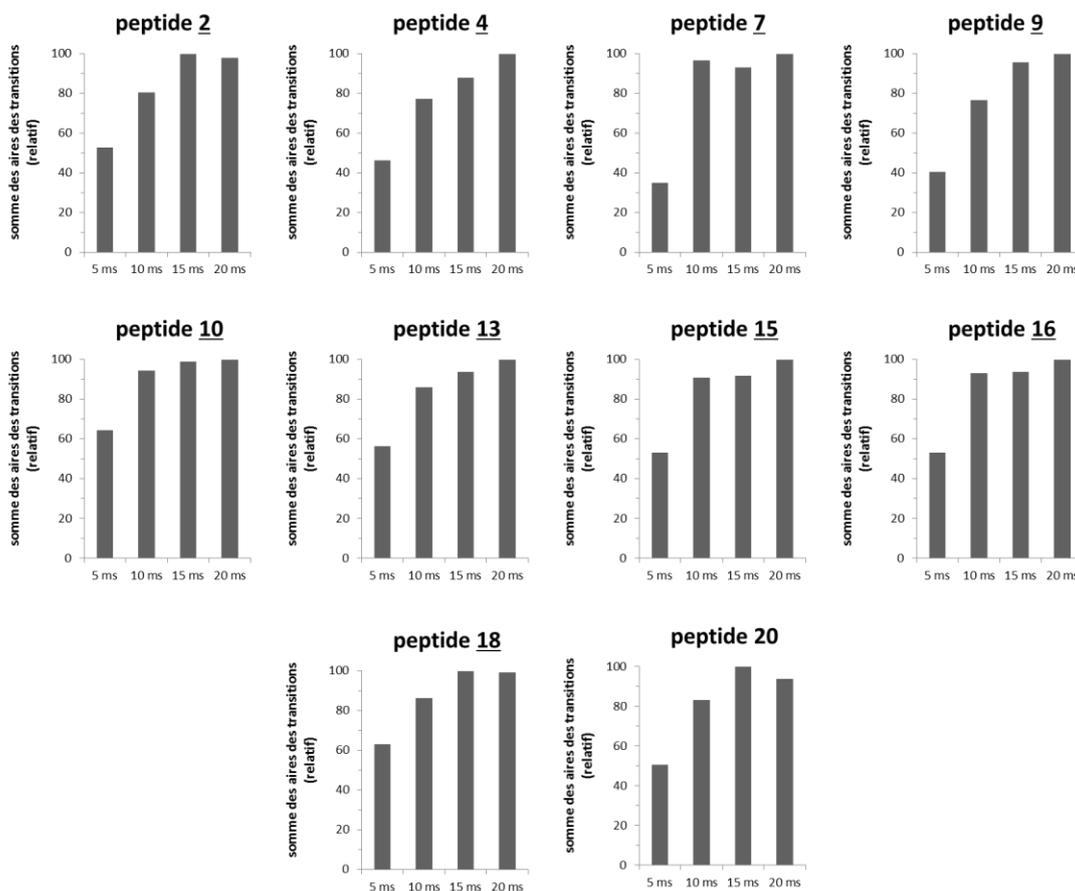


Figure 72 : Influence du temps de scan sur le signal.

La somme des aires des transitions (moyenne sur deux injections) des peptides tryptiques [2](#), [4](#), [7](#), [9](#), [10](#), [13](#), [15](#), [16](#), [18](#), [20](#) de la BSA a été comparée pour différentes valeurs de temps de scan : 5, 10, 15 et 20 ms. Les données sont présentées en pourcentage relatif par rapport à la somme des aires des transitions maximale observée.

Résolution

Comme nous l'avons vu, le quadripôle peut agir comme filtre de masse en ne sélectionnant qu'un seul ion. Nous avons également mentionné que ces analyseurs présentaient une résolution limitée. Lors d'analyse par LC-SRM d'un mélange complexe, il peut s'avérer nécessaire de limiter les interférences au maximum afin de ne pas apporter de biais dans la détection et la quantification des peptides précurseurs. Ceci se traduit par une augmentation de la résolution en ajustant le rapport de la tension continue sur l'amplitude de la tension alternative (U/V).

Sur le TSQ Vantage™, la résolution des quadripôles est fixée par la largeur de pic des ions à mi-hauteur (FWHM, *Full Width at Half Maximum*). Pour augmenter la résolution cette largeur doit être diminuée. En effet, plus cette largeur est petite, plus la gamme en m/z de molécules traversant le quadripôle sera restreinte, et donc plus le signal détecté sera spécifique. Cependant, la diminution de

la FWHM diminue également la sensibilité. Les résolutions des deux quadripôles peuvent être fixées indépendamment l'une de l'autre. Dans le mode utilisé pour l'édition des méthodes LC-SRM, seule la résolution du quadripôle Q1 peut être réglée, celle de Q3 est fixée à 0,70 Da. Nous avons donc évalué l'influence d'une diminution de la FWHM (0,7 Da, 0,4 Da, 0,2 Da) au niveau de Q1 sur la sensibilité du signal de 10 peptides tryptiques de la BSA. Les résultats obtenus sont consignés sur la Figure 73. La meilleure sensibilité, déterminée par la somme de l'aire des transitions, est obtenue pour une largeur à mi-hauteur de 0,4 Da ou 0,7 Da. En moyenne, sur l'ensemble des peptides suivis, la variation obtenue entre une FWHM de 0,7 Da et 0,4 Da est de 11 %. Cette variation est beaucoup plus importante pour une FWHM de 0,2 Da, avec une perte moyenne de sensibilité de 43 % par rapport à la sensibilité maximale observée. Comme la perte de sensibilité est faible pour une valeur de FWHM de 0,4 Da par rapport à 0,7 Da et que la spécificité est meilleure pour une valeur de 0,4 Da, cette valeur semble être un bon compromis entre sensibilité et spécificité et a donc été sélectionnée pour la suite de l'étude.

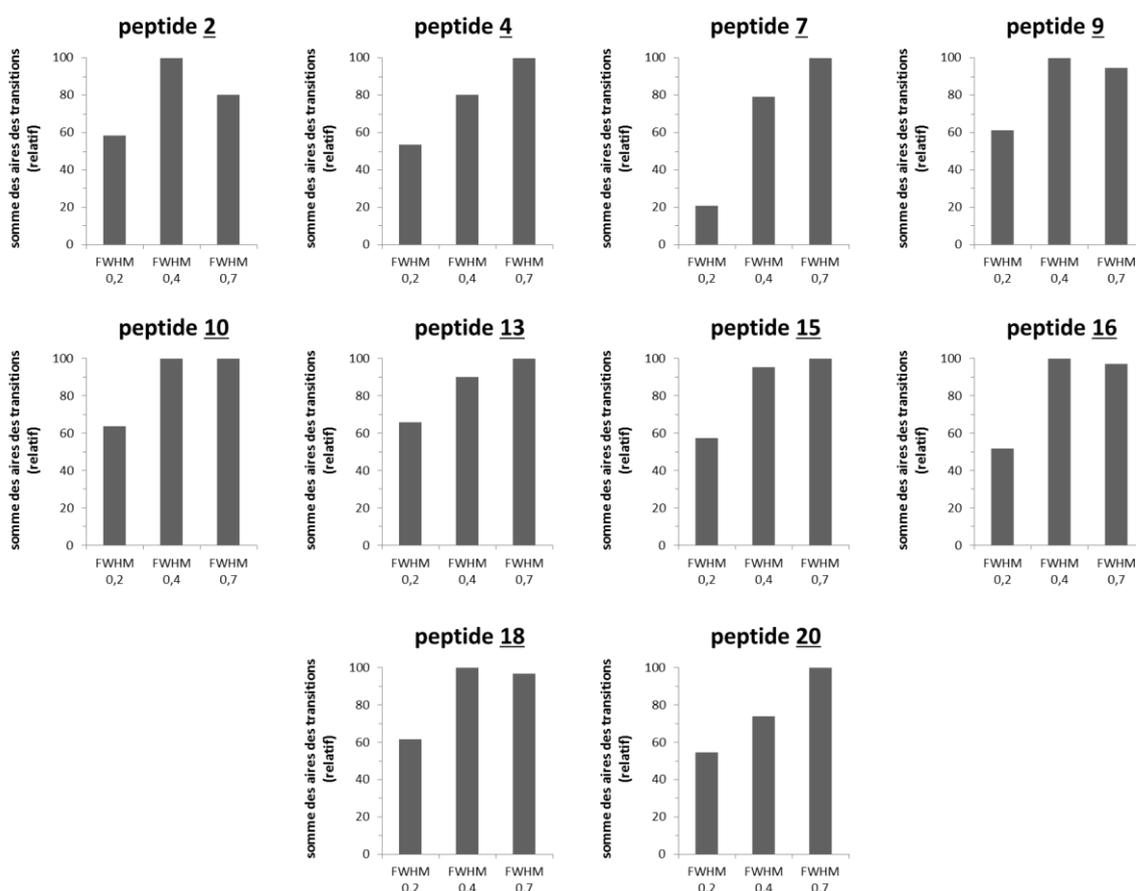


Figure 73 : Influence de la résolution sur le signal.

La somme des aires des transitions (moyenne sur deux injections) des peptides tryptiques [2](#), [4](#), [7](#), [9](#), [10](#), [13](#), [15](#), [16](#), [18](#), [20](#) de la BSA a été comparée entre les différentes valeurs de largeur à mi-hauteur : 0,2 Da, 0,4 Da et 0,7 Da. Les données sont présentées en pourcentage relatif par rapport à la somme des aires des transitions maximale observée.

D/ Robustesse du système

Six mois après l'acquisition du couplage U 3000/ TSQ Vantage™, nous avons été confrontés à un problème de perte de sensibilité. Cette perte de sensibilité a été attribuée à un encrassement des lentilles *S-lens* et *Exit-lens*, que nous avons jugé normal après six mois avec des injections plus fréquentes d'échantillons complexes dans les derniers mois. Malgré ces nettoyages, le problème de perte de sensibilité réapparaissait à une fréquence mensuelle. Un nettoyage jusqu'au quadripôle Q00, la lentille L0 et le quadripôle Q0 n'a pas permis d'améliorer le problème. Au fur et à mesure, ces cycles de nettoyage et de perte de sensibilité sont devenus de plus en plus fréquents jusqu'à atteindre une période de quatre jours.

Dans un premier temps nous avons imputé l'augmentation de fréquence de perte de sensibilité à un possible endommagement (micro-rayures) des lentilles *S-lens* et *Exit-lens* dû aux nombreux nettoyages pouvant provoquer des effets de charge. En effet, le changement de ces lentilles a permis de retrouver une fréquence de 20 à 30 jours. Cependant, nous n'avons jamais retrouvé les conditions de l'installation nous ayant permis de réaliser des analyses pendant six mois sans observer de perte de sensibilité.

Après de nombreux tests, il a finalement été proposé que le problème puisse être causé par l'utilisation de la sonde electrospray HESI-II™. Cette sonde a été développée pour améliorer la stabilité du spray pour des débits de solvant élevés par rapport à la sonde Thermo Fischer Scientific de première génération H-ESI. Malgré l'utilisation de l'aiguille métallique de 76 µm de diamètre interne, adaptée pour un débit de 5 µL/min, nous avons observé une instabilité de spray, plus particulièrement visible lorsque la proportion d'eau est élevée. Cette instabilité a pour conséquence de former des gouttelettes liquides à l'extrémité de l'aiguille métallique qui peuvent directement être injectées dans le spectromètre de masse et provoquer un encrassement important de l'ensemble des optiques du fait de la forte présence de solvant. Cependant, un retour vers la sonde H-ESI n'a pas permis d'obtenir d'amélioration en termes de fréquence de nettoyage. Des améliorations sont actuellement en cours pour résoudre le problème.

VI- Extraction des protéines de biopsies cutanées

Avant d'entreprendre l'étude de la détection de protéines de *Borrelia* par LC-SRM, nous avons cherché à optimiser le protocole d'extraction des biopsies afin d'obtenir le meilleur rendement protéique. Ces optimisations ont été réalisées sur des biopsies de peau de souris « saines », c'est à dire non infectées par la bactérie *Borrelia*. Ces biopsies ont été calibrées à l'aide d'un emporte-pièce de diamètre 3 mm, soit directement après le prélèvement, soit juste avant l'extraction et ont été prélevées sur la totalité de l'épaisseur de la peau (environ 0,5 mm).

A/ Optimisation de la nature du tampon

Les critères importants dans le choix du tampon sont un bon rendement d'extraction protéique et une compatibilité avec la suite de la stratégie analytique. Dans le cas présent, nous envisagions après l'extraction une précipitation des protéines puis une digestion trypsique en milieu liquide et une analyse du digestat par LC-SRM.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une extraction dans un tampon classique d'électrophorèse bidimensionnelle (7 M urée, 2 M thiourée, 4 % (p/v) CHAPS, 20 mM Tris, pH 8), couramment utilisé au laboratoire, et que nous avons considéré comme un tampon de référence permettant d'obtenir une extraction efficace des protéines. La quantité de protéines extraites avec ce tampon a été estimée à **150 µg / biopsie** et constitue donc notre valeur de référence (Tableau 20). Toutefois, ce tampon n'est pas compatible avec la suite de notre stratégie (dénaturation de la trypsine par les fortes concentrations d'urée et de thiourée) et nous avons envisagé d'autres conditions d'extraction.

La plupart des études décrites dans la littérature traitant de biopsie de peau, murine ou humaine, ont mis en œuvre des stratégies par gel d'électrophorèse (Gromov *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2003 ; Hannigan *et al.*, 2007) et utilisent donc des tampons incompatibles avec la digestion par la trypsine. D'autres s'intéressent à des composés particuliers, comme les glycanes (Maccari *et al.*, 2008) ou des composé volatiles (Abaffy *et al.*, 2010), et procèdent à des étapes de délipidation dans le premier cas ou d'extraction sur phase solide dans le deuxième cas. Ces protocoles ne nous ont donc pas apporté d'indication pour notre stratégie d'extraction.

Parmi les tampons salins les plus utilisés dans la littérature pour l'extraction de protéine à partir de cellules ou de tissu, nous retrouvons le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris), l'hydrogénocarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) et l'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) (Ahmed, 2004). Le chlorure de sodium (NaCl) est également beaucoup utilisé pour aider la solubilisation des protéines par effet *salting in* (Voet *et al.*, 2005). Afin d'évaluer la faisabilité de l'extraction de protéines cutanées à l'aide d'un tampon salin, nous avons réalisé une extraction dans un tampon 150 mM NaCl, 1,9 mM NaH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , 1 % Triton-X-100, pH 7,8 (Gao *et al.*,

2010). Ce tampon a permis d'obtenir une quantité de **160 µg** de protéines par biopsie (Tableau 20), mais présente des inconvénients pour une analyse ultérieure par ESI-MS en raison de la présence de sels non volatils. Cet essai a néanmoins montré qu'un tampon salin permettait d'obtenir des résultats comparables au tampon d'électrophorèse bidimensionnelle.

Tampon	Méthode de dosage	Quantité protéines extraites par biopsie (µg)
7 M urée, 2 M thiourée, 4 % (p/v) CHAPS, 20 mM Tris, pH 8	Bradford	150
150 mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 % Triton-X-100, pH 7,8	Lowry	160
10 mM NaCl, 10 mM NH ₄ HCO ₃ , 1 % Triton-X-100, pH 8,2	Lowry	155
10 mM NaCl, 10 mM NH ₄ HCO ₃ , 1 % octyl β-D-glucopyranoside, pH 8,2	Lowry	155
10 mM NaCl, 10 mM NH ₄ HCO ₃ , 0,5 % octyl β-D-glucopyranoside, pH 8,2	Lowry	90
10 mM NaCl, 10 mM NH ₄ HCO ₃ , 0,1 % octyl β-D-glucopyranoside, pH 8,2	Lowry	100

Tableau 20 : Optimisation du tampon d'extraction des protéines à partir de biopsies cutanées.

Une biopsie de peau de souris calibrée à l'emporte-pièce (Ø 3 mm) a été broyée mécaniquement à 4°C dans un micro-potter avec 100 µL de tampon et la solution a subi un cycle de sonication de 1 min (5'' en marche / 5'' au repos). Après extraction, les protéines ont été précipitées à l'acétone. Puis le culot a été repris dans le même tampon et les protéines ont été dosées par la méthode indiquée (Bio-Rad *Protein Assay* = méthode de Bradford, Bio-Rad DC assay = méthode de Lowry).

Les rendements en µg de protéines extraites par biopsie sont indiqués pour chaque tampon.

Sur la base des résultats précédents, nous avons décidé de remplacer le phosphate de sodium par de l'hydrogénocarbonate d'ammonium volatil (10 mM NH₄HCO₃), et de diminuer la concentration en NaCl (10 mM) afin de limiter au maximum la formation d'adduits. Nous avons également étudié l'influence du détergent en comparant le Triton-X-100 et l'octyl β-D-glucopyranoside (Figure 74). Les deux tampons ainsi testés (10 mM NaCl, 10 mM NH₄HCO₃, 1 % Triton-X-100 pH 8,2 et 10 mM NaCl, 10 mM NH₄HCO₃, 1 % octyl β-D-glucopyranoside pH 8,2) ont permis d'obtenir une quantité de **155 µg** de protéines extraites par biopsie (Tableau 20). Le tampon contenant 1% d'octyl β-D-glucopyranoside a alors été retenu pour la suite de notre étude car il permet d'extraire une quantité équivalente de protéines et interfère moins en spectrométrie de masse (Zhang *et al.*, 2004).

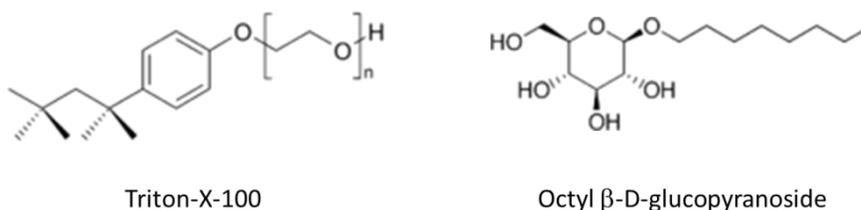


Figure 74 : Structures des détergents utilisés : Triton-X-100 et octyl β -D-glucopyranoside

Enfin, nous avons testé ce même tampon avec des concentrations plus faibles en détergent : 0,1 % et 0,5 %, mais les rendements protéiques ont été beaucoup plus faibles qu'avec 1 % d'octyl β -D-glucopyranoside (Tableau 20).

Lors de ces optimisations, une étape de précipitation par l'acétone des protéines a été réalisée. La présence d'acétone dénature les protéines, et leurs groupements hydrophobes ont tendance à s'agréger. Cette étape a généralement pour but de purifier l'extrait en protéines en éliminant l'ADN, l'ARN et éventuellement des molécules organiques. Cependant, cette étape peut faire perdre des protéines, soit en ne les précipitant pas, soit en ne réussissant pas à les resolubiliser. Nous avons alors évalué l'impact de cette étape dans notre cas. Pour cela, un dosage de protéines a été réalisé avant et après précipitation sur un extrait de biopsie dans le tampon contenant 1 % d'octyl β -D-glucopyranoside. Nous avons alors observé que cette étape induisait une perte de 37 % des protéines (non montré). Ainsi, nous avons décidé d'éliminer cette étape pour la suite de notre étude et de mettre en œuvre une extraction sur phase solide avant l'injection.

B/ Optimisation du protocole d'extraction

Durant l'extraction des protéines, la biopsie de peau subit d'abord une étape de broyage dans le tampon puis un cycle de sonication. Deux méthodes de broyage et deux durées de sonication ont été testées.

Pour la comparaison des méthodes de broyage, la méthode manuelle (broyage dans micro-potter en verre) a été comparée à une méthode de broyage automatisée à sec (Mikro-Dismembrator, Sartorius AG, Göttingen, Allemagne). Dans le premier cas, la biopsie est décongelée, maintenue à 4°C et broyée directement dans le tampon, dans le second, elle reste congelée (atmosphère à température de l'azote liquide) et elle est rapidement broyée à sec par une bille métallique. L'avantage principal du broyage par bille est l'obtention d'une fine poudre permettant une surface de contact plus grande avec le tampon d'extraction. Pour la comparaison des cycles de sonication, un cycle court (1 min avec alternance de 5 secondes d'ultrasons et 5 secondes de repos) a été confronté à un cycle long (4 min avec alternance de 5 secondes d'ultrasons et 5 secondes de repos). Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 21 ci-dessous.

Méthode de broyage	Durée du cycle de sonication (min)	Masse de biopsie (mg)	Quantité de protéines extraites (μg)	Rendement (μg de protéines / mg de biopsie)
Manuel	1	3,8	179	42-51
Automatique	1	3,8	148	39
Manuel	4	4,0	236	59

Tableau 21 : Optimisation du broyage et de la sonication.

Une biopsie de peau de souris calibrée à l'emporte-pièce (\varnothing 3 mm) a été broyée dans un micro-potter avec du tampon (manuel) ou par bille à sec (automatique). 1 ou 4 min d'ultrason (5'' en marche / 5'' au repos) ont été appliquée(s). Les protéines ont été dosées par la méthode Bio-Rad DC assay.

Nous pouvons observer que les deux conditions de broyage ont conduit au même rendement. Pour la sonication, le rendement obtenu avec un cycle long est sensiblement meilleur. Les conditions finales retenues pour l'extraction des protéines ont été le broyage manuel et un cycle long de sonication.

C/ Conclusion

L'ensemble des optimisations réalisées pour l'extraction des protéines d'une biopsie cutanée a permis de retenir les conditions finales suivantes :

- un broyage manuel, à 4°C, dans un tampon contenant 10 mM NaCl, 10 mM NH_4HCO_3 , 1 % octyl β -D-glucopyranoside, à pH 8,2
- un cycle de sonication de 4 min à 4°C avec alternance de 5 secondes d'ultrasons et 5 secondes de repos.

Dans ces conditions, la quantité de protéines extraites est d'environ 240 μg pour une biopsie de diamètre interne 3 mm.

VII- Développement de méthode pour la détection d'OspC par LC-SRM

A/ Choix de la stratégie de détection, de quantification et de traitement des données

Pour la détection et la quantification par LC-SRM de protéines de *Borrelia* dans des biopsies cutanées, nous avons opté pour une stratégie SID-SRM, couplant l'utilisation d'isotopes stables des molécules d'intérêt et l'analyse par spectrométrie de masse SRM. Cette stratégie tire avantage de la sensibilité et de la spécificité de la détection par SRM, mais aussi de la précision de la quantification apportée par l'utilisation d'un standard marqué d'isotopes stables (lourd) identique à la molécule cible endogène (léger). Nous avons plus particulièrement choisi d'utiliser des standards peptidiques : peptides AQUA™ (Sigma-Aldrich) et peptides PEPotec™ (Thermo Fischer Scientific).

La construction des méthodes utilisées pour l'acquisition des données SRM, et l'ensemble des traitements de données ont été réalisés à l'aide du logiciel Skyline (MacLean *et al.*, 2010a). Ce logiciel libre a été développé dans le laboratoire de M. MacCoss (*Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle*). Lors de la création de méthode, l'utilisateur a le choix d'importer dans le logiciel la liste des protéines d'intérêt ou directement la liste des transitions déjà sélectionnées. Dans le premier cas, le logiciel réalise une digestion *in silico* des protéines, prenant en compte le type d'enzyme et la présence ou non de site d'omission de coupure, et détermine les listes théoriques de l'ensemble des peptides et de leurs transitions. L'utilisateur a ensuite le choix de sélectionner manuellement parmi ces listes les peptides et les transitions, ou d'appliquer des filtres qui vont les réduire automatiquement. Ces filtres peuvent, par exemple, porter sur la longueur des peptides, l'absence d'acides aminés particuliers dans la séquence du peptide, la charge du précurseur et des fragments, le type de fragment (ions *b*, *y*,...) le nombre de fragments ou encore le rapport *m/z* des fragments. Il est également possible d'importer une bibliothèque de spectres dans le logiciel afin d'aider le choix des peptides et des transitions. Lorsque la liste des transitions est définie, Skyline permet d'exporter directement la méthode SRM des instruments suivants : 6460 (Agilent Technologies), QTRAP®4000 et QTRAP® 5500 (Applied Biosystems), Xevo® (Waters), TSQ Vantage™ et TSQ Quantum Ultra™ (Thermo Fischer Scientific).

B/ Choix de la protéine cible

Le choix des protéines cibles lors d'une stratégie LC-SRM, est essentiellement dirigé par la problématique biologique.

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, lors de l'infection d'un hôte mammifère, la bactérie *Borrelia* module l'expression de ses protéines de surface. Une diminution de l'expression de la protéine OspA et une surexpression de la **protéine OspC** sont notamment observées (Schwan *et al.*, 2000). Nos collaborateurs ont également montré que l'expression du gène *OspC* présentait un pic d'induction cinq jours après l'inoculation intradermique à la seringue d'une culture de *B. burgdorferi* ss (Kern, 2011). La protéine OspC semblait donc un bon candidat pour mettre au point notre approche de détection de protéines de *Borrelia* au sein de biopsies cutanées.

De nombreuses études ont porté sur le rôle d'OspC lors de la transmission de la bactérie (Grimm *et al.*, 2004 ; Tilly *et al.*, 2006), son influence sur la virulence de différentes espèces de *Borrelia* (Qiu, 2008), et son interaction avec la protéine de tique Salp15 (Ramamoorthi *et al.*, 2005b ; Hovius *et al.*, 2008a). Les études sur la structure primaire de la protéine ont montré qu'OspC est une protéine hautement variable au sein du genre *Borrelia* (Wang *et al.*, 1999b). La diversité du gène codant cette protéine est soulignée par l'existence d'une vingtaine de groupes majeurs d'allèles au sein même de l'espèce *B. burgdorferi* ss (Seinost *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1999b ; Brisson *et al.*, 2004). L'utilisation de cette protéine en tant que candidat de diagnostic ou vaccinal doit donc tenir compte de ce polymorphisme. A titre d'exemple, la Figure 75 montre l'alignement de séquence de la protéine OspC chez les souches 297, B31 et N40 de *B. burgdorferi* ss. Seul 69 % de la séquence d'OspC est identique entre les trois souches et 23 % des acides aminés ne sont partagés que par deux souches.

Protéine 1 = OspC 297, gi|410683498 Protéine 2 = OspC B31, gi|2689901 Protéine 3 = OspC N40, gi|434658

```

Protéine 1  MKKNTLSAILMTLFLFISCNNSGKDGNTSANSADSVKGPNLTEISKKITESNAVVLAVKEIETLLASIDELATK
Protéine 2  MKKNTLSAILMTLFLFISCNNSGKDGNTSANSADSVKGPNLTEISKKITDSNAVLLAVKEVEALLSSIDEIAAK
Protéine 3  MKKNTLSAILMTLFLFISCNNSGKDGNAANSADSVKGPNLTEISKKITESNAVVLAVKEVETLLASIDELATK

Protéine 1  AIGKKIQNGGLAVEAGHNGTLLAGAYTISKLIQKLDGLKNSKLLKEKTIENAKKCEDFTKKLEGEHAQLGIEN
Protéine 2  AIGKKIHQNNGLDTENNHNGSLLAGAYAISTLIKQKLDGLKN-EGLKEKIDAAKCCSETFTNKLKEKHTDLGKEG
Protéine 3  AIGKKIG-NNGLEANQSKNTSLLSGAYAISDLIAEKLNVLKN-EELKEKIDTAKQCSTEFNKLKSEHAVLGLDN

Protéine 1  VTDENAKKAILITDAAKDKGAAELEKLFKAVENLAKAAKEMLANSVKELTSPIVAESPKNP
Protéine 2  VTDADAKEAILKTNGTKTGAEELGKLFESVEVLSKAAKEMLANSVKELTSPVVAESPCKP
Protéine 3  LTDDNAQRAILKKHANKDKGAAELEKLFKAVENLSKAAQDTLKNVAVKELTSPIVAESPCKP

```

Figure 75 : Alignement de séquence de la protéine OspC de trois souches de *B. burgdorferi* ss (297, B31 et N40).

Les acides aminés en noir sont partagés par les trois séquences. Les acides aminés en rouge sont partagés par deux séquences. Les acides aminés en bleu ne sont pas partagés. Les peptides tryptiques partagés par les trois souches sont encadrés.

Les études sur les structures secondaires, tertiaires et quaternaires ont montré que, quelle que soit la structure primaire, celles-ci étaient conservées (Eicken *et al.*, 2001 ; Kumaran *et al.*, 2001). La protéine OspC forme un homodimère qui présente la forme active de la molécule (Kumaran *et al.*, 2001).

C/ Choix des peptides

Lors d'une stratégie par LC-SRM, il est important de choisir un ensemble de peptides protéotypiques représentant de façon optimale la protéine d'intérêt. Il était donc important de choisir des peptides d'OspC **communs** aux différentes souches de la bactérie afin d'obtenir, d'une part un point de comparaison en terme de quantification entre des biopsies infectées par différentes espèces et/ou souches de *Borrelia*, et d'autre part une méthode applicable à chaque cas de patients. Il était également intéressant de choisir des peptides **spécifiques** afin d'évaluer la faisabilité de la discrimination de plusieurs espèces et/ou souches par LC-SRM. L'identification de l'espèce et/ou de la souche responsable de l'infection peut être capitale car de nombreuses études ont montré que les différentes souches peuvent avoir une virulence différente et peuvent être à l'origine de différentes manifestations cliniques (Wang *et al.*, 1999a ; Qiu, 2008 ; Chan *et al.*, 2012a). Cette information permettrait d'aider la compréhension du mécanisme d'infection propre à chaque souche, en comparant les différences d'expression d'OspC. En terme de diagnostic, ceci pourrait permettre d'adapter le traitement de la maladie en fonction de l'espèce pathogène.

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 75, très peu de peptides tryptiques sont communs aux trois souches présentées. Le seul peptide potentiellement utilisable en SRM est le peptide **GPNLTEISK**. En effet, les autres peptides sont soit trop courts (moins de quatre acides aminés), et ont peu de chance d'être spécifiques, soit particulièrement long et hydrophobe (21 acides aminés dont L, I, A, F, G), pouvant ainsi s'agréger lors de la préparation d'échantillon ou ne pas être totalement élué de la colonne lors de la chromatographie. Après comparaison avec l'ensemble des 13 souches de *B. burgdorferi* ss qui ont fait l'objet de l'étude de séquençage de Schutzer *et al.* (Schutzer *et al.*, 2011) et de la souche B31 séquencée auparavant, il s'est avéré que le peptide GPNLTEISK était commun à 10 souches, dont les plus étudiées et utilisées dans la littérature (N40, B31, JD1, 156a, 297). Ce peptide sera appelé peptide commun dans la suite. Nous pouvons néanmoins remarquer que ce peptide commun présente l'inconvénient de présenter un site potentiel d'omission de coupure par la trypsine car la lysine terminale est directement suivie par une autre lysine. Dans une optique de quantification ceci devra être pris en considération afin de ne pas biaiser les résultats : les deux peptides avec et sans omission de coupure doivent être suivis.

Pour le choix des peptides d'intérêt, nous nous trouvons dans le cas idéal où nous disposons de la protéine recombinante purifiée de la souche B31. Nous avons donc pu réaliser des manipulations préliminaires de spectrométrie de masse en tandem pour aider notre choix et vérifier la détection et la fragmentation des peptides. Les analyses nanoLC-MS/MS, réalisées sur un piège à ions (amaZon, Bruker Daltonics), après digestion *in gel* et en milieu liquide ont permis d'identifier **26** peptides tryptiques, correspondant à **82 %** de recouvrement de séquence pour la protéine OspC de souche B31. Le premier critère de sélection a porté sur le nombre d'acides aminés dans la séquence peptidique : les peptides de moins de 8 et de plus de 16 acides aminés ont été éliminés. Ceci a permis de réduire la liste à 19 peptides. Cette liste a ensuite été réduite avec l'analyse des spectres de fragmentation obtenus. Cette analyse a permis de sélectionner le peptide commun aux différentes

souches de *Borrelia*, avec ou sans omission de coupure (GPNLTEISK et GPNLTEISKK), un peptide partagé par les souches B31 et 297 (DGNTSANSADSVK) et quatre peptides spécifiques de la souche B31 (KITDSNAVLLAVK, ITDSNAVLLAVK, EVEALLSSIDEIAAK et EGVTDADAK). Nous pouvons constater que, comme pour le peptide commun, un de ces peptides possède un site potentiel d'omission de coupure (ITDSNAVLLAVK et KITDSNAVLLAVK). Ce choix a été guidé par la qualité du spectre de fragmentation de ce peptide. Les peptides spécifiques de la souche N40 et/ou de la souche 297 correspondant aux peptides sélectionnés pour la souche B31 ont également été sélectionnés (DGNASANSADSVK, EVETLLASIDELATK, EIETLLASIDELATK, ELTSPIVAESPK, KITESNAVVLAVK, ITESNAVVLAVK). Les 13 peptides sélectionnés pour la protéine OspC sont regroupés dans le Tableau 22.

Peptides sélectionnés	Souches de <i>B. burgdorferi</i> ss
GPNLTEISK	B31, 297, N40
GPNLTEISKK	B31, 297, N40
DGNTSANSADSVK	B31, 297
KITESNAVVLAVK	297, N40
ITESNAVVLAVK	297, N40
EVEALLSSIDEIAAK	B31
KITDSNAVLLAVK	B31
ITDSNAVLLAVK	B31
EGVTDADAK	B31
DGNASANSADSVK	N40
EVETLLASIDELATK	N40
EIETLLASIDELATK	297
ELTSPIVAESPK	297

Tableau 22 : Peptides tryptiques sélectionnés pour la détection d'OspC par LC-SRM.
L'appartenance du peptide aux différentes souches de *B. burgdorferi* ss est indiquée.

Les 13 peptides sélectionnés ont été recherchés dans les différents protéomes des organismes impliqués dans notre problématique (souris, homme, tique *Ixodes*, bactérie *Borrelia*) afin de confirmer leur unicité à la protéine OspC. Ils ont tous été validés comme peptides protéotypiques d'OspC.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, nous avons opté pour le couplage de l'analyse SRM avec la dilution d'isotopes stables pour la détection et la quantification de la protéine d'intérêt. Cette approche implique l'utilisation des peptides sélectionnés marqués. Différentes qualités de ces peptides standards marqués sont disponibles commercialement. Pour le peptide commun GPNLTEISK, que nous avons le plus de chance de détecter dans les extraits de biopsies de peau, nous avons choisi d'utiliser un peptide standard marqué AQUA™ (Sigma-Aldrich) de grande pureté (98 % vérifiée par HPLC-MS) et quantifié précisément (dosage d'acide aminé, AAA). Ce peptide est livré

lyophilisé. Pour les autres peptides, nous avons préféré l'utilisation de peptides standards marqués PEPotec™ (Thermo Fischer Scientific), livrés en solution, dont la quantité est déterminée plus approximativement. Les peptides marqués sont marqués d'un astérisque *.

D/ Choix des transitions et validation

Sur l'ensemble des peptides précurseurs choisis, nous avons tout d'abord utilisé le logiciel Skyline pour définir l'ensemble des transitions répondant aux conditions suivantes :

- Sélection d'au moins trois transitions par peptide,
- Sélection des fragments γ monochargés correspondant aux ions précurseurs dichargés et dont le rapport m/z est supérieur au rapport m/z du précurseur.

Afin de prévoir le comportement de ces transitions et de ne sélectionner que celles observables en spectrométrie de masse, cette liste théorique a été affinée d'une part avec l'analyse des spectres de fragmentation MS/MS, obtenus lors de l'étude préliminaire de nanoLC-MS/MS (sur piège à ions), et d'autre part avec l'analyse des spectres obtenus après infusion des peptides standards marqués sur le TSQ Vantage™. L'infusion des peptides sur le triple quadripôle permet d'appréhender le comportement de la fragmentation par rapport au piège à ions. La liste affinée est présentée dans le Tableau 23.

Comme cette liste de transitions a été éditée à partir de critères théoriques, de critères expérimentaux propre à la détection des transitions sur un instrument de type piège à ions (nanoLC-MS/MS) ou ne prenant pas en compte la séparation chromatographique d'un mélange de peptide (infusion MS), il a été nécessaire de procéder à une vérification de la détection des peptides dans les conditions de l'analyse par LC-SRM sur notre couplage avec un mélange des peptides standards marqués. Cette analyse nous a permis de vérifier si l'ensemble des transitions sélectionnées étaient détectées et si nous observions une bonne co-élution de l'ensemble des transitions pour un même peptide. Cette analyse a également permis de déterminer le temps de rétention de chaque peptide nécessaire à l'élaboration de la méthode en mode *scheduled SRM*. Nous pouvons observer que certaines transitions n'ont pas été détectées en LC-SRM et n'ont donc pas été validées (Tableau 23). Pour le peptide commun, par exemple, seules trois transitions ont été détectées (483,8/812,5, 483,8/698,4, 483,8/585,3), avec co-élution des pics correspondants à ces transitions. La dernière transition (483,8/909,5) a été supprimée car aucun signal n'était observé. Nous pouvons également remarquer que quatre peptides n'ont pas été détectés en LC-SRM. Dans le cas du peptide EGVTDADAK*, seules deux transitions étaient intenses lors de l'infusion de ce peptide sur le triple quadripôle, les autres étant présentes mais faibles. Pour les peptides DGNTSANSADSVK* et DGNASANSADSVK*, l'ensemble des cinq transitions sélectionnées étaient observées en infusion. En LC-SRM, aucune de ces transitions n'a été détectée. Une augmentation de la quantité injectée sur la colonne n'a pas permis d'améliorer la détection. Cette non-détection a été attribuée à un phénomène de suppression de signal dans les conditions d'analyse d'un mélange peptidique en LC-

SRM. Ces peptides ont été supprimés de la liste. Finalement, la liste s'est réduite à **dix peptides**, dont deux communs aux trois souches, deux communs aux souches N40 et 197, trois spécifiques de la souche B31, un spécifique de la souche N40 et deux spécifiques de la souche 297.

Cas particulier du peptide commun

Lors de la sélection des transitions du peptide commun marqué GPNLTEISK*, nous avons constaté que deux fragments de ce peptide étaient de masse proche : les ions monochargés *y7* et *b8* ont un rapport m/z de 812,46 et 812,41 respectivement. Avec la résolution de notre instrument, la distinction entre ces deux ions n'est pas envisageable. Le signal correspondant à la transition 483,8/812,4 correspond donc aux signaux des fragments *y7* et *b8* confondus. Dans le cas du peptide endogène, la transition correspondante 479,8/804,5 ne correspond qu'à l'ion *y7*, celle correspondant à l'ion *b8* étant 479,8/812,4. Pour la quantification absolue du peptide, cette transition ne peut pas être prise en compte. Cependant, elle peut être utilisée pour la validation de la détection et pour la quantification relative entre différents échantillons.

Précurseur (m/z, séquence)	m/z fragments	Détection LC-SRM	Précurseur (m/z, séquence)	m/z fragments	Détection LC-SRM
483,8 (GPNLTEISK*)	y8 : 909,5	N	798,4 (EVEALLSSIDEIAAK*)	y11 : 1 167,7	O
	y7 : 812,5	O		y10 : 1 054,6	O
	y6 : 698,4	O		y9 : 941,5	O
	y5 : 585,3	O		y8 : 854,5	O
547,8 (GPNLTEISK*)	y7 : 826,5	O	820,4 (EVETLLASIDELATK*)	y10 : 1 068,6	O
	y6 : 713,4	O		y9 : 955,5	O
	y5 : 612,4	O		y8 : 884,5	O
690,4 (KITESNAVVLAVK*)	y12 : 1 251,7	O	626,4 (ITESNAVVLAVK*)	y11 : 1 138,6	O
	y11 : 1 138,6	O		y10 : 1 037,6	O
	y10 : 1 037,6	O		y9 : 908,6	O
	y9 : 922,6	O		y8 : 821,5	O
	y8 : 835,5	O		y7 : 707,5	O
690,4 (KITDSNAVLLAVK*)	y7 : 721,5	O	626,4 (ITDSNAVLLAVK*)	y6 : 636,4	O
	y12 : 1 251,7	O		y11 : 1 138,6	O
	y11 : 1 138,6	O		y10 : 1 037,6	O
	y10 : 1 037,6	O		y9 : 922,6	O
	y9 : 908,6	O		y8 : 835,5	O
686,8 (DGNASANSADSVK*)	y8 : 821,5	O	701,8 (DGNTSANSADSVK*)	y7 : 721,5	O
	y7 : 707,5	O		y6 : 650,4	O
	y11 : 1 086,5	N		y11 : 1 116,5	N
	y10 : 1 015,5	N		y10 : 1 015,5	N
	y9 : 928,4	N		y9 : 928,4	N
457,2 (EGVTDADAK*)	y8 : 857,4	N	639,8 (ELTSPIVAESPK*)	y8 : 857,4	N
	y7 : 743,4	N		y7 : 743,4	N
	y8 : 784,4 ⁽¹⁾	N		y10 : 1 036,6	O
	y7 : 727,4 ⁽¹⁾	N		y9 : 935,5	O
827,4 (EIETLLASIDELATK*)	y6 : 628,3	N	827,4 (EIETLLASIDELATK*)	y8 : 848,5	O
	y5 : 527,2	N		y7 : 751,4	O
	y13 : 1 411,8	O			
	y12 : 1 282,7	O			
	y11 : 1 181,7	O			
	y10 : 1 068,6	O			

Tableau 23 : Transitions sélectionnées et validation par LC-SRM.

Les transitions choisies à partir des données préliminaires de LC-MS/MS sur les peptides endogènes et d'infusion des peptides standards marqués sont listées. Chaque transition a été validée (O) ou non (N) par injection d'un mélange des peptides standards en LC-SRM. Dix peptides ont été ainsi validés.

E/ Optimisation des transitions

Nous avons vu précédemment que l'optimisation de l'énergie de collision est nécessaire lorsqu'une sensibilité particulièrement élevée est désirée (Picotti *et al.*, 2012). Cependant, ceci peut être appliqué dans la mesure où les équations utilisées pour déterminer ces paramètres sont adaptées à la géométrie de l'instrument utilisé et au type de peptide précurseur (ions *b* ou *y*, peptides doublement ou triplement chargés). Comme le couplage utilisé lors de notre étude venait d'être installé et que nous n'avions pas encore de recul sur ces paramètres, nous avons réalisé une optimisation de l'énergie de collision sur huit des peptides standards marqués validés précédemment. Les deux derniers peptides ont été sélectionnés plus tardivement et n'ont pas été inclus dans cette étude. Ceci nous a permis d'attester l'exactitude des équations de corrélation entre l'énergie de collision et la masse du peptide précurseur données par le fournisseur et utilisées lors de la construction des méthodes par le logiciel Skyline. Pour le TSQ Vantage™, ces équations sont les suivantes :

$$z = 2^+ : CE = 0,03 \frac{m}{z} + 2,905$$

$$z = 3^+ : CE = 0,038 \frac{m}{z} + 2,281$$

où CE représente l'énergie de collision et m/z le ratio masse sur charge.

Pour l'ensemble des optimisations de l'énergie de collision menées sur les peptides standards marqués, quatre matrices ont été utilisées : l'eau et trois extraits indépendants de biopsies cutanées de souris. Trois réplicats d'injection ont été réalisés par matrice. Dans un premier temps, six énergies de collision supplémentaires ont été testées par rapport à la valeur par défaut (3 inférieures et 3 supérieures) avec un pas de **5 V** entre chaque énergie. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 24.

Pour une matrice, un réplicat d'injection et un peptide donnés, la somme des aires des transitions a été évaluée en fonction de l'énergie de collision appliquée. Le gain par rapport à la valeur d'énergie de collision par défaut a été calculé pour toutes les énergies de collision. Pour chaque peptide dans chaque matrice, l'énergie de collision donnant le gain maximal, en moyenne sur les trois réplicats d'injection, a été définie comme l'énergie de collision optimale.

Nous pouvons observer que, pour la majorité des peptides, l'énergie par défaut correspond à l'énergie optimale dans les quatre matrices. Pour les peptides montrant une énergie de collision optimale différente de la valeur par défaut, les résultats sont variables selon les matrices. Nous pouvons également noter que les peptides EVEALLSSIDEIAAK* et EVETLLASIDELATK* ont été détectés uniquement dans deux matrices d'extrait de biopsies de peau.

Peptides	CE Défaut	H ₂ O		Biopsie 1		Biopsie 2		Biopsie 3	
		CE opt.	Gain moy.	CE opt.	Gain moy.	CE opt.	Gain moy.	CE opt.	Gain moy.
GPNLTEISK*	17	17	-	17	-	17	-	17	-
GPNLTEISKK*	19	24	1,5	24	1,4	24	1,1	19	-
KITESNAVVLAVK*	24	29	1,2	24	-	24	-	24	-
ITESNAVVLAVK*	22	22	-	22	-	22	-	22	-
EVEALLSSIDEIAAK*	27	⁽¹⁾	-	⁽¹⁾	-	22	1,1	27	-
KITDSNAVLLAVK*	24	24	-	24	-	24	-	24	-
ITDSNAVLLAVK*	22	22	-	22	-	22	-	22	-
EVETLLASIDELATK*	27	⁽¹⁾	-	⁽¹⁾	-	22	1,2	22	1,4

Tableau 24 : Optimisation de l'énergie de collision par pas de 5 V.

L'optimisation a été réalisée dans différentes matrices : l'eau et trois extraits de biopsie cutanée de souris. Pour chaque peptide, l'énergie de collision par défaut, calculée à l'aide de la relation donnée par le fournisseur et l'énergie optimale, obtenue pour chaque matrice, sont indiquées en Volts. Lorsque l'énergie optimale et l'énergie par défaut sont différentes, le gain obtenu a été calculé. ⁽¹⁾ : Dans les conditions spécifiées, le peptide n'a pas été détecté.

Pour chaque matrice, l'énergie de collision optimale définie lors de cette première optimisation a été utilisée comme énergie de collision par défaut dans une seconde optimisation. Lors de cette seconde optimisation, six énergies de collision ont été testées par rapport à la valeur par défaut (3 inférieures et 3 supérieures) avec un pas de **2 V** entre chaque énergie. A cause d'un problème d'injecteur, les données obtenues pour la 3^{ème} biopsie n'ont pas pu être exploitées. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 25. Comme précédemment, pour la majorité des peptides, l'énergie de collision optimale correspond à l'énergie de collision par défaut.

Nous pouvons noter que les deux peptides qui avaient posé des problèmes de détection lors de l'optimisation précédente ont également posé problème ici : le peptide EVEALLSSIDEIAAK* n'a été détecté dans aucune des matrices et dans une moindre mesure, le peptide EVETLLASIDELATK* a également été difficilement détecté.

Une étude avec un pas de **1 V** entre les différentes énergies de collision n'a pas permis d'affiner plus les valeurs optimales d'énergie de collision (pas d'influence significative).

Peptides	CE défaut ⁽²⁾	H ₂ O		Biopsie 1		Biopsie 2	
		CE	Gain	CE	Gain	CE	Gain
		opt.	moy.	opt.	moy.	opt.	moy.
GPNLTEISK*	17	19	1,2	19	1,1	17	-
GPNLTEISKK*	24	24	-	22	1,1	22	1,2
KITESNAVVLAVK*	29 (H ₂ O) ou 24 (matrices)	27	1,3	26	1,1	24	-
	ITESNAVVLAVK*	22	22	-	22	-	22
EVEALLSSIDEIAAK*	27	(1)		(1)		(1)	
KITDSNAVLLAVK*	24	24	-	(1)		24	-
ITDSNAVLLAVK*	22	22	-	22	-	22	-
EVETLLASIDELATK*	27 ⁽³⁾	27	-	25	1,2	25	1,2

Tableau 25 : Optimisation de l'énergie de collision par pas de 2 V.

L'optimisation a été réalisée dans différentes matrices : l'eau et deux extraits de biopsie cutanée de souris. Pour chaque peptide, l'énergie de collision par défaut, calculée à l'aide de la fonction donnée par le fournisseur et l'énergie optimale, obtenue pour chaque matrice, sont indiquées en Volts. Lorsque l'énergie optimale et l'énergie par défaut sont différentes, le gain obtenu a été calculé. ⁽¹⁾ : Dans les conditions spécifiées, le peptide n'a pas été détecté. ⁽²⁾ : L'énergie de collision par défaut correspond à l'énergie optimale obtenue lors de l'étude d'optimisation précédente. ⁽³⁾ : la même valeur d'énergie de collision par défaut a été utilisé (27 V) en raison d'un problème de méthode.

L'ensemble de cette étude d'optimisation de l'énergie de collision pour la détection de peptides standards dans l'eau ou des extraits de biopsies cutanées a montré que lorsqu'un gain est obtenu avec une énergie de collision différente de l'énergie de référence (donnée par l'équation de corrélation), celui-ci est relativement faible (<1,5) corroborant ainsi les résultats obtenus dans différentes études (MacLean *et al.*, 2010b ; Picotti *et al.*, 2010 ; Holstein Sherwood *et al.*, 2011). Ce résultat, inclus dans une étude plus globale au sein du laboratoire, a permis de valider l'utilisation de l'équation de corrélation fournie par Thermo Fischer Scientific, puis de déterminer une équation ajustée à notre couplage U 3000/ TSQ Vantage™.

Nous avons également montré que le gain par rapport à l'énergie de collision par défaut était variable selon les matrices et que, dans certains cas, la détection du peptide était aléatoire selon les matrices. Ces deux observations soulignent l'influence de la matrice pour la détection des peptides. En effet, comme nous le détaillerons par la suite, la matrice peut avoir une influence sur l'ionisation des peptides dans la source et donc sur leur détection. Ceci implique que si une forte influence de la matrice est exercée sur l'ionisation (peptide plus ou moins bien détecté en fonction de la matrice) des différences sont potentiellement observées sur l'énergie de collision optimale (ce qui a été le cas pour les peptides GPNLTEISK*, GPNLTEISKK*, KITESNAVVLAVK* et EVETLLASIDELATK*) et que si le peptide n'est pas bien détecté, il est impossible de déterminer l'énergie de collision (ce qui a été le cas pour les peptides EVEALLSSIDEIAAK* et EVETLLASIDELATK*). Dans le cas de ces deux derniers peptides, nous avons également observé un caractère hydrophobe avec un temps de rétention élevé

et un effet mémoire lors d'injection de blanc. L'utilisation de ces peptides dans une perspective de quantification est alors à proscrire étant donné le caractère aléatoire de leur détection due à leur adsorption sur les parois des plaques d'injection ou des tubes de préparation, ou à leur élution incomplète lors de la chromatographie.

F/ Effet de matrice

Dans le paragraphe précédent, nous avons évoqué l'influence de la matrice sur la détection de certains peptides. Par exemple, le peptide EVEALLSSIDEIAAK*, a difficilement été détecté dans la matrice H₂O et l'a beaucoup plus aisément été dans deux matrices d'extraits de biopsies. D'autre part, nous avons également observé pour d'autres peptides une variation de l'intensité du signal en fonction de la matrice utilisée. Pour confirmer ces observations, nous avons réalisé une étude de l'influence de la matrice sur la détection des peptides standards marqués, où une quantité équivalente d'un mélange de peptides (100 fmol de chaque peptide) a été injectée dans l'eau et dans différentes dilutions d'un même extrait de biopsie cutanée (équivalent de 1/10, 1/100, 1/1 000 et 1/10 000 de la biopsie extraite). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 76 synthétisant la somme des aires des transitions de chaque peptide analysé.

Selon les peptides, l'effet dû à la matrice d'extrait de biopsie s'avère opposé. En effet, pour le peptide commun nous observons une suppression de signal dans l'extrait de biopsie le plus concentré (équivalent 1/10), avec une **perte de 97 %** d'intensité par rapport à la détection dans l'eau. Un signal comparable à celui obtenu dans l'eau est retrouvé dans la matrice diluée au 1/100^{ème}. Le peptide GPNLTEISKK* montre également une perte de signal dans la matrice la plus concentrée, mais plus faible que pour le peptide précédent (**50 %**). Au contraire, pour les peptides EVEALLSSIDEIAAK* et EVETLLASIDELATK*, nous observons un effet positif de la matrice la plus concentrée avec une **multiplication du signal par 47 et 443**, respectivement. Ce gain de signal est encore plus important pour la matrice diluée au 1/100^{ème} (97 fois et 596 fois, respectivement), mais chute rapidement pour les dilutions supérieures.

Les peptides ITDSNAVLLAVK* et ITESNAVVLAVK* montrent également un gain de signal pour la matrice d'extrait de biopsie cutanée. Ce gain est maximum pour la biopsie diluée au 1/1 000^{ème} pour le peptide ITDSNAVLLAVK (**facteur 2**) et pour la biopsie diluée au 1/10^{ème} pour le peptide ITESNAVVLAVK (**facteur 3**).

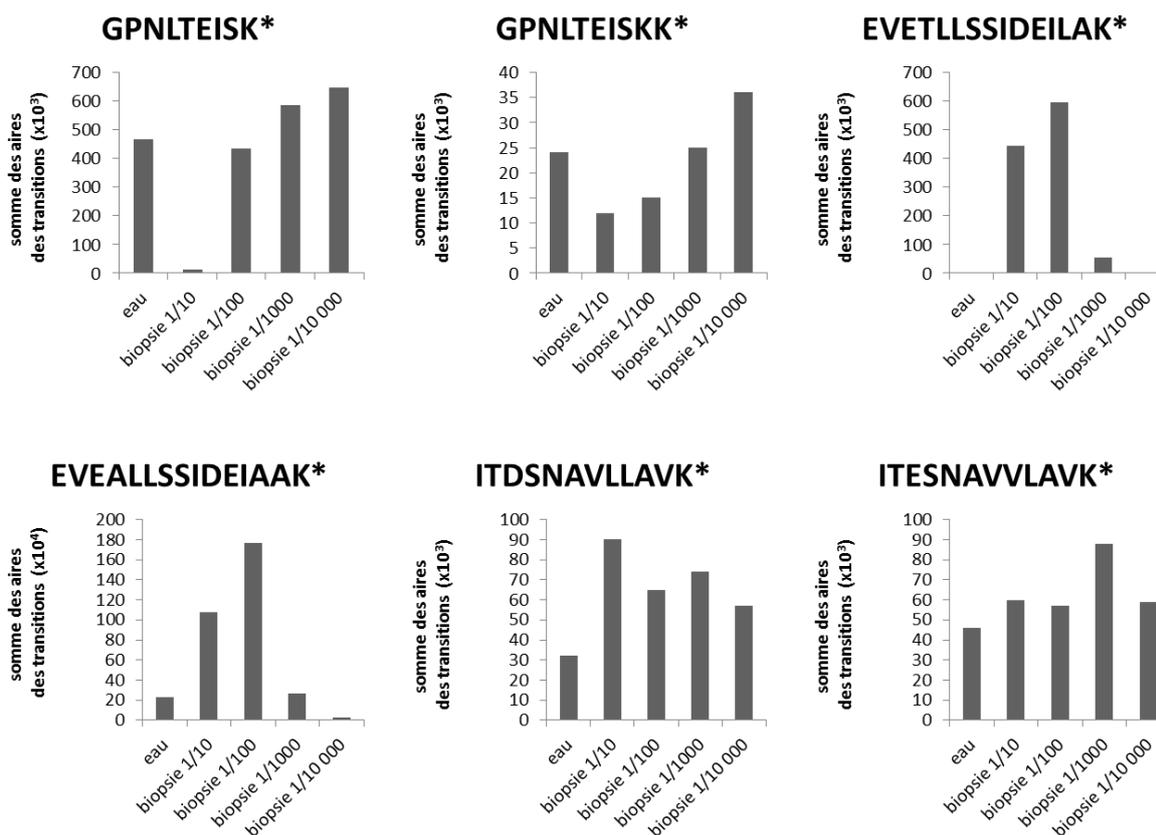


Figure 76 : Influence de la matrice sur le signal en LC-SRM.

Une même quantité de peptide standard marqué (100 fmol) a été injectée en LC-SRM dans différentes matrices : l'eau et un même extrait de biopsie cutanée de souris à différentes dilutions (équivalent de 1/10, 1/100, 1/1 000 et 1/10 000 de biopsie). La somme des aires des transitions de chaque peptide suivi est reportée pour chacune des matrices.

Nous constatons donc ici l'influence de la matrice sur la détection des peptides standards marqués. Cette influence peut être positive ou négative selon les cas. Cette expérience a été reproduite sur deux extraits indépendants de biopsies cutanées et des résultats identiques ont été obtenus. Nous avons alors recherché un compromis pour la dilution des extraits de biopsie permettant non seulement la détection des peptides standards marqués dans cette matrice mais également la détection des peptides endogènes correspondants dans des biopsies infectées. Pour la détection de ces peptides endogènes, nous ne pouvons pas diluer la matrice excessivement car nous perdriions toutes chances de pouvoir les détecter. Pour la majorité des peptides, la **biopsie diluée au 1/100^{ème}** présente un signal au moins équivalent à celui obtenu dans l'eau. Nous avons estimé la quantité de protéine injectée pour cette dilution à 1 µg. Nous avons donc établi le compromis à l'injection d'une quantité de protéine d'environ **1 µg**.

G/ Evaluation des performances de la méthode

Lors du développement d'une méthode de quantification par LC-SRM, il est important d'évaluer les performances de celles-ci, notamment la précision, la justesse et la gamme de linéarité. Il est également important de déterminer les limites basses de détection (LLOD, *lower limit of detection*) et de quantification (LLOQ, *lower limit of quantification*) des analytes.

Dans la littérature, la linéarité, les LLOD et LLOQ, la précision et la justesse des méthodes LC-SRM sont généralement évaluées en réalisant une gamme de dilution des peptides d'intérêt (Selevsek *et al.*, 2011 ; Domanski *et al.*, 2012 ; Simon *et al.*, 2012). Néanmoins, différentes stratégies sont mises en œuvre pour évaluer ces paramètres. Dans l'étude de Selevsek *et al.*, des quantités croissantes de peptides standards marqués (lourds) ont été ajoutés à une quantité fixe de digestat d'urine et seuls les peptides standards marqués ont été suivis en LC-SRM. Les LLOD et LLOQ ont été établies pour les dilutions de peptides standards marqués à partir desquelles un rapport signal sur bruit (S/N) supérieur à 3 et à 10, respectivement, est observé. La précision et la justesse n'ont pas été déterminées à partir de ces données. Dans l'étude de Domanski *et al.*, la même stratégie de dilution a été envisagée (différentes dilutions des peptides lourds dans une quantité fixe de digestat de plasma humain contenant les peptides endogènes légers), mais la détermination de la LLOQ a été estimée différemment : la LLOQ est la dilution la plus basse pour laquelle (i) le coefficient de variation entre cinq réplicats d'injection est inférieur à 20 % et (ii) la justesse de la concentration moyenne mesurée par la droite de calibration par rapport à la concentration théorique se situe entre 80 % et 120 %. La LLOD n'a pas été déterminée dans cette étude. A la différence de ces deux premières études, Simon *et al.* ont réalisé une gamme de dilution décroissante de digestat de plasma contenant le peptide d'intérêt en gardant une quantité constante de peptide standard marqué correspondant. Pour le calcul de la précision (triplicats d'injection) et de la justesse, la concentration du peptide endogène ciblé a été déterminée à partir du ratio de l'aire de la transition la plus intense du peptide endogène et celle du peptide lourd. Les LLOD et LLOQ n'ont pas été déterminées. Ces trois études reflètent la diversité des stratégies pour déterminer les performances d'une méthode SRM.

Pour la validation de notre méthode, nous nous sommes inspirés de la stratégie de Domanski *et al.*. Cependant, dans notre cas, l'obtention de biopsies infectées naturellement par la tique était difficile. Nous avons alors réalisé une gamme de dilution des peptides standards marqués dans un digestat d'un extrait de biopsie non infectée, ne contenant donc pas de peptide endogène. L'avantage de la présence de l'endogène lors d'une telle étude est de pouvoir tracer une courbe de calibration du rapport des signaux des peptides lourds et légers en fonction de la concentration du peptide lourd ajoutée (Domanski *et al.*, 2012). En raisonnant sur le rapport plutôt que sur le signal brut du peptide lourd, on s'affranchit d'une potentielle variation du volume injecté d'une analyse à l'autre ou d'un effet d'encrassement du spectromètre de masse lors de longues séries d'analyse (perte de sensibilité).

Une gamme de peptides standards marqués a été analysée, comprenant huit quantités de peptide injecté (1 fmol à 100 fmol) dans l'équivalent de 1 µg de protéines extraites de biopsie cutanée. Chaque analyse a été réalisée en triplicat. Il faut noter que cette gamme est précise dans le cas du peptide commun, où le peptide standard marqué est un peptide AQUA™, mais qu'elle est approximée pour les autres peptides standards. Les critères de validation que nous avons établis pour ce peptide sont les suivants :

- la limite basse de quantification (LLOQ) doit correspondre à la quantité la plus basse pour laquelle le **coefficient de variation de la somme des aires des transitions est < 20 %** entre les triplicats et la **justesse entre 80 % et 120 %**. La justesse a été évaluée par le rapport entre la quantité calculée à partir de l'équation de la régression linéaire et la quantité théorique de peptide injectée.
- les **rapports entre les différentes transitions du peptide** doivent être respectés pour l'ensemble des quantités supérieures à la LLOQ et doivent correspondre aux rapports obtenus pour la quantité la plus haute (100 fmol injectée).
- la limite basse de détection (LLOD) correspond au point le plus bas de la régression linéaire pour lequel une **coélution des trois transitions** est observée.
- la linéarité est validée par un coefficient de corrélation **R² supérieur à 0,98** pour la régression linéaire de la somme des aires des transitions en fonction de la quantité injectée de peptide.

Les résultats obtenus pour le peptide commun sont rassemblés sur la Figure 77 et dans le Tableau 26. La somme des aires des transitions sélectionnées pour ce peptide a été utilisée pour l'évaluation des performances. Compte tenu de nos critères de validation, nous avons restreint la gamme de linéarité entre 3 et 100 fmol et nous avons établi la **LLOD à 3 fmol** injectées et la **LLOQ à 5 fmol** injectées pour le peptide commun GPNLTEISK* (Tableau 26). Pour les autres peptides, l'existence d'un domaine de linéarité a été démontrée, mais nous n'avons pas pu établir de LLOD ou de LLOQ car la concentration des peptides utilisés n'était pas assez précise.

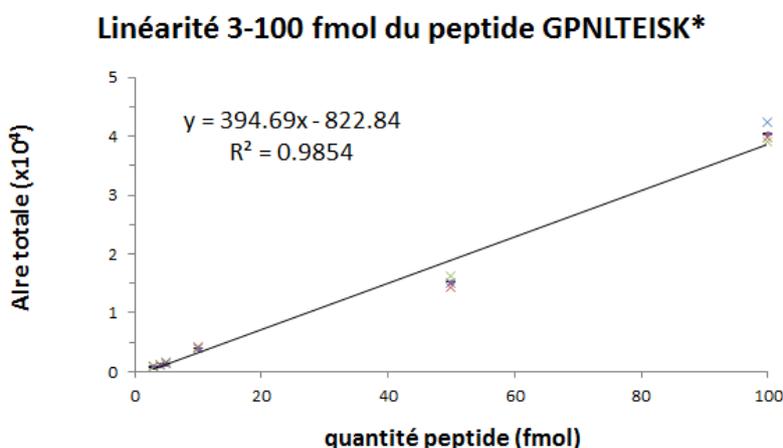


Figure 77 : Gamme de linéarité du peptide standard marqué GPNLTEISK*. Linéarité établie entre 3 et 100 fmol injectée.

Quantité injectée (fmol)	Aire des transitions (moyenne)	CV (%)	Justesse (%) (linéarité 3-100 fmol)
0	396	20	/
1	599	47	/
2	582	13	/
3	872	11	139
4	1097	4	119
5	1426	9	112
10	3974	3	120
50	15214	7	81
100	40368	4	104

Tableau 26 : Analyse de linéarité du peptide GPNLTEISK*.

Pour chaque quantité injectée, la somme des aires des transitions du peptide GPNLTEISK* a été moyennée sur l'ensemble des trois réplicats. Le coefficient de variation (CV %) correspondant a été établi. La justesse de la quantité déterminée à partir de l'équation de la droite de régression, en pourcentage par rapport à la valeur attendue, a été déterminée. Les valeurs indiquées en rouge ne satisfont pas les critères établis.

Cette étude d'évaluation des performances a été réalisée à deux reprises. Lors de la première étude, les peptides standards marqués ont été ajoutés aux extraits de biopsies juste avant l'injection. Lors de la seconde, les peptides standards marqués ont été ajoutés avant l'étape de réduction des ponts disulfure et ont donc subi l'ensemble des étapes du processus. Dans les deux cas, les conclusions ont été les mêmes : linéarité entre 3 et 100 fmol, LLOD 3 fmol et LLOQ 5 fmol.

H/ Conclusion

La méthode LC-SRM développée a permis d'établir une liste de 10 peptides et 47 transitions pour la détection de la protéine OspC de trois souches de *B. burgdorferi* (B31, N40 et 297). Nous avons montré ici la faisabilité de la détection de ces peptides dans un extrait de biopsie de peau de souris non infectée, avec une limite basse de détection de 3 fmol et une limite basse de quantification de 5 fmol. Nous avons également mis en évidence un effet de matrice important.

VIII- Analyse de biopsies cutanées infectées

Nous avons ensuite appliqué notre méthode LC-SRM à des biopsies de peau de **souris infectée par la bactérie *Borrelia***. Notre objectif initial était d'analyser des biopsies de souris infectées par l'intermédiaire d'une tique. Cependant, en raison de difficultés pour nos collaborateurs d'obtenir ces biopsies, nous avons dans un premier temps analysé des biopsies de souris infectées par inoculation intradermique à l'aide d'une seringue. Ce mode d'infection des souris, maîtrisé par nos collaborateurs, est fréquemment rencontré dans la littérature, particulièrement pour étudier l'influence de l'inoculation par l'intermédiaire de la tique (Christe *et al.*, 2000 ; Adusumilli *et al.*, 2010 ; Kern *et al.*, 2011). Quatre souris ont été infectées par une culture de *B. burgdorferi* ss de souche c297/4, clone virulent de la souche native 297 (Kern, 2011). Les souris ont été euthanasiées 3, 5, 7 ou 15 jours après l'inoculation à la seringue et des biopsies de peau ont été prélevées, au point d'inoculation, afin de rechercher la protéine OspC par LC-SRM.

A/ Application de la stratégie développée à des biopsies de peau infectée

Les biopsies cutanées de souris infectées ont été traitées selon le protocole optimisé. Les quantités de protéines extraites sont présentées dans le Tableau 27. Les protéines extraites ont été réduites, alkylées et digérées par la trypsine en milieu liquide. Avant injection sur le couplage LC-SRM, un mélange de 100 fmol de chaque peptide standard marqué a été ajouté à environ 1 à 2 µg de digestat d'extrait de biopsie infectée selon les échantillons (Tableau 27).

Biopsie	Masse de biopsie (mg)	Quantité de protéines extraites (µg)	Rendement (µg de protéines/ mg de biopsie)	Quantité injectée en LC-SRM : digestat d'extrait (µg) / peptides standards (fmol)
3 jours	16,1	198	12,3	1 / 100
5 jours	21,2	260	12,3	1,3 / 100
7 jours	27,3	360	13,0	1,9 / 100
15 jours	21,1	160	15,0	1,6 / 100

Tableau 27 : Extraction des biopsies infectées et quantités injectées en LC-SRM.

Quatre biopsies cutanées de souris infectées par *Borrelia* (inoculation intradermique) ont été prélevées à 3, 5, 7 et 15 jours après inoculation. La masse des biopsies, la quantité de protéine extraite (dosage Bio-rad DC assay) et le rendement d'extraction sont indiqués. Les quantités de digestat des extraits de biopsie et les quantités de peptides standards injectées en LC-SRM sont renseignées.

Les traces SRM obtenues pour le peptide commun (lourd et léger) pour chaque biopsie infectée sont présentées sur la Figure 78. Dans chaque cas, le signal obtenu pour le peptide standard marqué est beaucoup plus intense que celui du peptide endogène, ce qui témoigne d'une quantité de peptide standard marqué trop élevée par rapport à la quantité de peptide endogène présent dans ces échantillons. Cependant, nous pouvons observer que le signal du peptide endogène est très faible et confondu avec le bruit de fond, il ne respecte pas le ratio entre les transitions et, mis à part pour la biopsie prélevée trois jours après l'inoculation, nous n'observons pas une co-élution des trois transitions. Dans ces conditions, la détection du peptide endogène ne peut pas être validée.

De la même façon, les autres peptides n'ont pas été détectés dans les extraits de biopsie infectée, quelle que soit la durée (3j à 15j).

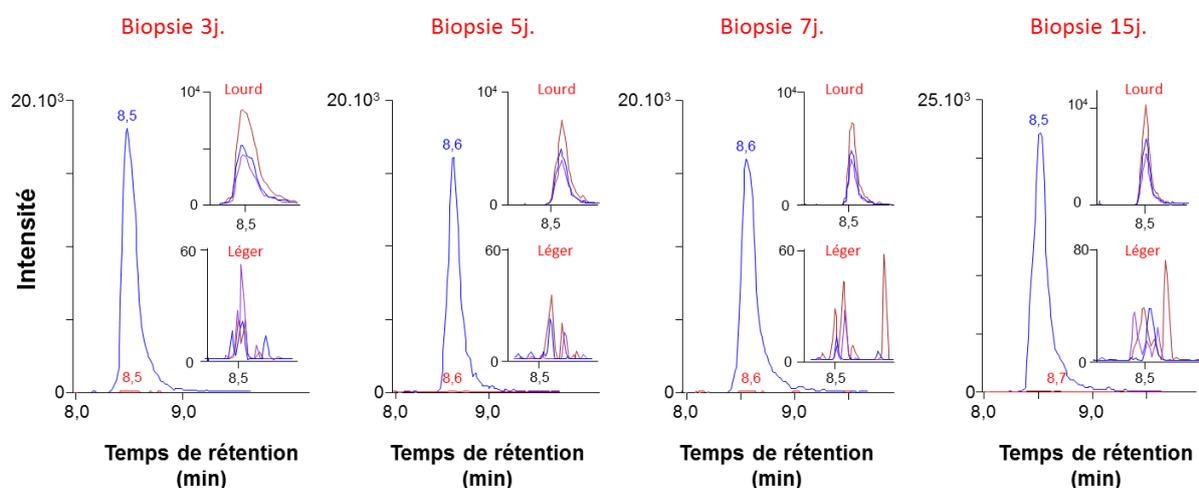


Figure 78 : Traces SRM du peptide GPNLTEISK obtenues à partir de biopsies infectées.

Quatre extraits de biopsies cutanées de souris infectées par *Borrelia* (inoculation intradermique) ont été analysés par LC-SRM (1/200^{ème} de biopsie) : biopsie 3j., biopsie 5j., biopsie 7j., biopsie 15j. (biopsies prélevées 3, 5, 7 et 15 jours après inoculation de la bactérie, respectivement). Dans chaque cas, 100 fmol de peptides standards marqués ont été ajoutés avant l'injection. Le signal correspondant à la somme des transitions du peptide standard marqué (lourd) est présenté en bleu, celui du peptide endogène (léger) en rouge. En insert sont présentées les traces relatives à chaque transition dans le cas du peptide lourd et du peptide léger.

Ces résultats ont montré que, malheureusement, notre méthode ne permettait pas de détecter la protéine d'intérêt OspC dans des biopsies cutanées infectées par inoculation intradermique. Ceci peut être dû au fait que la protéine OspC est présente en quantité trop faible par rapport au seuil de détection de notre méthode. Si on ne peut pas exclure un problème de sensibilité dû à notre équipement, il est également connu que des phénomènes de suppression de signal ou l'apparition d'interférences, causés par la complexité de la matrice, peuvent induire une perte de sensibilité (Gillette *et al.*, 2013). Dans ce cas, une étape préalable de fractionnement, d'enrichissement ou de déplétion peut améliorer la détection des protéines d'intérêt en rendant l'échantillon moins complexe (Shi *et al.*, 2012).

B/ Ajout d'une étape de préfractionnement

Dans la littérature, nous retrouvons fréquemment des étapes de décomplexification des échantillons, au niveau protéique ou peptidique, avant une analyse par LC-SRM. Parmi ces étapes, nous pouvons distinguer les étapes d'enrichissement de la protéine d'intérêt (Callipo *et al.*, 2010 ; Ruppen-Cañás *et al.*, 2012) ou des peptides d'intérêt (Kuhn *et al.*, 2009 ; Whiteaker *et al.*, 2010), les étapes de déplétion (Keshishian *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2012) ou le préfractionnement par chromatographie échangeuse d'ions (DeSouza *et al.*, 2009 ; Keshishian *et al.*, 2009), chromatographie d'exclusion stérique (Kuhn *et al.*, 2004), focalisation isoélectrique *off gel* (Heller *et al.*, 2005 ; Picotti *et al.*, 2009) ou électrophorèse sur gel (Ang *et al.*, 2010 ; Halvey *et al.*, 2012). Bien que ces étapes de décomplexification apportent un réel bénéfice quant à la sensibilité de la détection en LC-SRM, elles présentent tout de même certains inconvénients (Shi *et al.*, 2012). La limitation la plus préjudiciable est le taux de recouvrement des protéines d'intérêt, notamment pour les étapes de déplétion, d'enrichissement ou de séparation par gel d'électrophorèse. Toute perte de protéines ou de peptides lors de ces étapes conduit à une sous-estimation au moment de la quantification. Parmi les autres limitations, nous pouvons citer la nécessité d'anticorps spécifiques pour un enrichissement par immuno-affinité, le coût de ces étapes ou encore l'aspect chronophage apporté par un fractionnement étendu.

Dans notre contexte, nous avons privilégié le développement d'une méthode de préfractionnement par gel d'électrophorèse monodimensionnelle, d'une part pour sa rapidité de mise au point et d'autre part pour son faible coût supplémentaire.

Une quantité de 10 µg des extraits de biopsies cutanées infectées a été déposée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE (15 %), puis les protéines contenues dans les bandes d'intérêt (sélectionnées par leur masse moléculaire apparente proche de celle d'OspC recombinante) ont été excisées, réduites, alkylées et digérées *in gel* par la trypsine (Figure 79). Afin de comparer cette nouvelle stratégie avec la stratégie sans préfractionnement, l'équivalent de 1 µg d'extrait (1/10^{ème} de ce qui a été déposé sur gel) a été mélangé avec les peptides standards avant l'injection en LC-SRM. D'après les résultats précédents, nous avons décidé de diminuer à 5 fmol (au lieu de 100 fmol) la quantité de peptides standards, correspondant à la limite de quantification établie.

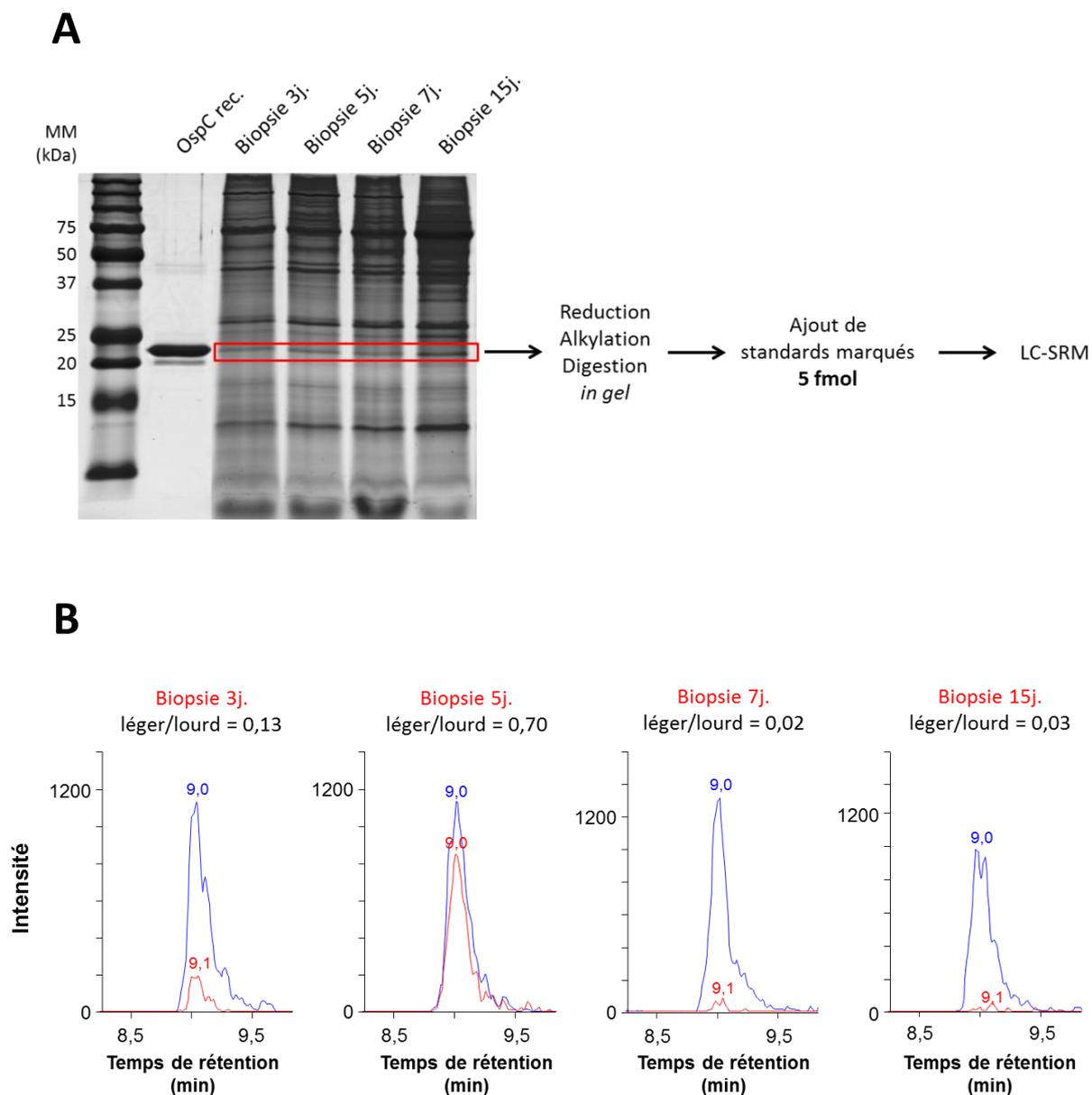


Figure 79 : Couplage d'un préfractionnement sur gel SDS-PAGE avec la stratégie LC-SRM.

(A) : Quatre extraits de biopsies cutanées de souris infectées par *Borrelia* (inoculation intradermique) ont été déposés sur gel 15 % SDS-PAGE (10 µg protéine par puits) : biopsie 3j., biopsie 5j., biopsie 7j., biopsie 15j. (biopsie prélevée 3, 5, 7 et 15 jours après inoculation de la bactérie, respectivement). La protéine recombinante OspC a également été déposée sur le gel (0,1 µg). Les zones correspondant à la protéine OspC ont été excisées en bandes de 2 mm et les protéines ont été réduites, alkylées et digérées *in gel* par la trypsine. Après extraction des peptides, un mélange de 5 fmol de peptides standards a été ajouté à l'équivalent de 1 µg d'extrait et le mélange a été analysé par LC-SRM.

(B) : Le signal correspondant au peptide standard marqué (lourd) est présenté en bleu, celui du peptide endogène léger) en rouge. Pour chaque extrait, le rapport entre la somme des aires des transitions du peptide léger par rapport au lourd a été déterminé.

Les traces SRM obtenues pour le peptide commun (lourd et léger) pour chaque biopsie infectée sont présentées sur la Figure 79B. Nous avons vu précédemment que la limite de détection était établie à 3 fmol et la limite de quantification à 5 fmol. Dans le cas présent, le peptide standard marqué a été injecté à hauteur de 5 fmol. Il faut donc obtenir un rapport entre la somme des aires des transitions

du peptide endogène par rapport à celle du peptide standard marqué supérieur ou égal à 1 pour pouvoir quantifier le peptide et supérieur ou égal à 0,6 pour pouvoir valider la détection du peptide. La Figure 79 montre que, pour l'extrait de biopsie prélevé cinq jours après l'inoculation intradermique de *Borrelia*, le rapport obtenu est de 0,7. Nous pouvons donc en déduire la **présence du peptide endogène GPNLTEISK** dans cet échantillon. Cependant la quantité ne peut pas être déterminée car le ratio reste inférieur à 1. Le signal obtenu pour les trois autres extraits de biopsie (3j, 7j, 15j) se situe en deçà de la limite de détection. Pour les autres peptides, aucun signal n'a été observé.

Nous avons donc montré que, pour une quantité équivalente d'extrait de biopsie cutanée de souris, l'étape de préfractionnement par gel d'électrophorèse SDS-PAGE, apporte un réel gain de sensibilité pour la détection de la protéine OspC. Le peptide commun, est le seul peptide à avoir été détecté dans ces conditions. Ceci peut s'expliquer par la variabilité de la protéine OspC selon les souches de la bactérie. En effet, les peptides standards marqués disponibles correspondaient aux souches N40, B31 ou 297. Les biopsies étudiées étaient infectées par la souche c297/4, clone virulent de la souche native 297. Certaines études ont montré que la protéine OspC pouvait montrer des variations au sein d'une même population de tique ou au sein d'une même souche (Wang *et al.*, 1999b ; Chan *et al.*, 2012b). On ne peut donc pas exclure que les séquences soient différentes pour le clone virulent c297/4.

Dans une étude parallèle réalisée par nos collaborateurs, il a été montré un maximum d'expression du gène *OspC* dans des biopsies cutanées, cinq jours après l'inoculation de la bactérie (Figure 80). Ces résultats, obtenus par une approche RT-PCR, sont donc en accord avec les résultats obtenus au niveau protéique par une approche SDS-PAGE-LC-SRM sur des extraits de biopsies cutanées.

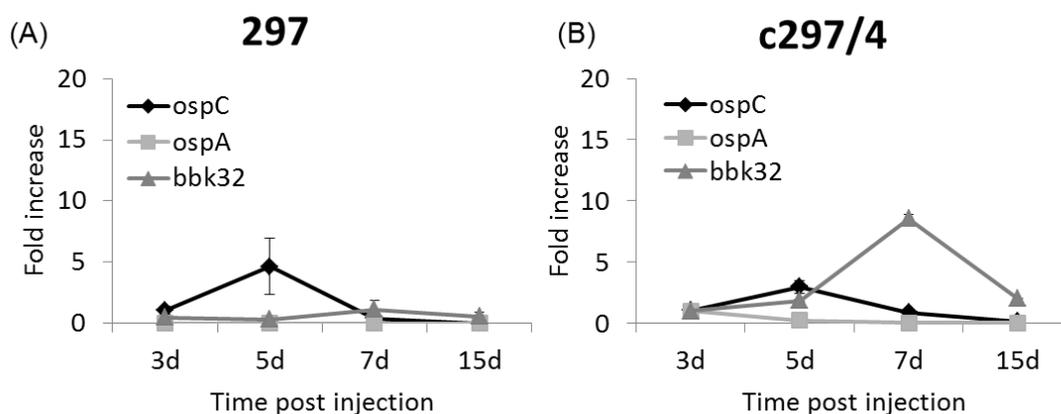


Figure 80 : Approche RT-PCR sur des biopsies cutanées infectées par *B. burgdorferi*.
D'après (Kern, 2011). Le taux d'ARNm des gènes *OspC*, *OspA* et *bbk32* a été mesuré 3j, 5j, 7j et 15j (d=jours) après inoculation intradermique des souches native 297 (gauche) ou virulente c297/4 (droite).

Nous avons reproduit cette expérience en analysant quatre nouvelles biopsies infectées (inoculation intradermique de *B. burgdorferi* ss c297/4) et prélevées après cinq jours (2 biopsies issues de la même souris et prélevées autour du point d'inoculation) et sept jours (2 biopsies issues de la même souris et prélevées autour du point d'inoculation). La seule modification apportée a été une quantité plus importante de protéine déposée sur gel SDS-PAGE (25 et 50 µg). Pour l'analyse par LC-SRM, la totalité des peptides extraits a été injectée et un mélange de 20 fmol de chaque peptide standard marqué a été ajouté avant l'injection. Malgré la quantité injectée plus importante que pour l'étude précédente, aucun signal n'a été observé en LC-SRM pour les dépôts de 25 µg des quatre biopsies. Pour les quantités de 50 µg, les résultats obtenus sont présentés en Figure 81. Pour pouvoir détecter le peptide commun (LLOD = 3 fmol), le rapport de la forme endogène par rapport à la forme marquée (20 fmol injectée) doit être supérieur à 0,15. Nous pouvons donc valider la **présence du peptide dans deux biopsies**, une biopsie prélevée cinq jours après l'inoculation (léger/lourd= 0,24) et une biopsie prélevée après sept jours (léger/lourd = 0,16). Ce résultat est très stimulant. Nous sommes toutefois confrontés à la variabilité biologique de nos échantillons, d'une part entre des biopsies prélevées sur différentes souris (comparaison avec l'étude précédente) et d'autre part entre deux biopsies prélevées sur la même souris.

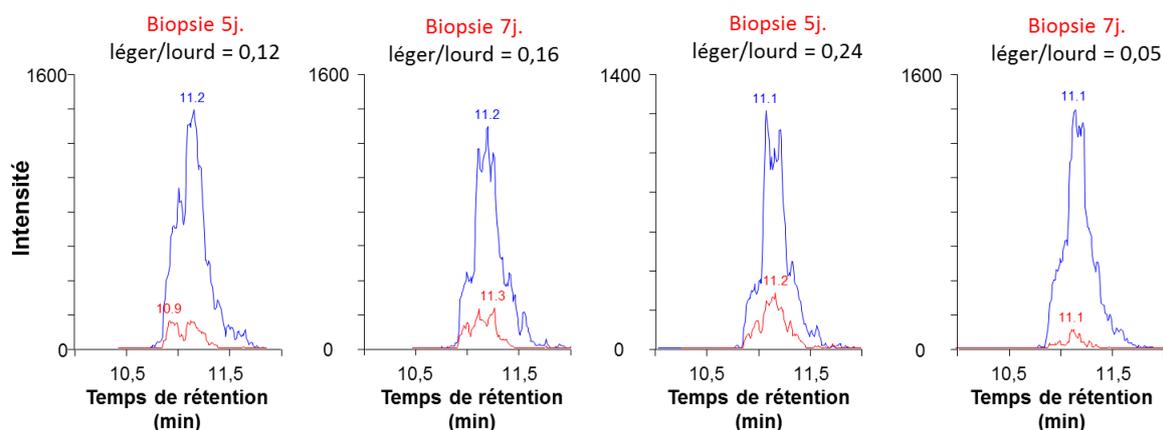


Figure 81 : Traces SRM du peptide GPNLTEISK obtenu après préfractionnement sur gel SDS-PAGE d'extraits de biopsies de peau infectées.

Quatre extraits de biopsies cutanées de souris infectée par *Borrelia* (inoculation intradermique) ont été déposés sur gel SDS-PAGE (15 %, 50 µg déposés) et ont été analysés par LC-SRM (50 µg injectés) : deux biopsies 5j. et deux biopsies 7j. (biopsies prélevées 5 et 7 après inoculation de la bactérie, respectivement). Dans chaque cas, 20 fmol de peptides standards marqués ont été injectés. Le signal correspondant au peptide standard marqué (lourd) est présenté en bleu, celui du peptide endogène (léger) en rouge. Pour chaque extrait, le rapport entre la somme des aires des transitions du peptide léger par rapport au lourd a été déterminé.

De plus, d'après la Figure 81, nous pouvons remarquer que la qualité des traces SRM est moins bonne que celles obtenues dans la Figure 79 (pics plus hachurés) et que l'intensité du peptide standard marqué est équivalente à celle observée précédemment alors qu'il y a un facteur 4 de différence en quantité injectée, 20 fmol dans le cas présent contre 5 fmol précédemment. Malgré la vérification avant injection des performances du spectromètre de masse en termes de stabilité de

spray et de sensibilité, nous nous heurtons au problème déjà discuté précédemment de stabilité de spray en milieu aqueux, qui explique la forme des pics en dents de scie et induit une perte de sensibilité. Afin de résoudre ce problème d'instabilité de spray, nous avons récemment installé une nouvelle interface entre la chromatographie et la source d'ionisation du spectromètre de masse. Cette interface est actuellement en phase de tests.

Enfin, lors de cette dernière étude, nous avons voulu comparer la détection de la protéine OspC par notre stratégie SDS-PAGE / LC-SRM et par immunodétection. En parallèle des gels destinés à l'analyse par LC-SRM, nous avons déposé les mêmes quantités d'extraits de biopsies infectées (25 et 50 µg) sur un autre gel. Ce gel a été transféré sur une membrane de nitrocellulose puis révélé par Western-blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre OspC. La protéine OspC a été détectée dans les quatre échantillons, pour 25 et 50 µg de protéine déposée (Figure 82). Cette observation confirme que l'immunodétection reste plus sensible que les approches SRM (Picotti *et al.*, 2012), et qu'il est possible de détecter OspC dans des biopsies infectées pour une quantité (25 µg) où elle n'est pas encore détectée par LC-SRM.

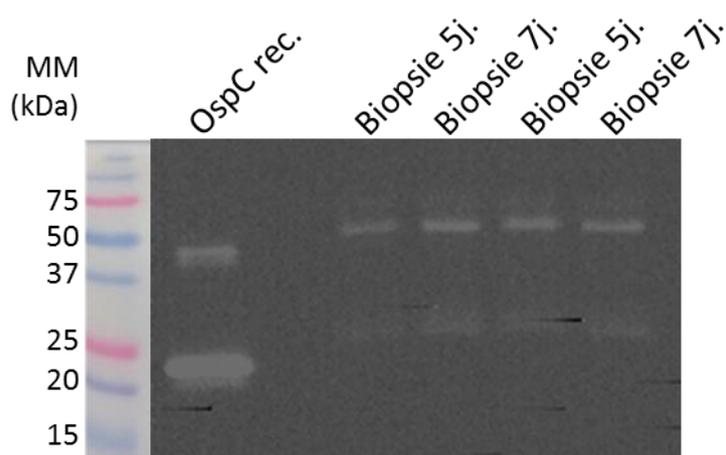


Figure 82 : Détection par Western-blot de la protéine OspC dans des biopsies infectées.

Quatre extraits de biopsies cutanées de souris infectées par *Borrelia* (inoculation intradermique) ont été déposés sur gel SDS-PAGE (25 µg déposés) : deux biopsies 5j. et deux biopsies 7j. (biopsies prélevées 5 et 7 après inoculation de la bactérie, respectivement). La protéine recombinante OspC a également été déposée sur le gel (0,1 µg). Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose. Les bandes correspondant à la protéine OspC ont été révélées par chimioluminescence à l'aide d'un anticorps primaire spécifique et d'un anticorps secondaire couplé à la peroxidase.

De manière intéressante, cette expérience nous a également révélé la présence, pour la protéine recombinante, de deux bandes reconnues par l'anticorps dirigé contre OspC : une première intense aux alentours de 22 kDa, correspondant à la masse attendue pour OspC et une seconde d'intensité plus faible vers 48 kDa, pouvant correspondre au dimère de la protéine. Ces deux bandes sont présentes dans les quatre biopsies infectées et on peut noter que l'intensité est plus forte pour les bandes correspondant au dimère d'OspC, contrairement à ce qui est observé pour la protéine recombinante. De manière intéressante, il est rapporté dans la littérature que la forme active de la molécule est la forme dimérique (Kumaran *et al.*, 2001). Etant donné que, dans notre approche SDS-

PAGE / LC-SRM, nous n'avons excisé que la zone du gel située autour de 22 kDa, nous ne pouvons pas exclure que nous avons perdu une partie du matériel pour la détection d'OspC. Lors de nos prochaines expériences, il conviendra d'exciser également cette zone autour de 50 kDa et de l'analyser par LC-SRM.

Une quantité plus faible, 10 µg, d'extrait de biopsie cutanée a été déposée sur gel pour la détection d'OspC par Western-blot. Nous n'avons observé aucune bande dans la zone située autour de 22 kDa où l'on attendait la présence du monomère. Dans la zone autour de 50 kDa, une très faible bande a été observée. Ces observations nous ont indiqué que pour une quantité de 10 µg d'extrait de biopsie déposée, nous nous situons à la limite de l'immuno-détection.

C/ Conclusion

Nous avons réussi à détecter la protéine OspC en combinant une étape de préfractionnement par électrophorèse SDS-PAGE à l'approche LC-SRM. Ceci nous a permis de mettre en évidence un pic d'induction de la protéine cinq jours après l'inoculation. Ce résultat est en accord avec des expériences de RT-PCR de nos collaborateurs qui ont montré la surexpression du gène *OspC* dans les biopsies cutanées, cinq jours après l'inoculation de la bactérie. Toutefois, nous avons observé une variabilité entre différentes biopsies infectées.

Les résultats obtenus lors de la comparaison de l'approche de détection de la protéine OspC par [SDS-PAGE / LC-SRM] et l'approche par Western-blot sur les mêmes biopsies ont montré que l'approche par immunodétection est plus sensible. Cependant, le problème instrumental rencontré en LC-SRM a très certainement biaisé les analyses et surestimé la sensibilité de cette approche. Toutefois, les limites de détection obtenues par les deux approches pour la protéine OspC dans des biopsies cutanées infectées sont du même ordre de grandeur (10 µg en Western-blot et 50 µg injecté en LC-SRM).

Ces résultats sont très encourageants et ont montré la faisabilité de la détection de *Borrelia* dans un extrait de biopsie cutanée par une approche LC-SRM. Il est prévu d'analyser très prochainement des biopsies cutanées humaines prélevées sur des erythèmes migrants de personnes atteintes par la maladie de Lyme. Enfin, à présent que la stratégie a été mise au point pour la protéine OspC, nous envisageons de cibler d'autres protéines de *Borrelia*. Les prochains candidats seront les protéines identifiées dans notre laboratoire par une approche différentielle entre des clones virulents de différentes espèces de *Borrelia* (travaux de Gilles Schnell en cours).

Chapitre V : Développement d'une méthode d'imagerie de biopsies cutanées par spectrométrie de masse

Comme nous l'avons vu, la spectrométrie de masse permet d'identifier et de caractériser les peptides et protéines contenues dans un échantillon biologique. Cependant, les techniques présentées auparavant ne permettent pas d'obtenir une information de localisation précise dans le tissu biologique, qui pourrait apporter une meilleure compréhension des processus biologiques locaux. Par exemple, pour les biopsies de peau, nous avons détecté OspC dans des biopsies infectées par injection intradermique de *Borrelia*, mais nous ne connaissons ni sa localisation par rapport au point de piqûre, ni la profondeur de pénétration dans la peau (derme, épiderme, hypoderme). Une technique innovante de spectrométrie de masse permet aujourd'hui d'obtenir cette information de distribution des molécules au sein d'un tissu biologique : **l'imagerie par spectrométrie de masse**.

Parallèlement au développement d'une méthode diagnostique par LC-SRM, nous avons envisagé de mener une étude d'imagerie par spectrométrie de masse sur des biopsies de peau pour la détection de la bactérie *Borrelia*. L'ensemble de ce projet a été mené en collaboration avec le laboratoire *AGeing Imaging Modeling* (AGIM) du Dr Philippe Bulet à Archamps. Les biopsies ont été prélevées à l'Institut de bactériologie à Strasbourg et les expériences d'imagerie ont été réalisées à Archamps. Plusieurs campagnes de quelques jours ont été effectuées représentant une durée totale d'un mois.

I- Introduction

L'imagerie par spectrométrie de masse (MSI, *Mass Spectrometry Imaging*) est une technique permettant d'obtenir, pour une molécule de rapport m/z donné, une image du tissu biologique analysé montrant la distribution de cette molécule à l'aide d'un code couleur (Figure 83).

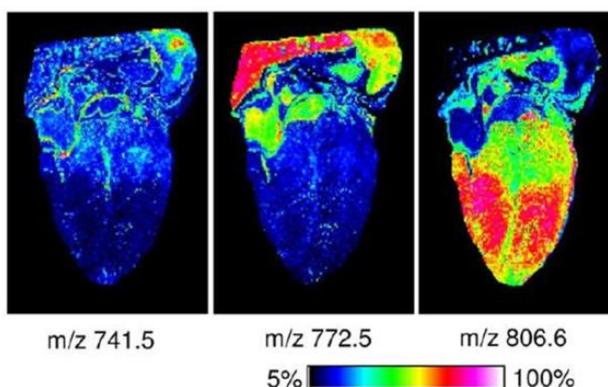


Figure 83 : Exemple d'images obtenues en imagerie par spectrométrie de masse MALDI.

D'après (Angel *et al.*, 2012a). Après avoir irradié point par point une coupe de cœur de souris et sélectionné un rapport m/z particulier (741,5, 772,5 ou 806,6), une image représentant l'intensité de ce rapport en chaque point est dressée. Les couleurs froides indiquent une faible concentration de la molécule et les couleurs chaudes une forte concentration.

Les techniques d'ionisation généralement utilisées en MSI sont la désorption et l'ionisation laser assistée par matrice (MALDI, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*), l'ionisation par désorption électrospray (DESI, *Desorption Electrospray Ionisation*) et la spectrométrie de masse d'ions secondaire (SIMS, *Secondary Ion Mass Spectrometry*). Dans le cadre de notre étude, seule l'ionisation MALDI a été mise en œuvre.

L'imagerie par spectrométrie de masse MALDI (MALDI-MSI) a été développée à l'origine par le groupe de Richard Caprioli pour la détection et la localisation de peptides et protéines sur des sections de tissus biologiques (pancréas de rat, hypophyse de rat ou cellule endothéliale humaine) (Caprioli *et al.*, 1997). Initialement appliquée à l'étude des protéines (Stoeckli *et al.*, 2001 ; Chaurand *et al.*, 2002), cette technique s'est étendue à la lipidomique (Goto-Inoue *et al.*, 2011), la métabolomique (Miura *et al.*, 2012) ou l'étude de petites molécules (médicaments) (Prideaux *et al.*, 2012).

Le principe de l'imagerie MALDI-MSI repose sur le balayage, par le laser de la source MALDI, d'une coupe fine de tissu biologique déposée sur une lame conductrice et recouverte d'une matrice. Les molécules désorbées sont ensuite analysées dans un analyseur à temps de vol. L'ensemble des spectres obtenus point par point sur la coupe permet de reconstruire une image pour des rapports m/z particuliers à l'aide de logiciels adaptés (Figure 84).

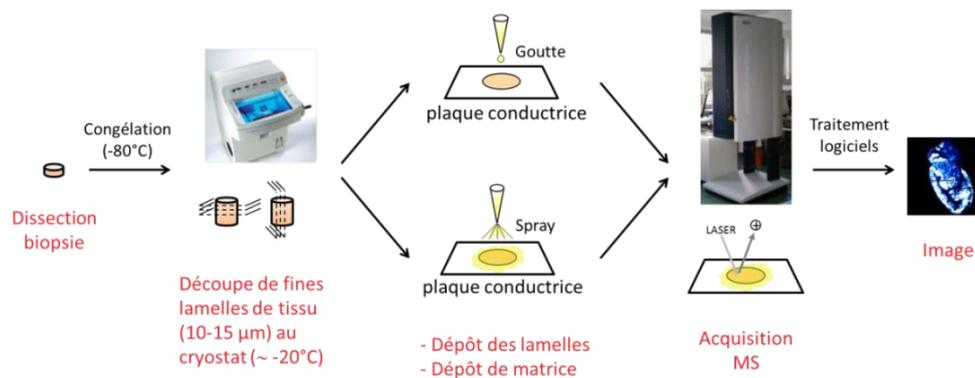


Figure 84 : Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI.

La biopsie de tissu biologique est tout d'abord prélevée. Après congélation, cette biopsie est découpée au cryostat puis fixée sur une plaque conductrice. La matrice est ensuite déposée sur la biopsie, puis les coupes sont analysées par spectrométrie de masse MALDI. L'ensemble des spectres de masse enregistrés point par point sur la biopsie permet de reconstruire une image en fonction d'un m/z particulier à l'aide de logiciel dédié.

Afin d'obtenir un résultat de qualité en imagerie par spectrométrie de masse, il est important d'avoir une **résolution spatiale** élevée et de ne pas compromettre la distribution des molécules à la surface du tissu biologique en provoquant une **délocalisation** ou une **dégradation** des tissus. Ces aspects dépendent à la fois de l'instrumentation utilisée et de l'ensemble de la préparation d'échantillon en amont de l'analyse en spectrométrie de masse.

La **résolution spatiale** est définie comme la distance minimale entre deux points sur la coupe de tissu pour lesquels un spectre MS est acquis. Plus les points sont rapprochés, plus la précision de l'information de localisation est grande. Ce paramètre dépend essentiellement de l'instrumentation utilisée, que ce soit lors de la préparation d'échantillon ou lors de l'acquisition des spectres. En effet, la distance entre deux points dépend de la répartition de la matrice sur la coupe et de la source d'ionisation. Si le dépôt de matrice n'est pas continu, mais qu'il consiste en gouttes de diamètre pouvant varier de **~150 µm à plus de 900 µm** (Kaletaş *et al.*, 2009), régulièrement déposées à la surface de la coupe, la résolution spatiale minimale, obtenue pour les gouttes les plus petites, est **de l'ordre de 200 µm** au minimum. Dans le cas d'un dépôt continu, cette résolution spatiale dépend du diamètre du faisceau utilisé pour balayer la coupe de tissu lors de l'ionisation et ne pourra pas être plus faible que ce diamètre. Les systèmes généralement utilisés pour les analyses MALDI-MS permettent de focaliser le laser sur une zone de 100 à 150 µm de diamètre. Si cette focalisation est adaptée dans un tel cas, elle est insuffisante en MALDI-MSI. De nouveaux lasers ont été développés afin d'améliorer cette focalisation. La meilleure résolution obtenue à ce jour est de **20 µm** avec un laser Nd :YAG smartbeam II (Bruker Daltonics) (Lagarrigue *et al.*, 2011). Un système a été développé par Chaurand *et al.* afin d'augmenter la résolution spatiale en diminuant la taille du laser. En contrôlant finement la taille du laser, et en améliorant la focalisation des ions formés dans la source afin qu'un nombre d'ions plus important entre dans l'analyseur, ces auteurs ont obtenu des images avec une résolution de 10 µm (Chaurand *et al.*, 2007). Cependant, ce système est encore à un stade de développement et n'est pas commercialisé. D'autres solutions ont été proposées pour améliorer

la résolution, comme l'application d'un masque sur le tissu afin de contrôler la taille de la zone irradiée (Fournier *et al.*, 2007), ou la superposition des zones irradiées lors de l'acquisition (Jurchen *et al.*, 2005). Dans le dernier cas, une zone de la coupe de tissu est irradiée de façon à retirer toute la matrice puis l'échantillon est déplacé d'une distance inférieure au diamètre de la zone irradiée. Ainsi toute la coupe peut être analysée. Cependant, la résolution obtenue dans les deux cas est de l'ordre de 25 à 30 μm . A titre de comparaison, la résolution spatiale obtenue en imagerie SIMS peut atteindre 50 nm permettant ainsi d'imager des ions au niveau atomique Ca^+ , Na^+ , K^+ ,... (Chandra *et al.*, 2000).

Le volet informatique, avec l'automatisation de la prise de données, la construction d'un spectre moyen à partir de l'ensemble des données collectées, l'extraction point par point de l'intensité d'un rapport m/z particulier et la construction de l'image correspondante à l'aide d'un code couleur, constitue la dernière étape importante de l'analyse MALDI-MSI. Les outils informatiques doivent gérer un ensemble de données beaucoup plus conséquent que pour une analyse MS classique. En effet, en chaque point de la coupe le spectre contient des milliers de valeur reliant l'intensité avec le rapport m/z . Les données se présentent alors sous la forme d'une matrice à trois dimensions où pour chaque point de coordonnée (x,y) sur la coupe est associé des milliers de couple $(m/z, I)$. Des logiciels dédiés ont été développés par les constructeurs (e.g. FlexImaging de Bruker Daltonics) ou de manière indépendante (Biomap, développé par M. Rausch et adapté aux données MSI par M. Stoekli, Novartis). Ces logiciels proposent un traitement de données avant la reconstruction de l'image, afin de réduire le bruit et les variations à la surface du tissu causées par la préparation d'échantillon (Angel *et al.*, 2012a). Depuis quelques années des efforts ont été faits pour intégrer des outils statistiques dans ces logiciels (Jones *et al.*, 2012).

II- Étapes cruciales de la préparation d'échantillon

Durant la préparation d'échantillon, il est important de ne pas influencer le résultat final qui est l'obtention d'une information de localisation des molécules d'intérêt. Pour cela il faut éviter au maximum la **dégradation** du tissu ou la **délocalisation** des molécules, qui peuvent survenir à n'importe quelle étape, de la dissection du tissu à l'application de la matrice avant l'analyse.

Prélèvement du tissu

La première étape critique est le prélèvement du tissu que l'on désire analyser. Il est important de prélever la biopsie et de la congeler le plus rapidement possible après euthanasie afin de conserver son intégrité. Généralement, le tissu est immédiatement plongé dans l'isopentane refroidi à -80°C (Kaletaş *et al.*, 2009). Il faut également éviter toute fluctuation de la température au sein du tissu afin d'éviter toute dégradation des protéines lors de sa conservation (-80°C) jusqu'à son traitement.

Découpe de la biopsie

La deuxième étape cruciale est la découpe de la biopsie prélevée en fines lamelles de **10 à 20 μm** d'épaisseur (Caldwell *et al.*, 2005 ; Kaletaş *et al.*, 2009). Bien que cela soit plus facile à manipuler, il est important que les coupes ne soient pas trop épaisses afin de ne pas isoler le tissu du support conducteur et donc obtenir des spectres de moins bonne qualité (Sugiura *et al.*, 2006). En revanche, une coupe trop fine est beaucoup plus difficile à manier et peut se déchirer très facilement.

Généralement, la découpe est réalisée à l'aide d'un microtome dans une enceinte réfrigérée aux alentours de -20°C (cryostat) et la biopsie à découper est couramment fixée sur un support à l'aide d'un « colle » polymérique (appelée OCT, *Optimum Cutting Temperature*) composée de polyéthylène glycol (PEG). La basse température permet non seulement de ralentir la dégradation biologique de l'échantillon mais également d'avoir un tissu dur, plus facile à découper. Lors de cette étape il est impératif de manipuler l'échantillon avec précaution afin d'éviter toute contamination ou dégradation physique. Le PEG a l'inconvénient d'être facilement ionisable par MALDI et de provoquer une suppression de signal (Figure 85) (Schwartz *et al.*, 2003). Il faut alors utiliser cette colle uniquement pour fixer le tissu au niveau de la surface inférieure et éviter au maximum le contact de celle-ci avec la surface supérieure du tissu pour ne pas contaminer les coupes. L'utilisation de milieux d'enrobage est cependant avantageux car elle permet d'obtenir un bloc plus gros, pouvant être fixé plus facilement sur le support du cryostat, de forcer les coupes de tissu à garder leur forme (non écrasée et non enroulée) et d'aider la découpe avec l'obtention d'une coupe de surface plus grande et donc plus facilement maniable (Setou, 2010). D'autres milieux d'enrobage peuvent être envisagés, comme 10 % de gélatine ou d'agarose (Kaletaş *et al.*, 2009). Cependant, il est nécessaire de plonger la biopsie fraîchement prélevée dans une solution de gélatine ou d'agarose à 30°C lors de l'enrobage,

pouvant ainsi provoquer la dégradation prématurée des protéines. Stoeckli *et al.* ont utilisé un gel semi liquide de 2 % de carboxyméthylcellulose sodique pour l'enrobage de corps entier de souris ou de rats (Stoeckli *et al.*, 2007).

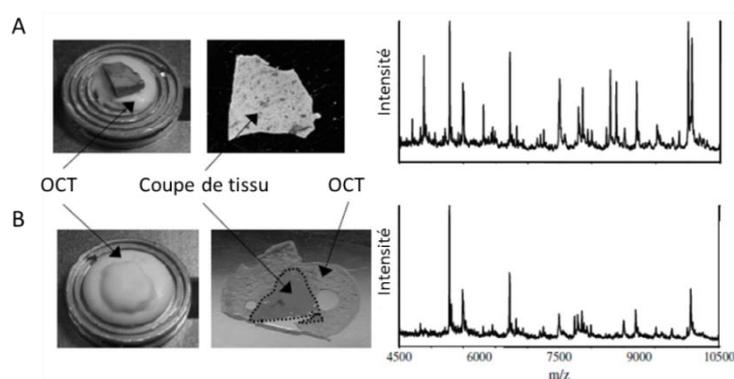


Figure 85 : Effet de la colle polymérique OCT sur le signal MALDI-MSI d'un échantillon de foie de rat.

D'après (Schwartz *et al.*, 2003). (A) : La biopsie est fixée sur le support à l'aide de la colle OCT uniquement sur la surface inférieure. La colle n'entre pas en contact avec les coupes réalisées. Le spectre obtenu pour une de ces coupes présente de nombreux pics entre 4 500 et 10 500 m/z. (B) : La biopsie est enrobée de colle OCT. La coupe obtenue est entourée de colle OCT. Le spectre correspondant à cette coupe montre des pics moins nombreux et moins intenses que le spectre précédent.

Il est également important que la coupe soit franche, que le tissu ne soit pas déchiré et qu'il soit récupéré dans son intégralité pour obtenir un résultat représentatif. Pour cela il faut utiliser des lames propres et aiguisées et optimiser la température du cryostat pour que le tissu ne soit ni trop mou (déchirement du tissu par la lame) ni trop dur (friabilité du tissu). La température peut être réglée à deux niveaux (Caldwell *et al.*, 2005 ; Kaletaş *et al.*, 2009) :

- température de l'enceinte réfrigérée (généralement -20°C).
- température du support de l'échantillon (entre -5°C et -25°C selon la nature de l'échantillon). Plus l'échantillon est gras, plus la température doit être basse pour parvenir à une coupe de qualité.

Transfert de la coupe

L'étape suivante est le transfert des coupes obtenues sur un support compatible avec l'analyse par spectrométrie de masse MALDI. Pour cela il faut utiliser un support conducteur. Différents types de supports peuvent être utilisés : des plaques en acier inoxydable, des plaques en or ou encore des lames de verre recouvertes d'une pellicule d'oxyde d'indium et d'étain (lame ITO, *Indium Tin Oxyde*, Bruker Daltonics). Les lames de verre ont l'avantage de pouvoir être utilisées en microscopie avant l'analyse par spectrométrie de masse. Cette étape doit être menée avec autant d'attention que les précédentes afin de ne pas déformer le tissu et de ne pas perdre d'information. Il existe deux façons

de transférer la coupe de biopsie sur le support conducteur. La première consiste à refroidir le support dans l'enceinte réfrigérée du cryostat, à déposer la coupe sur le support à l'aide d'un pinceau (ou d'une pince pour les coupes les plus épaisses) et à réchauffer l'ensemble (plaque + coupe) rapidement. Le tissu est alors décongelé directement sur la plaque. Cette méthode présente l'avantage de ne pas induire de perte des protéines solubles dans l'eau, étant donné que les cristaux de glace formés à la surface de la coupe seront transférés avec elle et seront décongelés sur le support avec la coupe. Cependant le transfert à l'aide du pinceau (ou de la pince) ajoute une manipulation délicate qui peut être à l'origine d'une perte de la coupe. La seconde méthode consiste à utiliser un support conservé à température ambiante que l'on va apposer sur la coupe encore congelée et qui n'a pas été déplacée. Cette coupe va alors immédiatement se décongeler au contact de la plaque et adhérer à celle-ci. Cette méthode a l'avantage d'éviter une manipulation intermédiaire entre la découpe et le transfert sur la plaque, mais présente l'inconvénient d'engendrer la perte des cristaux formés à la surface du tissu qui restent sur la lame du cryostat en se décongelant.

Lavage de la coupe

Avant le dépôt de la matrice, il est envisageable de réaliser une étape de lavage afin de retirer les sels, les lipides ou l'excès d'hémoglobine à la surface du tissu. Le groupe de Caprioli a montré qu'une étape de lavage avec une solution d'éthanol améliore la cristallisation de la matrice à la surface du tissu et donc la qualité du spectre (Figure 86) (Schwartz *et al.*, 2003). L'éthanol est utilisé en histologie comme fixateur de tissu, notamment en précipitant les protéines dans le tissu. La délocalisation des protéines n'est donc pas significative (Schwartz *et al.*, 2003 ; Kaletaş *et al.*, 2009). En 2006, Lemaire *et al.* ont montré que le traitement de coupes de cerveau de rat avec d'autres solvants organiques (chloroforme, xylène, toluène, hexane, acétone) améliorerait la détection de protéines par rapport au tissu non traité (Lemaire *et al.*, 2006a).

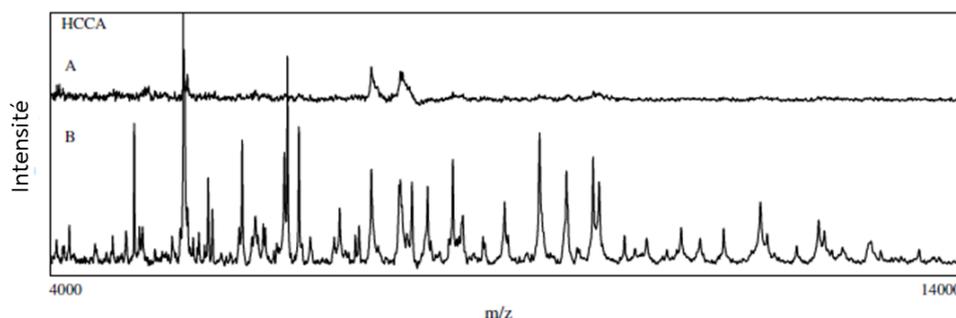


Figure 86 : Influence du lavage du tissu à l'éthanol avant le dépôt de matrice.

D'après (Schwartz *et al.*, 2003). Une coupe de foie de souris a été analysée avec un dépôt de matrice HCCA. A : la coupe n'a pas subi d'étape de lavage à l'éthanol et le spectre résultant ne contient que très peu de pics. B : la coupe a subi deux cycles de 30s de lavage par immersion dans une solution d'éthanol à 70 %. Le spectre résultant montre une amélioration significative du signal. Un résultat similaire a été obtenu avec la matrice acide sinapinique.

Dépôt de la matrice

Enfin, la dernière étape incontournable avant l'analyse par spectrométrie de masse est le dépôt de la matrice. Différents paramètres interviennent lors de cette étape : la nature de la matrice, les solvants utilisés et son mode de dépôt sur le tissu. Le succès et la qualité de l'image obtenue reposent en majeure partie sur la qualité du dépôt de la matrice. Ce dépôt et la cristallisation de la matrice doivent être les plus homogènes possibles sur la coupe afin d'obtenir un signal représentatif en tout point de la coupe. Il faut également éviter au maximum la délocalisation qui peut être apportée par le solvant.

Les matrices classiquement utilisées lors d'analyse par spectrométrie de masse MALDI sont également applicables en imagerie MALDI-MSI. Parmi celles-ci, les trois matrices les plus utilisées pour l'analyse de peptides et protéines sont l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), l'acide sinapinique (SA) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (Kaletaş *et al.*, 2009). Ces matrices sont préparées dans un mélange acidifié (généralement 0,1 % TFA) de solvant organique (acétonitrile, méthanol, isopropanol, acétone ou éthanol) et d'eau. Le rôle principal de cette solution est de dissoudre les analytes, c'est-à-dire de les extraire de leur environnement biologique, et de les co-cristalliser avec la matrice. La combinaison matrice/solvant est donc fortement dépendante des molécules d'intérêt et du tissu à analyser. Cependant, ces matrices classiques présentent l'inconvénient de cristalliser de façon inhomogène, de former de gros cristaux et donc de limiter à la fois la reproductibilité le long de la coupe et la résolution spatiale. De nombreux développements ont été réalisés sur la nature de la matrice, avec notamment l'utilisation de matrices ioniques solides ou liquides (Armstrong *et al.*, 2001 ; Lemaire *et al.*, 2006b). Les matrices ioniques solides sont composées d'un mélange équimolaire des matrices cristallines acides précédentes et d'une amine aromatique comme l'aniline. Elles ont montré l'obtention d'un signal plus intense, une meilleure sensibilité, une image de meilleure qualité et une meilleure reproductibilité.

Différents modes de dépôt de la matrice peuvent être réalisés sur les coupes de tissus. L'approche la plus simple à mettre en œuvre est le dépôt de matrice à l'aide de la pipette. Ce mode de dépôt permet d'obtenir une bonne extraction des analytes, mais il est entaché par une faible homogénéité, une faible reproductibilité et une forte délocalisation. Un second mode de dépôt consiste à former un aérosol de matrice au-dessus de la coupe. Cet aérosol peut être créé manuellement, à l'aide d'un sprayeur pneumatique, ou automatiquement. Cette nébulisation de la solution de matrice permet d'obtenir un dépôt très homogène et reproductible, d'autant plus s'il est réalisé automatiquement. Cependant, l'efficacité d'extraction des analytes est plus faible par rapport au mode précédent. Le troisième mode est le dépôt de goutte de volume précis tout au long de la coupe de tissu. Ces gouttes déposées avec un pas régulier permettent une bonne extraction et une faible délocalisation des analytes. Cependant, la limitation majeure de ce mode de dépôt est la résolution, liée au volume de la goutte.

III- Optimisation de la préparation de biopsie cutanée

Alors que l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI a beaucoup été développée pour des applications en cancérologie, en neurosciences ou en pharmaceutique sur des organes tels que le cerveau, le foie, le sein, les poumons, les ovaires, la prostate, ou encore sur des corps entiers de rats ou de souris (Reyzer *et al.*, 2007 ; McDonnell *et al.*, 2010), très peu d'études étaient disponibles sur la peau au commencement de notre projet (Bunch *et al.*, 2004 ; Roy *et al.*, 2006 ; Prideaux *et al.*, 2007 ; Marshall *et al.*, 2010). Ce paragraphe présentera l'ensemble des optimisations de la préparation d'échantillon qui ont été réalisées sur cet organe pour l'analyse par MALDI-MSI.

Les optimisations ont été réalisées sur des biopsies de peau de souris saines. Après euthanasie des souris, celles-ci ont été rasées, et des biopsies de peau ont été prélevées à l'aide d'un emporte-pièce (Biopsy Punch, Stiefel) sur le dos des souris. Les biopsies ont immédiatement été congelées dans l'isopentane à -80°C . Initialement les biopsies prélevées étaient constituées de la totalité de l'épaisseur de la peau pour un diamètre de 3 mm (calibration à l'aide d'un emporte-pièce). Par la suite, des biopsies d'un diamètre supérieur ont été prélevées ($\geq 5\text{mm}$).

Lors des optimisations, nous avons étudié essentiellement la peau de façon longitudinale, c'est-à-dire de la face supérieure (épiderme) vers la face inférieure (hypoderme) (Figure 87).

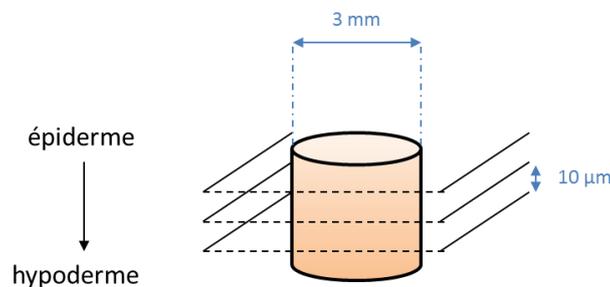


Figure 87 : Découpe longitudinale d'une biopsie de peau.

Les coupes de peau ($10\ \mu\text{m}$) ont été réalisées de la face supérieure, l'épiderme, vers la face inférieure, l'hypoderme, à partir d'une biopsie cutanée de diamètre 3 mm.

Les coupes obtenues dans cette partie, ont été analysées par spectrométrie de masse MALDI. Sauf mention contraire, les coupes ont été balayées manuellement par le laser afin d'obtenir un profil global de la coupe. Ce mode d'acquisition nous permet d'obtenir un profil plus rapidement que le mode d'acquisition automatisé qui réalise un spectre point par point sur la totalité de la coupe.

A/ Optimisation de la découpe de biopsie de peau de souris

La découpe de biopsie a été réalisée à l'aide d'un cryostat LEICA CM1950 (Figure 88). Au sein de ce cryostat se trouve un microtome composé des éléments suivants : un bloc amovible sur lequel on fixe le support d'échantillon, un porte-lame, une lame aiguisée et un système de guide *anti-roll* pour éviter l'enroulement de la coupe de tissu. Dans ce cryostat, la température se règle à deux niveaux : la température de l'enceinte et la température du support sur lequel on dépose l'échantillon.

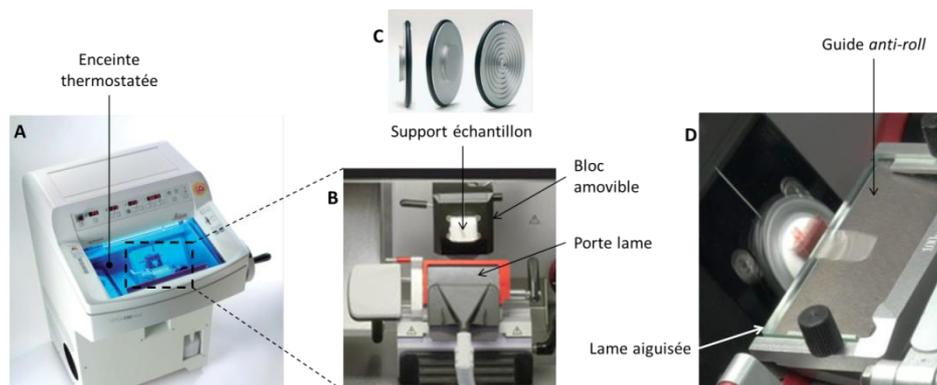


Figure 88 : Description du cryostat LEICA CM1950.

(A) : vue générale du cryostat. (B) : vue générale du microtome. (C) : porte échantillon. (D) : système de guide *anti-roll*.

Comme nous l'avons vu précédemment, il est essentiel d'obtenir de belles coupes de tissu (non déchirées, non écrasées) afin d'obtenir des images de qualité. La température joue un rôle très important dans la réussite de la découpe. En effet, une température trop élevée ramollit le tissu et augmente le risque de déchirure, une température trop basse rend le tissu très fragile et très friable.

La **température** est donc le premier paramètre qui a été optimisé pour de la découpe de la peau. Lors des premiers essais, la température a été fixée uniformément entre l'enceinte et le porte-échantillon à -20°C , température classiquement utilisée pour la peau (Roy *et al.*, 2006). La qualité des coupes obtenues à cette température était très décevante et s'est montrée très dépendante de la biopsie et de la profondeur dans le tissu. En effet, nous avons observé qu'en découpant plus en profondeur dans la peau, le tissu était plus mou et se déchirait plus facilement. Seules quelques biopsies ont pu être récupérées.

Après avoir contacté l'Institut de Dermatologie à Strasbourg, où la découpe de biopsie de peau humaine est réalisée quotidiennement pour l'immuno-histologie (coupes de $4\ \mu\text{m}$ d'épaisseur), nous avons testé une température plus basse, en adéquation avec la forte présence de lipides au sein de ce tissu. Ainsi une température de -30°C a été réglée uniformément entre l'enceinte et le porte échantillon. Malheureusement ces paramètres ne nous ont pas permis d'obtenir des coupes franches, mais des coupes striées et cassantes, suggérant une température trop basse. Nous avons alors appliqué une température différente entre l'enceinte du cryostat, où la température a été augmentée à $-18^{\circ}\text{C}/-22^{\circ}\text{C}$, et le porte échantillon, où la température a été conservée à $-28^{\circ}\text{C}/-30^{\circ}\text{C}$.

Ces température nous ont alors permis d'obtenir des coupes parfaitement adaptées pour l'étude par MALDI-MSI (non déchirée, non striées et d'épaisseur 10 μm), à condition d'ajuster plus finement la température dans les gammes citées en fonction de l'échantillon traité.

Un autre inconvénient capital, découvert lors des premiers essais de découpe, fut l'**enroulement** des coupes. Nous avons alors utilisé le système de guide *anti-roll*, qui permet d'éviter cet enroulement en faisant glisser la coupe entre le porte-lame et une lame en verre. Dans notre cas, la coupe commençait à s'enrouler avant de passer sous la lame en verre, et il en résultait un écrasement de la coupe contre la lame en verre. Il s'est avéré nécessaire d'ajuster au mieux l'alignement entre la lame coupante et la lame de verre du guide *anti-roll*.

Nous avons également observé que la **taille de la biopsie** influençait fortement la qualité de la coupe. En effet, plus le diamètre de la biopsie est faible, et donc plus la surface de contact entre la biopsie et la lame est faible, plus la probabilité d'écraser le tissu sur la lame est grande. Pour les biopsies de diamètre 3 mm initialement prélevées, nous avons essuyé beaucoup d'échecs dans la réussite de l'obtention d'une coupe. Des essais sur les coupes plus grandes (de diamètre minimal de 5 mm) nous ont permis de résoudre ce problème.

B/ Influence de l'étape de lavage avant le dépôt de matrice

Comme nous l'avons vu précédemment, il peut être intéressant de réaliser une étape de lavage à l'éthanol avant le dépôt de la matrice (Schwartz *et al.*, 2003). Nous avons comparé les signaux obtenus pour deux coupes consécutives de peau de souris, l'une lavée à l'éthanol (30 s dans 70 % EtOH puis 30 s dans 95 % EtOH), l'autre non.

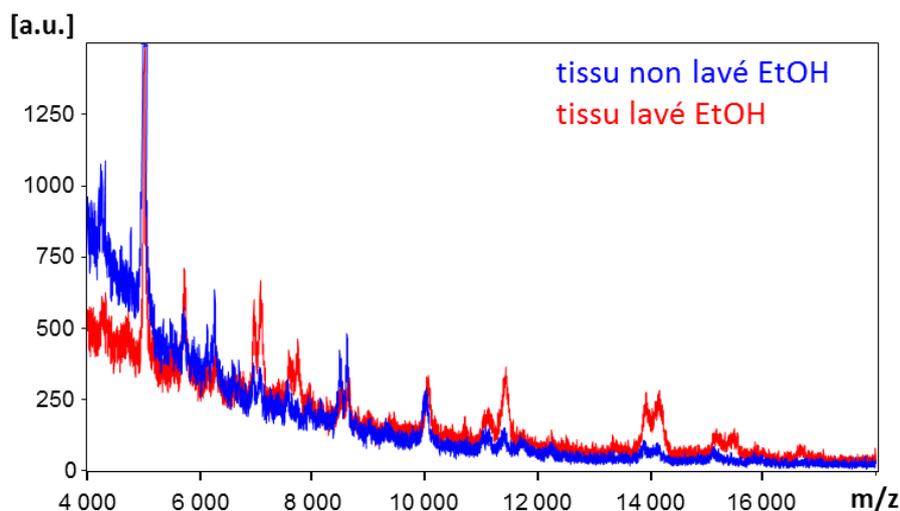


Figure 89 : Influence du lavage à l'éthanol d'une coupe de biopsie de peau de souris.

Température de découpe : - 20°C (enceinte et porte échantillon). Traitement avant le dépôt de matrice : aucun (bleu) et lavage de 30 s dans 70 % d'éthanol puis 30 s dans 95 % d'éthanol (rouge). Dépôt matrice : pipette, 1 μL . Matrice : HCCA 15 mg/mL dans 50 % ACN, 0,1 % TFA.

Sur la Figure 89, nous pouvons observer un signal entre 4 000 et 18 000 m/z pour les deux coupes. Le signal obtenu pour la coupe lavée avec de l'éthanol présente une intensité légèrement plus élevée et ne montre pas de perte de signal par rapport à la coupe non lavée.

Dans une étude postérieure à notre travail, l'isopropanol s'est avéré meilleur que l'éthanol sur des biopsies de peau humaine (Taverna *et al.*, 2011). Ceci nous a conduits à remplacer l'éthanol par l'isopropanol dans la suite de notre étude.

C/ Optimisation de la composition de la solution de matrice

Les choix de la matrice, de son solvant et de son mode de dépôt sont déterminants pour le résultat. Afin de déterminer les conditions optimales pour l'analyse de biopsie de peau, nous avons testé deux matrices classiques (HCCA et SA) en différentes quantités et dans différents solvants ainsi que des matrices ioniques solides. Pour ces tests, les matrices ont été déposées à la pipette (1 μ L).

Tout d'abord, en se basant sur l'expérience du laboratoire d'Archamps, nous avons comparé les matrices HCCA et SA à une concentration de 15 mg/mL et 10 mg/mL, respectivement (Figure 90). Sur cette figure, nous pouvons observer que les pics présents en-dessous de 9 000 m/z sur le profil de la matrice HCCA sont totalement absents sur le profil de la matrice SA. Au-delà de 9 000 m/z, nous observons la présence de pics vers 10 000 - 12 000 m/z dans les deux profils et un pic à 14 000 m/z uniquement présent avec HCCA. Globalement, le spectre est beaucoup plus intense avec la matrice HCCA. Une concentration plus élevée de matrice SA (20 mg/mL) a également été testée dans les mêmes conditions. Bien que le signal soit plus intense par rapport à la matrice SA à 10 mg/mL, il reste toujours inférieur à celui de la matrice HCCA à 15 mg/mL. La matrice HCCA semblait plus adaptée à l'analyse des biopsies cutanées dans cette gamme de m/z.

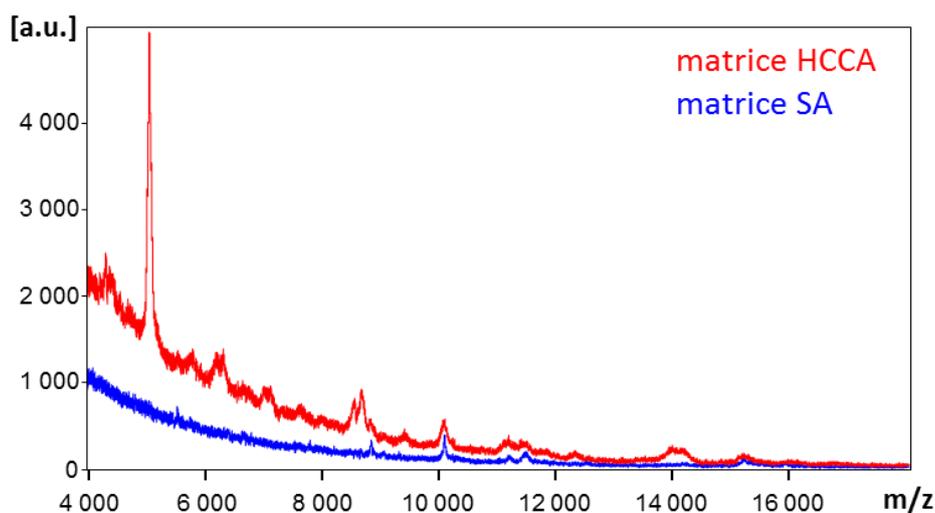


Figure 90 : Comparaison des matrices HCCA et SA.

Température de découpe : porte échantillon = -28°C, enceinte = -22°C. Dépôt de matrice : pipette, 1 μ L. Matrices : HCCA 15 mg/mL dans 50 % ACN, 0,1 % TFA (rouge) et SA, 10 mg/mL dans 50 % ACN, 0,1 % TFA (bleu).

Pour la matrice HCCA, nous avons également testé différentes compositions de solvants organiques afin d'améliorer le signal (P. Bulet, K. Arafah, communication personnelle). Les différents solvants testés ont été les suivants :

- 50 % acétonitrile et 0,1 % TFA,
- 40 % acétonitrile, 10 % acétone et 0,1 % TFA,
- 45 % acétonitrile, 5 % isopropanol et 0,1 % TFA,
- 50 % acétone et 0,1 % TFA,
- 100 % acétone et 0,1 % TFA.

Les résultats ont montré que les trois solutions de matrices à base d'acétonitrile donnaient un profil et une intensité comparables, avec un bruit plus intense pour les matrices contenant de l'acétone ou de l'isopropanol. Pour les deux derniers solvants, composés d'acétone uniquement, aucun signal n'a été observé.

Le faible signal obtenu pour la matrice SA, nous a conduits à tester des matrices solides ioniques (Lemaire *et al.*, 2006b). Nous avons donc comparé les signaux obtenus avec un mélange équimolaire de SA et d'aniline, ou de SA et de trifluorométhylaniline, avec le signal obtenu précédemment pour la matrice SA. Le résultat obtenu pour les matrices SA et SA/aniline sont présentés sur la Figure 91. Nous pouvons observer que la matrice solide ionique apporte une nette amélioration du signal par rapport à la matrice SA seule. Un résultat similaire a été obtenu pour la matrice SA/trifluorométhylaniline (non montré). Si l'on compare maintenant ces profils avec celui obtenu pour la matrice HCCA (Figure 90), nous pouvons remarquer qu'en dessous de 10 000 m/z, les pics sont plus intenses pour la matrice HCCA. Au contraire, au-delà de 10 000 m/z les pics sont plus intenses pour les matrices solides ioniques, avec cependant l'absence du pic à 14 000 m/z. Ces matrices pourraient donc être intéressantes pour la détection de protéines sur des coupes de biopsies de peau de souris.

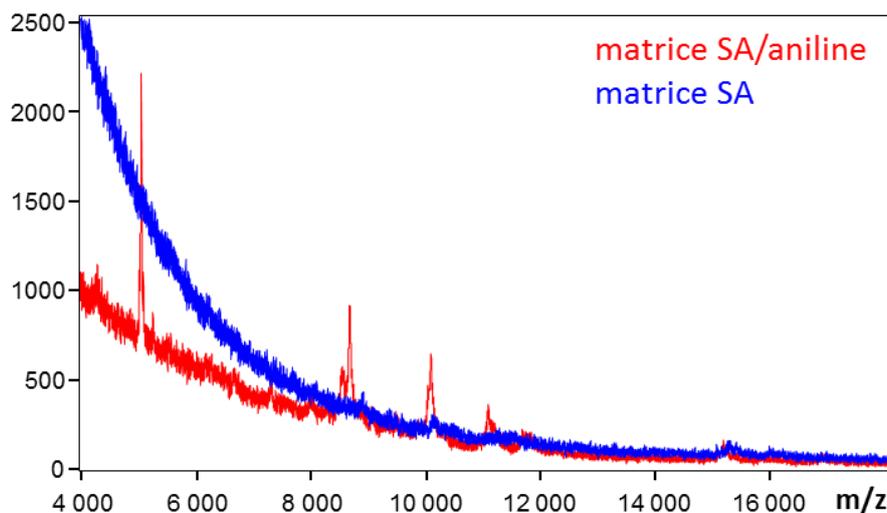


Figure 91 : Influence d'une matrice ionique solide.

Température de découpe : porte échantillon = -30°C, enceinte = -18°C. Dépôt de matrice : pipette, 1 µL. Matrices : SA à 10 mg/mL seule (bleu), en mélange équimolaire avec de l'aniline (rouge), dans 50 % ACN, 0,1 % TFA.

Ces premières optimisations ont donc permis de sélectionner la matrice HCCA dans 50 % d'acétonitrile et 0,1 % TFA pour l'analyse de biopsies de peau de souris par MALDI-MSI. L'utilisation des matrices ioniques peut également être intéressante pour la détection de molécules supérieures à 10 kDa.

D/ Optimisation du dépôt de matrice par spray

Le dépôt de matrice à la pipette présente l'inconvénient majeur d'induire une forte délocalisation des analytes sur les coupes de biopsies. En effet, la goutte déposée, peut, en s'étalant, emporter les molécules. De plus, le dépôt à la pipette souffre d'une faible reproductibilité et d'une faible homogénéité selon les matrices utilisées.

Comme nous l'avons vu, le dépôt de matrice peut être réalisé de deux manières : dépôt par spray ou dépôt régulier de gouttes. Dans le cadre de l'analyse de biopsie de peau de souris, nous avons mis en œuvre le dépôt de matrice par spray. Ce mode de dépôt consiste à nébuliser la solution de matrice afin d'obtenir une couche homogène de matrice sur la coupe. L'application par spray peut se faire manuellement, à l'aide d'un sprayeur pneumatique, ou automatiquement. Dans le cadre de cette thèse, les deux types d'application ont été réalisés. Le nébuliseur automatique utilisé est l'ImagePrep (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne), permettant de vaporiser la matrice par vibration engendrée par une céramique piézoélectrique au travers d'une fine lamelle percée (Figure 92). Le dépôt de matrice est réalisé sous atmosphère contrôlée par cycles, comprenant un spray de matrice, une incubation et un séchage sous flux d'azote.

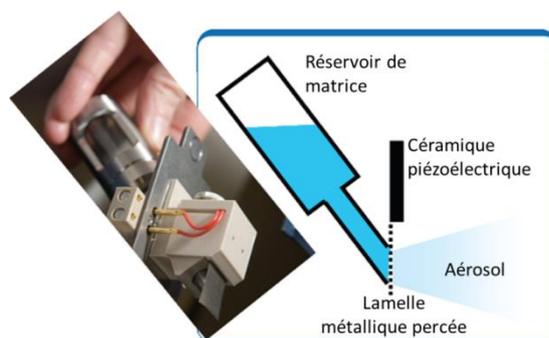


Figure 92 : Nébulisation vibrationnelle créée dans l'ImagePrep (Bruker Daltonics).
D'après le manuel d'utilisation de l'ImagePrep

Lors de l'utilisation de l'ImagePrep, nous nous sommes rapidement heurtés à un problème important : le **décollement du tissu** de la lame ITO. Après quelques cycles de dépôt de matrice, la coupe commençait à se décoller sur les bords. A la fin du dépôt de matrice, la coupe ne tenait plus que par une petite surface sur la lame ITO ou s'était complètement détachée. Ce phénomène de décollement était malheureusement reproductible sur toutes les biopsies cutanées. De plus, afin de déterminer si

ce phénomène était dépendant de la matrice utilisée et de la composition en solvant, différentes solutions de matrice ont été utilisées (Tableau 28). Seule la matrice HCCA à 15 mg/mL dans 50 % d'acétonitrile et 0,1 % de TFA n'a pas engendré de décollement. Cependant, cette matrice déposée par spray n'a pas permis d'obtenir de signal en spectrométrie de masse, contrairement à ce qui avait été observé avec un dépôt pipette (Figure 90).

Matrice	Concentration (mg/mL)	Solvants	Décollement
SA	15	H ₂ O/ACN (40/60) 0,5 % TFA	Oui
SA	15	H ₂ O/ACN (50/50) 0,5 % TFA	Oui
HCCA	15	H ₂ O/ACN (50/50) 0,1 % TFA	Non mais pas de signal
HCCA	7	H ₂ O/ACN (30/70) 0,1 % TFA	Oui

Tableau 28 : Influence de différentes compositions de matrice sur le décollement des coupes de biopsies de peau.
Les solutions de matrice ont été déposées par spray (ImagePrep, Bruker Daltonics)

Parmi les quelques publications traitant d'imagerie par spectrométrie de masse sur des coupes de peau (Bunch *et al.*, 2004 ; Roy *et al.*, 2006 ; Prideaux *et al.*, 2007 ; Marshall *et al.*, 2010 ; Hart *et al.*, 2011 ; Taverna *et al.*, 2011), aucune ne rapportait ce problème de décollement. Cependant, hormis Marshall *et al.* qui ont utilisé des lames ITO et un dépôt de matrice via l'ImagePrep, les autres études ont été faites sur d'autres supports et dans d'autres conditions de dépôt (Tableau 29).

Epaisseur coupe	Support	Matrice	Dépôt matrice	Référence
/	Membrane cellulose	HCCA, 25 mg/mL	Spray sur la membrane	(Bunch <i>et al.</i> , 2004)
20 µm	Lame verre ou inox	HCCA ou DHB, 20 mg/mL 50 % acétone, 50 % méthanol	Spray atmosphérique	(Roy <i>et al.</i> , 2006)
/	Membrane cellulose	HCCA, 25 mg/mL acétone, 0,1 % TFA	Spray sur la membrane	(Prideaux <i>et al.</i> , 2007)
12 µm	Lame ITO	SA, 7mg/mL 50 % ACN, 0,1 % TFA	Spray, ImagePrep (Bruker, Brême, Allemagne)	(Marshall <i>et al.</i> , 2010)
12 µm	Plaque aluminium	HCCA, 5 mg/mL aniline (équimolaire) 70 % éthanol, 0,2 % TFA	Spray, SunCollect™ (KR Analytical, Sandbach, Grande-Bretagne)	(Hart <i>et al.</i> , 2011)
12 µm	Plaque or	SA, 20 mg/mL 50 % ACN, 0,1 % TFA	Gouttes, Portrait 930 (Labcyte, Sunnyvale, CA, USA)	(Taverna <i>et al.</i> , 2011)

Tableau 29 : Epaisseurs de coupes, supports MALDI, matrices et modes de dépôt de matrice dans les différentes études d'imagerie par spectrométrie de masse sur la peau.

Nous avons rapidement mis en cause les lames ITO pour ce problème de décollement. En effet, l'application par spray (ImagePrep) de la matrice sur une lame en verre classique a évité le décollement de la coupe de peau. Le revêtement de la lame ITO semble influencer sur l'adhérence des tissus et, dans le cas de la peau la conséquence est dramatique.

Après discussion avec le groupe de D. Taverna et R. Caprioli, nous avons constaté qu'ils avaient également rencontré des difficultés d'adhérence de coupes de biopsies de peau, non seulement sur les lames ITO mais également sur les plaques en or. Pour résoudre ce problème, Taverna *et al.* ont utilisé un ruban adhésif double face conducteur (communication personnelle). Cette approche est cependant incompatible avec une étape de lavage à l'éthanol ou l'isopropanol qui a tendance à dissoudre la colle du ruban. Etant donné le gain apporté par l'étape de lavage pour nos analyses, nous n'avons pas retenu l'utilisation de ce ruban adhésif. Par ailleurs, ils nous ont également

conseillé d'enrober les lames ITO avec une fine pellicule de poly-lysine afin d'améliorer l'adhérence de biopsie sur la lame.

Nous avons alors appliqué cette technique qui nous avait également été préconisée par Bruker Daltonics. Nous avons ainsi confirmé une adhérence plus forte de la peau avec ces lames traitées et nous n'avons plus observé de décollement de tissu. La nécessité d'un traitement supplémentaire des supports ITO pour l'étude de la peau a été confirmée par une étude récente (Enthaler et al., 2012). Dans cette étude, il est montré qu'un traitement mécanique des lames ITO par décharge corona ou chimique par enrobage des lames d'une fine pellicule de poly-lysine améliore considérablement l'adhérence des coupes de peau et donc le signal en spectrométrie de masse

Le dépôt de matrice HCCA et SA a été retesté dans ces nouvelles conditions : lame ITO/poly-lysine, dépôt par spray ImagePrep. La matrice HCCA a donné cette fois-ci un signal beaucoup moins intense que le signal obtenu avec la matrice SA. Un exemple de profil obtenu avec la matrice SA sur une coupe de biopsie de peau saine est présenté en Figure 93.

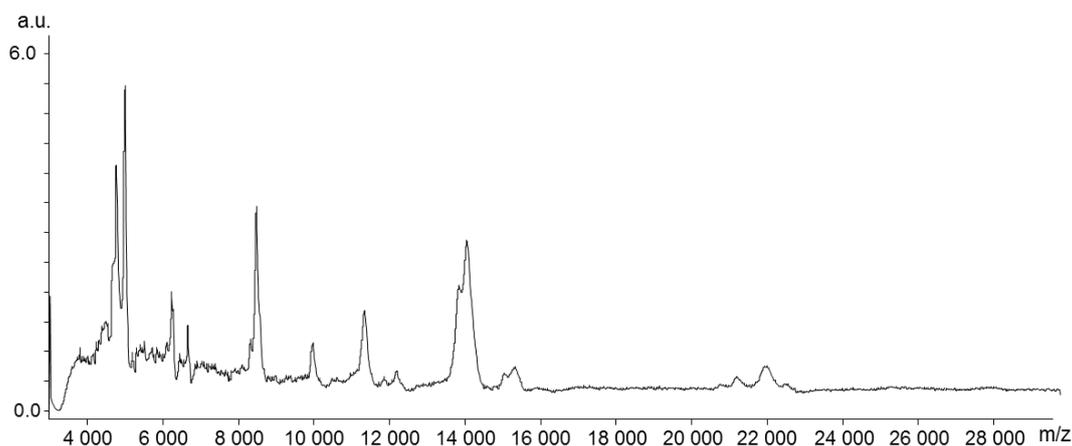


Figure 93 : Exemple représentatif de profil obtenu par MALDI-MSI pour une coupe de biopsie cutanée.
 Température : porte échantillon = -28°C, enceinte = -20°C. Traitement de la lame ITO : enrobage avec poly-lysine.
 Traitement de la coupe avant le dépôt de matrice : lavage de 30 s dans 70 % d'isopropanol puis de 30 s dans 95 % d'isopropanol. Dépôt de matrice : spray (ImagePrep). Matrice : SA, 15 mg/mL dans 50 % ACN, 0,5 % TFA. Acquisition : automatisée point par point sur l'ensemble de la coupe.

La réussite du dépôt de matrice par l'ImagePrep dans ces nouvelles conditions a imposé une nouvelle contrainte : la concentration de la matrice doit être adaptée afin d'éviter l'obstruction de la lamelle utilisée pour la nébulisation vibrationnelle. En effet, si la solution est trop concentrée, la matrice cristallise sur la lamelle, bouche les trous et empêche la formation de l'aérosol. Dans une telle situation, le sprayeur s'arrête et il est nécessaire d'ouvrir l'enceinte sous atmosphère contrôlée afin de nettoyer la lamelle et lancer à nouveau les cycles de spray. Cette contrainte affecte à la fois la reproductibilité du dépôt de matrice entre différents échantillons et l'avantage de l'automatisation de ce dépôt. Une concentration de 5 mg/mL de matrice SA a donc été envisagée, mais a donné des

résultats d'intensité plus faible. Des résultats comparables n'ont pu être obtenus qu'après un second dépôt de matrice à 15 mg/mL. L'utilisation d'une solution de matrice moins concentrée nécessite donc des optimisations plus approfondies (nombre de cycles de spray).

E/ Conclusion

Nous avons dû optimiser un grand nombre de paramètres, avant d'obtenir un profil satisfaisant reproductible pour une coupe de biopsie cutanée de souris. Les conditions retenues sont récapitulées dans le Tableau 30.

Etape de préparation	Paramètres	Conditions optimales
Découpe	Température du cryostat	-18 °C/-22 °C pour l'enceinte -28 °C/-30 °C pour le porte échantillon
	Position du guide <i>anti-roll</i>	Alignement fin entre la lame de rasoir et la lame de verre du guide
	Taille des biopsies	Diamètre ≥ 5 mm
Lavage	Nature du solvant	Isopropanol 10 % puis isopropanol 95 %
Solution de matrice	Composition en dépôt pipette	HCCA 15 mg/mL dans 50 % acétonitrile, 0,1 % TFA
	Composition en dépôt par spray	SA, 15 mg/mL dans 50 % acétonitrile, 0,5 % TFA
Lame ITO	Adhérence des coupes	Enrobage des lames avec de la poly-lysine

Tableau 30 : Conditions retenues pour la préparation de coupes de biopsie de peau en MALDI-MSI.

IV-Optimisation de la détection de la protéine OspC

Afin d'étudier la faisabilité de la détection de la protéine OspC (MM ~ 22 kDa) dans des biopsies de peau, des biopsies de peau saine ont été dopées avec la protéine OspC recombinante. La solution d'OspC a été déposée sur la coupe de biopsie en deux points distincts (2 x 0,3 µg), juste avant le dépôt de la matrice (Figure 94A). L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'obtenir le spectre présenté en Figure 94B. Ce spectre présente un pic majoritaire vers 20 000 m/z, pouvant correspondre à l'ion monochargé d'OspC, et un second pic vers 10 000 m/z, pouvant correspondre à l'ion dichargé d'OspC. Lorsqu'on extrait l'image correspondant au pic de l'ion monochargé, on constate que la localisation de la molécule détectée est en accord avec les dépôts d'OspC (Figure 94C). L'image correspondant au pic de l'ion dichargé a donné le même résultat.

Cependant, nous pouvons remarquer sur le spectre de la Figure 94A une suppression globale du signal par rapport aux spectres obtenus précédemment sur des biopsies de peau saine (Figure 93). Ceci peut être expliqué par la présence d'OspC en forte quantité (2 x 0,3 µg déposé dans deux zones distinctes, soit environ 2 x 7,5 fmol), pouvant induire une suppression de signal en ionisation MALDI.

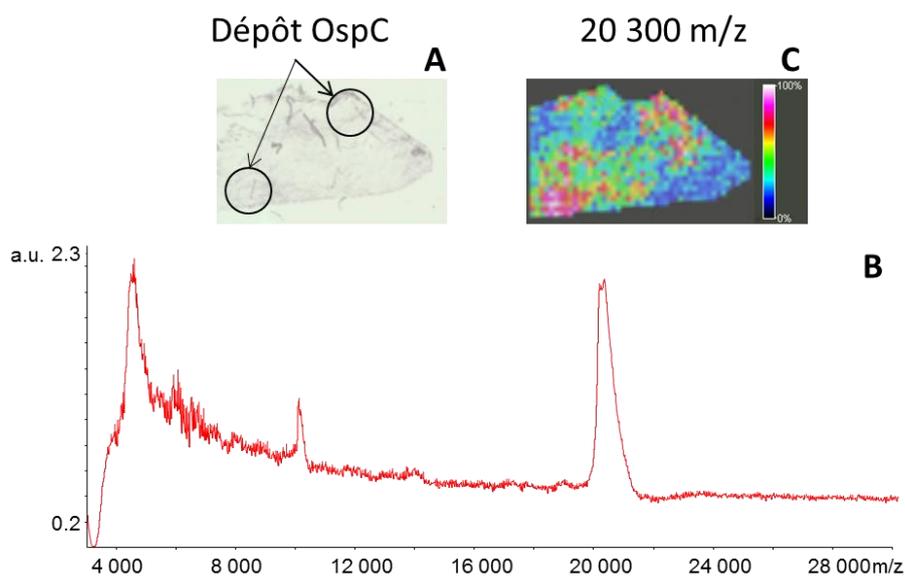


Figure 94 : Analyse MALDI-MSI d'une coupe de biopsie de peau de souris saine dopée avec OspC.

(A) : Image optique et localisation des dépôts d'OspC (2 x 7,5 fmol). (B) : Spectre MALDI-MSI correspondant.

(C) : Image du rapport m/z = 20 300.

Température de découpe : porte échantillon = -28°C, enceinte = -20°C. Traitement avant le dépôt de matrice : lavage de 30 s dans 70 % d'isopropanol puis de 30 s dans 95 % d'isopropanol. Dépôt : spray (ImagePrep). Matrice : SA, 15 mg/mL dans 50 % ACN, 0,5 % TFA.

Dans une expérience préliminaire, nous avons analysé deux biopsies infectées par la bactérie *Borrelia*. L'infection des souris a été réalisée par inoculation intradermique de deux cultures de la bactérie de souches différentes (B31 et N40). L'analyse MALDI-MSI, réalisée dans les mêmes conditions que la biopsie saine dopée avec OspC, n'a pas permis d'obtenir de signal dans la zone attendue, autour de 20 000 m/z. La quantité d'OspC dans les biopsies infectées semble être insuffisante pour être détectée par cette méthode.

A l'avenir, il sera peut être intéressant d'approfondir encore la préparation d'échantillon de biopsies cutanées pour la détection spécifique de cette protéine. Pour cela, les matrices liquides ioniques doivent être envisagées pour améliorer la détection dans les plus hauts rapports m/z. Le dépôt de matrice par goutte pourrait également apporter une amélioration par rapport au dépôt par spray, dans la mesure où l'extraction des analytes de leur environnement biologique est plus efficace avec ce mode de dépôt.

V- Etude longitudinale d'une biopsie de peau

Dans le cadre de nos optimisations nous avons également voulu tester l'impact de la profondeur de la coupe de biopsie de peau.

Lors de l'étude sur la peau de souris saine, nous avons réalisé, après ajustement du plan de coupe, 28 coupes consécutives de 10 μm d'une même biopsie de peau de souris saine. Ces coupes correspondent à une profondeur de 50 μm pour la première et 330 μm pour la dernière. Toutes ces coupes ont été analysées en spectrométrie de masse MALDI, après un dépôt de matrice par spray. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 95. Nous pouvons remarquer que globalement le profil est comparable entre les coupes. Cependant, nous observons très nettement une influence de la profondeur sur l'intensité du signal, avec une intensité maximale observée autour de la huitième coupe, soit une profondeur d'environ 120 μm .

Les analyses précédentes des biopsies de peau saine ont été réalisées entre 50 μm à 100 μm de profondeur dans la peau. Celles des biopsies infectées ont été réalisées à des profondeurs de 50 à 150 μm . Afin d'évaluer l'évolution de la protéine d'intérêt OspC en fonction de la profondeur dans la peau, il sera intéressant dans la suite du projet de réaliser cette même étude sur des biopsies infectées.

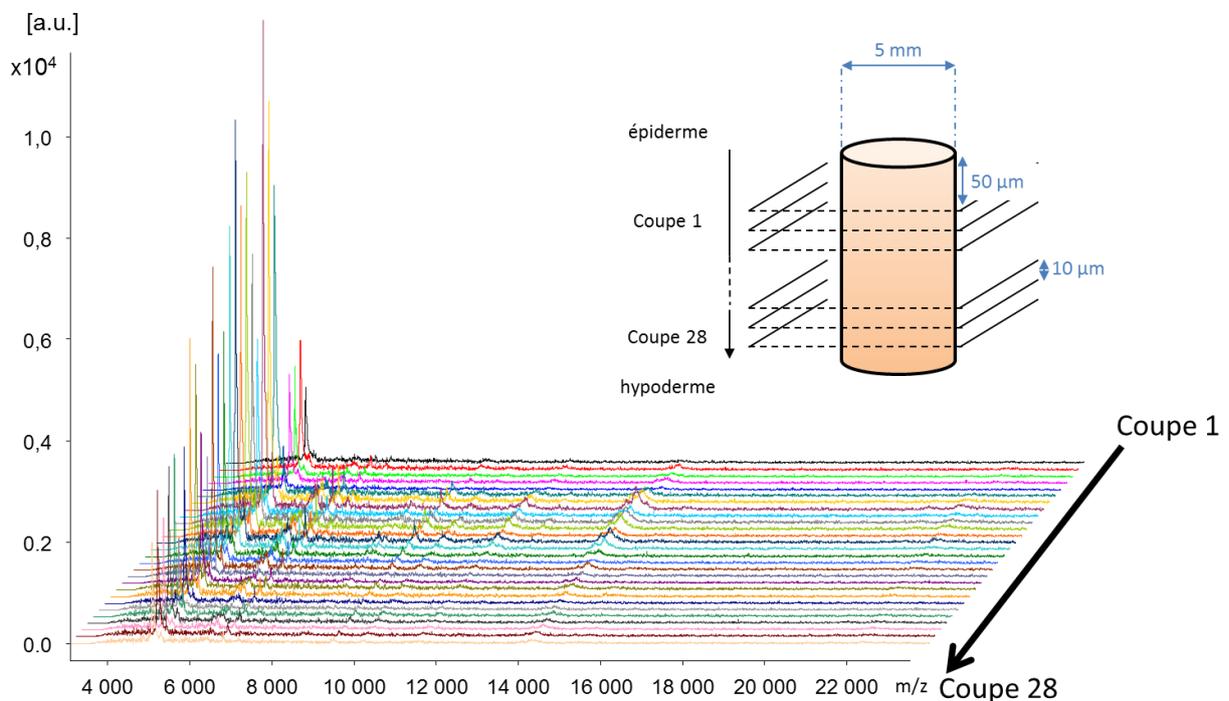


Figure 95 : Influence sur le signal MALDI-MSI de la profondeur dans la peau.

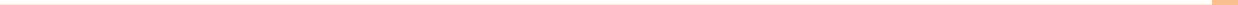
28 coupes de 10 μm d'épaisseur ont été réalisées après avoir ajusté le plan de coupe sur 50 μm .

Traitement avant le dépôt de matrice: lavage de 30 s dans 70 % isopropanol puis de 30 s dans 95 % isopropanol. Dépôt : spray (ImagePrep). Matrice : SA, 15 mg/mL dans 50 % ACN, 0,5 % TFA.

VI-Conclusion

Les différentes optimisations réalisées sur des biopsies de peau de souris ont permis d'obtenir des résultats encourageants, avec une bonne reproductibilité de profil dans des conditions données, et constituent une première étape dans le projet d'imagerie de biopsies cutanées pour la détection de *Borrelia*. Cependant, des efforts doivent être poursuivis pour la détection de la protéine OspC dans des tissus infectés ou d'autres protéines d'intérêt.

Il pourrait également être intéressant de réaliser une digestion enzymatique directement sur la coupe de biopsie de peau, *on tissu* (Lemaire *et al.*, 2007 ; Gagnon *et al.*, 2012). Cette technique présente plusieurs avantages par rapport la méthode développée précédemment. Cela permettrait de pallier l'extraction des protéines, notamment les membranaires, en les coupant en peptides. Il serait également possible d'identifier les protéines présentes sur le tissu en réalisant des analyses MALDI-MS/MS des peptides issus de la digestion. Une approche par digestion *on tissu* (trypsine, pepsine et élastase) a été récemment mise en œuvre sur la peau et a permis d'identifier 10 protéines après élution des peptides et analyse par MALDI-MS/MS (Enthaler *et al.*, 2013).



Conclusion générale



De manière générale, l'ensemble de ce travail m'a conduit à réaliser un grand nombre d'optimisations instrumentales. Le transfert de la méthode chromatographique de la chaîne Agilent 1100series à la chaîne Ultimate U3000 a permis d'améliorer un grand nombre de paramètres sur cet équipement nouvellement acquis par le laboratoire. De manière similaire, l'installation du TSQ Vantage™ et l'optimisation de tous les paramètres permettant de réaliser des analyses LC-SRM dans de bonnes conditions ont été particulièrement enrichissantes, et servent aujourd'hui au laboratoire dans le cadre de tous les autres projets d'analyse quantitative ciblée.

L'objectif de mon travail était de développer des méthodes protéomiques visant une meilleure compréhension des interactions entre les trois acteurs de la maladie de Lyme : la tique *Ixodes*, la bactérie *Borrelia* et l'hôte mammifère.

Pour répondre à cet objectif, j'ai mis au point une méthode RP-HPLC appropriée à l'analyse d'extraits de glandes salivaires de tiques. La quantité d'échantillon biologique disponible étant très faible, j'ai miniaturisé la méthode analytique de manière à pouvoir injecter une quantité inférieure à deux tiques. Cependant, il faut noter une forte variabilité biologique imposant de devoir faire un pool d'au moins six glandes salivaires, avant de réaliser les extraits et d'en analyser une fraction par RP-HPLC.

L'analyse de glandes salivaires de tiques non infectées par *Borrelia*, a permis de mettre en évidence l'activité biologique d'un nombre restreint de fractions sur des cellules de la peau, kératinocytes ou fibroblastes. Des protéines contenues dans ces fractions ont pu être identifiées par une approche de digestion enzymatique en milieu liquide et nanoLC-MS/MS. Toutefois, nous n'avons pas encore réussi à identifier précisément la(les) molécule(s) bioactives. Les perspectives à court terme sont donc de poursuivre l'isolement de ces molécules. Des études sont en cours pour confirmer ou non l'hypothèse d'une synergie entre différentes molécules pour expliquer l'effet cytotoxique sur les fibroblastes. Une telle synergie expliquerait la perte d'activité lorsque la pente du gradient chromatographique diminue et que ces molécules sont isolées dans différentes fractions. L'hypothèse d'une quantité insuffisante de matériel biologique dans nos dernières expériences est également envisagée. Les prochaines analyses chromatographiques seront réalisées à partir d'une quantité plus importante de matériel biologique et devraient permettre d'arriver au terme de l'identification de la (des) molécule(s) active(s) sur les fibroblastes. L'isolement des molécules capables d'inhiber la réponse inflammatoire au niveau des kératinocytes devra également être menée à terme. L'identification de l'ensemble de ces molécules devrait permettre d'apporter des éléments de compréhension sur les mécanismes qui facilitent la transmission de la bactérie *Borrelia* au moment de la piqûre de tique *Ixodes*.

Afin d'étudier si ces protéines bioactives sont régulées par l'infection, les analyses seront étendues à des extraits de glandes salivaires de tiques infectées par la bactérie *Borrelia*. Il sera intéressant d'étudier, non seulement la régulation de ces molécules, mais également de détecter et d'identifier les autres molécules qui seraient surexprimées ou réprimées par l'infection. Là encore la connaissance de ces molécules peut apporter des informations sur les mécanismes d'interactions entre le vecteur et le pathogène, et comment ce dernier peut induire chez le vecteur des effets bénéfiques à sa transmission. Les tiques pourront être infectées par *B. burgdorferi* ss, mais également par d'autres espèces de *Borrelia* (*B. afzelii*, *B. garinii*) pour étudier la spécificité de ces mécanismes, i.e. différentes espèces de pathogénicité différente sont-elles capables d'induire ou de réprimer des molécules différentes ?

Dans le cadre de cette thèse, j'ai également étudié la faisabilité de la détection de la bactérie *Borrelia* dans la peau par spectrométrie de masse SRM. Cette approche a permis de détecter la protéine de surface OspC dans des extraits de biopsies infectées après une étape de préfractionnement par gel SDS-PAGE. De plus, j'ai montré que le seuil de détection de cette protéine dans une biopsie cutanée par SRM était du même ordre de grandeur que l'immuno-détection par Western-blot. Ces résultats sont extrêmement encourageants et ont ouvert la voie vers de nombreuses perspectives.

Afin de confirmer l'applicabilité de notre approche sur des biopsies humaines, nous allons très prochainement analyser des biopsies cutanées prélevées sur des érythèmes migrants de patients atteints par la maladie de Lyme. Une inconnue réside dans la quantité de bactéries *Borrelia* transmises par l'intermédiaire d'une tique infectée. Ces expériences nous permettront d'évaluer si la sensibilité de notre approche SDS-PAGE / SRM est suffisante pour détecter la quantité de bactéries injectées *via* une tique.

Dans le cadre d'une approche diagnostique, l'étape de préfractionnement par gel SDS-PAGE peut être contraignante en termes de délai supplémentaire. Pour cela, nous envisageons la comparaison du préfractionnement par SDS-PAGE avec l'ultrafiltration plus facile à mettre en œuvre et plus rapide.

Nous allons également appliquer notre approche SRM à d'autres protéines de *Borrelia*. En effet, dans le cadre d'autres travaux réalisés au laboratoire (thèse Gilles Schnell, en cours), des candidats de virulence bactérienne ont été identifiés par une approche différentielle *in vitro* entre différentes espèces et différents clones de *Borrelia*. Une validation de ces candidats *in vivo* est en cours et les candidats validés seront sélectionnés pour une détection par SRM dans des biopsies cutanées.

Enfin, dans un troisième volet, j'ai réalisé une étude préliminaire pour la détection de *Borrelia* directement à la surface de la peau par imagerie MALDI-MSI. Cette étude a permis d'optimiser les étapes cruciales de préparation d'échantillon spécifiques à la peau. La technique d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI présente l'avantage de fournir des informations de localisation qui ne sont pas obtenues en analyse protéomique classique. Ce travail exploratoire a mis en évidence la difficulté de travailler sur la peau mais j'ai réussi à obtenir des profils reproductibles pour des coupes de biopsies cutanées et j'ai montré que la protéine OspC déposée à la surface de la peau pouvait être détectée. D'autres optimisations sont encore nécessaires pour la détection d'OspC dans des biopsies cutanées infectées par *Borrelia*. Si cette approche est validée pour OspC, elle pourra être appliquée à d'autres protéines de *Borrelia*.



Partie expérimentale



I- Origine des réactifs

L'acétonitrile utilisé pour la séparation de glandes salivaires provient de Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). L'acétonitrile utilisé pour les analyses nanoLC-MS/MS provient de SDS. L'iodoacétamide (IAA), le persulfate d'ammonium (APS), le tetramethylethylènediamine (TEMED), la glycine, le bleu de Coomassie (CBB) G250, les marqueurs de poids moléculaire Precision Plus Protein™ Dual Color, les réactifs des dosages Protein Assay (Bradford) et DC Assay (Lowry) proviennent de Bio-Rad (Munich, Allemagne). Le digestat d'albumine de sérum bovin (BSA) et les matrices Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) et acide sinapinique (SA) proviennent de Bruker Daltonics (Brême, Allemagne). Le kit ECL provient de GE Healthcare (Little Chalfont, UK). La trypsine « Sequencing Grade » provient de Promega (Madison, USA). Le lait écrémé est commercialisé par Régilait (Saint Martin Belle Roche, France). L'acide trifluoroacétique (TFA), l'acide formique (FA), l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide acétique (AcOH), l'acétone, l'isopropanol, le méthanol, le Tris (sous forme Tris base), la solution à 30% d'acrylbisacrylamide (ratio 37,5 :1), le dodécylsulfate de sodium (SDS), le dithiothréitol (DTT), le glycérol, le bleu de bromophénol, l'hydrogénocarbonate d'ammonium, l'urée, la thiourée, le chlorure de sodium (NaCl), l'octylglucoside, le Triton X100, le 3-[3-cholamidopropyl]diméthylammonio]-propanesulfonate (CHAPS), le sulfate d'ammonium, le tampon phosphate salin (PBS), le Tween X100, les anticorps secondaires anti IgG de souris, la polylysine et l'igepal proviennent de Sigma-Aldrich (St Louis, USA). L'acide phosphorique provient de VWR (West Chester, USA). Les cultures bactériennes et la protéine OspC sont fournies par l'institut de bactériologie. L'anticorps primaire anti-OspC a été donné par J. Hovius.

II- Chapitre III

A/ Préparation des extraits de glandes salivaires

L'élevage de tiques et l'infection de celles-ci sont maintenus par nos collaborateurs à l'institut de bactériologie (Dr N. Boulanger). Pour l'obtention de tiques infectées, un repas sanguin est imposé sur souris infectées au stade larvaire. Le contrôle de l'infection se fait par PCR sur un échantillon de tiques ayant mué en nymphe. Les nymphes obtenues après cette infection sont nourries sur souris saine, et la dissémination de la bactérie chez cette souris est contrôlée dans différents organes (articulation, cœur, vessie et oreille).

Les tiques ont été disséquées par nos collaborateurs et les glandes salivaires placées dans environ 50 μ L de tampon PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Afin de lyser les cellules, trois cycles de congélation/décongélation (-20°C, 10 min/température ambiante, 5 min) ont été réalisés puis le mélange a été agité vigoureusement (vortex) puis soumis aux ultrasons pendant 15 min à 4°C. Après centrifugation (10 000 g, 4°C, 10 min), le culot contenant les débris cellulaires a été éliminé. Le surnageant a été concentré sous vide (SpeedVac) jusqu'à quelques μ L (en évitant la concentration à sec), puis repris dans une solution aqueuse de 0,5 % de TFA.

Une paire de glandes salivaires correspond aux glandes salivaires d'une tique, par la suite nous utiliserons le terme « équivalent tique » pour parler d'une paire de glandes salivaires.

Les solutions ont été conservées jusqu'aux analyses HPLC à 4°C si l'injection avait lieu dans les 7 jours ou à -20°C si le délai était plus long. Au moment de l'analyse, elles ont été vortexées puis centrifugées (12 100 g, temp. ambiante, 5 min). Le surnageant a été injecté.

B/ Mise au point de la méthode chromatographique sur la chaîne Agilent Technologies

Lors de la mise au point des conditions chromatographiques, les analyses ont été réalisées sur un système HPLC Agilent 1100series (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Cette chaîne était composée d'un injecteur automatique réfrigéré (G1377A μ -WPS et G1330B ALS Therm), d'un dégazeur (G1379A Degasser), d'une pompe binaire (G1376A CapPump), d'une pompe isocratique (G1310A IsoPump), d'un détecteur UV (G131GA DAD) et d'un collecteur de fraction réfrigéré (G1364A Micro-FC et G1330B ALS Therm). Elle était équipée d'une pré-colonne Agilent Zorbax 300SB-C18 (1 mm x 17 mm, 5 μ m) et d'une colonne Agilent Zorbax SB-C18 (500 μ m x 15 cm, 5 μ m).

Optimisation de l'agent d'appariement d'ions

L'influence de l'agent d'appariement d'ions, acide formique (FA) ou acide trifluoroacétique (TFA), a été considérée sur 1 pmol d'un digestat tryptique de BSA (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne).

Dans le cas du FA, les solvants de la voie A de la pompe binaire et de la pompe de chargement (pompe isocratique) étaient constitués d'un mélange composé de 98 % (v/v) H₂O, 2 % (v/v) ACN et 0,1 % (v/v) FA. Celui de la voie B de 98 % (v/v) ACN, 2 % (v/v) H₂O et 0,1 % (v/v) FA.

Dans le cas du TFA, le solvant de la voie A de la pompe binaire était constitué d'un mélange composé de 100 % H₂O et 0,05 % (v/v) TFA, et celui de la voie B de 100 % ACN et 0,045 % (v/v) TFA. Le solvant de la pompe de chargement était constitué de 100 % H₂O et 0,1 % TFA.

1 µL d'une solution de digestat de BSA à 1 pmol/µL a été chargé pendant 3 min sur la pré-colonne à un débit de 50 µL/min puis élués sur la colonne à un débit de 11 µL/min. Le gradient délivré par la pompe binaire était le suivant : isocratique à 5 % B pendant 5 min suivi d'un gradient de 5 % à 55 % B en 50 min puis de 55 % à 70 % B en 5 min et enfin isocratique de 5 min à 70 % B. La colonne a ensuite été rééquilibrée à 5 % B. Les peptides ont été détectés par spectrophotométrie à $\lambda_{\text{dét}}$ 214 nm dans une cellule de mesure de 500 nL avec un chemin optique de 10 mm.

Optimisation du gradient d'éluion

Le gradient d'éluion a été mis au point sur des extraits de glandes salivaires de tiques non infectées et non nourries à une concentration de 1,4 équivalent tique/5 µL en utilisant le TFA comme agent d'appariement d'ions. 5 µL (soit l'équivalent de 1,4 tiques) a été chargé pendant 3 min sur la pré-colonne à un débit de 50 µL/min puis élués sur la colonne à un débit de 11 µL/min. Les différents gradients testés sont présentés dans le tableau 1 du chapitre III. Les peptides ont été détectés par spectrophotométrie à $\lambda_{\text{dét}}$ 214 nm dans une cellule de mesure de 500 nL avec un chemin optique de 10 mm.

C/ Analyse d'extraits de glandes salivaires sur la chaîne Agilent Technologies

L'étude des conditions biologiques optimales et l'analyse différentielle ont été réalisées sur la chaîne Agilent Technologies selon les conditions optimisées précédemment (agent d'appariement d'ions : TFA et gradient : isocratique à 2 % B pendant 5 min suivi d'un gradient de 2 % à 9,5 % B en 15 min puis d'un gradient de 9,5 % à 29,5 % B en 80 min et d'un gradient de 29,5 % à 59,5 % B en 60 min) et à partir d'extraits de glandes salivaires de tiques à une concentration de 1 équivalent tique/2 µL.

Pour l'optimisation des conditions biologiques, les tiques étaient non infectées et non nourries pour la comparaison des stades de la tique (GSadulte et GSnymphe) ; non infectées et non nourries ou nourries pendant trois jours pour l'analyse de l'influence du repas sanguin (GSng et GSJ+3) ; non

infectées et nourries selon différentes durées (GSJ+3, GSJ+5, GSJ+7) pour la détermination de la durée de repas sanguin optimale. Pour l'analyse différentielle, les tiques étaient infectées ou non et nourries pendant trois ou cinq jours.

Un volume de 5 μL (soit l'équivalent de 2,5 tiques) a été chargé pendant 3 min sur la pré-colonne à un débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ puis élués sur la colonne à un débit de 11 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les peptides ont été détectés par spectrophotométrie à $\lambda_{\text{dét}}$ 214 nm dans une cellule de mesure de 500 nL avec un chemin optique de 10 mm.

Pour l'analyse différentielle, les fractions d'intérêt ont été digérées par la trypsine selon le protocole optimisé (tampon NH_4HCO_3 25 mM, pH 8,8), les digestats ont été analysés par nanoLC-MS/MS et les protéines ont été identifiées par une approche PFF. Les différents protocoles correspondants sont présentés plus loin.

D/ Transfert de la méthode sur la chaîne Thermo Fischer Scientific

Optimisation de l'injection

Le mode d'injection *User Define Programm* (UDP) permet de programmer une injection selon un protocole personnalisé. Un programme compatible avec notre configuration de collecte a été développé. Il permet de prélever X μL d'échantillon en mimant le mode d'injection *$\mu\text{L pick-up}$* à l'aide des étapes suivantes :

- La vanne de la seringue se positionne de façon à connecter la seringue avec la vanne d'injection.
- La vanne d'injection se positionne en *Load*. La seringue est alors connectée à la boucle d'injection et à l'aiguille.
- 20 μL de liquide de transport sont prélevés grâce au déplacement du piston de la seringue.
- La vanne de la seringue se positionne de façon à connecter la seringue avec la poubelle.
- La seringue se vide dans la poubelle.
- La vanne de la seringue se positionne de façon à connecter la seringue avec la vanne d'injection.
- X μL d'échantillon sont prélevés dans le *vial* par déplacement du piston de la seringue.
- Y μL de liquide de transport sont prélevés grâce au déplacement du piston de la seringue. La valeur Y doit être ajustée en fonction de la valeur de X de façon à positionner le volume d'échantillon prélevé au milieu de la boucle.
- L'aiguille se positionne au-dessus du port de lavage.
- La vanne d'injection se positionne en *Inject*. La seringue est alors connectée à la boucle d'injection et à l'aiguille.

L'optimisation de la profondeur de pénétration optimale de l'aiguille lors du prélèvement dans une plaque 96 puits a été ajustée au niveau des paramètres *sample height* et *sample height offset* par

essais successifs et appréciation visuelle de l'utilisateur. Les valeurs adaptées à la collecte de fractions sont : *sample height* = 0 mm et *sample height offset* = 0 mm.

La répétabilité de ce mode d'injection a été évaluée. Trois injections de 1 μL d'une solution de digestat de BSA à 1 pmol/ μL en mode UDP ont été réalisées. Le μL de solution de digestat a été chargé pendant 3 min sur une pré-colonne Agilent Zorbax 300SB-C18 (1 mm x 17 mm, 5 μm) à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec 100 % H_2O et 0,1 % TFA. Puis les peptides ont été élués sur une colonne Agilent Zorbax SB-C18 (500 μm x 15 cm, 5 μm) à un débit de 11 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec les éluants suivants : A : H_2O et 0,05 % (v/v) TFA ; B : ACN et 0,045 % (v/v) TFA. Le gradient était le suivant : isocratique à 5 % B pendant 5 min suivi d'un gradient de 5 % à 55 % B en 50 min puis de 55 % à 70 % B en 5 min et enfin un isocratique de 5 min à 70 % B. La colonne a ensuite été rééquilibrée à 5 % B. Les peptides ont été détectés par spectrophotométrie à $\lambda_{\text{dét}}$ 214 nm dans une cellule de mesure de 45 nL avec un chemin optique de 10 mm.

Optimisation de la collecte de fractions

L'optimisation de la profondeur de pénétration optimale de l'aiguille de collecte dans une plaque 96 puits scellée avec un film aluminium a été ajustée au niveau des paramètres *sample height* et *sample height offset* par essais successifs et appréciation visuelle de l'utilisateur. Les valeurs adaptées à la collecte de fractions sont : *sample height* = 1 mm et *sample height offset* = 0,5 mm.

Optimisation de la détection

Pour l'optimisation de la détection, les paramètres suivants ont été évalués : le volume de la cellule de mesure sur spectrophotomètre (45 nL ou 180 nL), la longueur d'onde de détection (200 nm, 214 nm ou 220 nm) et le mode d'injection (UDP ou *full loop*).

1 μL de solution de digestat à 1 pmol/ μL a été injecté dans les mêmes conditions que lors de l'optimisation de l'injection, mis à part les paramètres évalués.

Pour la comparaison des deux détecteurs Thermo Fischer Scientific et Agilent Technologies nous avons installé une unité de conversion UCI-100 (Thermo Fischer Scientific) sur la chaîne Thermo Fischer Scientific pour pouvoir acquérir les données du détecteur Agilent Technologies sur un système d'acquisition Thermo Fischer Scientific, toutes choses étant égales par ailleurs.

Quatre pmoles de digestat de BSA ont été injectées sur le système Thermo Fischer Scientific équipé du détecteur Thermo Fischer Scientific dans les mêmes conditions que précédemment (injection UDP, $\lambda_{\text{dét}}$ 214 nm et cellule UV 45 nL) mais équipé d'une pré-colonne Dionex Acclaim *PepMap* C18, 500 μm x 15 mm et d'une colonne Dionex Acclaim *PepMap* C18, 300 μm x 15 cm, 3 μm . Puis, Quatre pmoles de digestat de BSA ont été injectés sur le système Thermo Fischer Scientific équipé du détecteur Agilent Technologies (injection UDP, $\lambda_{\text{dét}}$ 214 nm, cellule UV 500 nL) avec les mêmes précolonne et colonne.

Transfert de méthode : changement de colonne

Quatre pmoles de digestat de BSA ont été injectées sur le système Thermo Fischer Scientific dans les mêmes conditions que précédemment (injection UDP, détecteur Thermo Fischer Scientific, $\lambda_{\text{dét}}$ 214 nm, cellule UV 45 nL) et équipé d'une pré-colonne Dionex Acclaim *PepMap* C18, 500 μm x 15 mm et des colonnes Dionex Acclaim *PepMap* C18, 300 μm x 15 cm, 3 μm ou Dionex Acclaim *PepMap* C18, 300 μm x 15 cm, 2 μm .

E/ Analyse d'extraits de glandes salivaires sur la chaîne Thermo Fischer Scientific

Pour l'étude de reproductibilité biologique et l'analyse d'extrait de glandes salivaires des tiques non infectées, les analyses ont été réalisées sur le système U 3000 (Thermo Fischer Scientific, San Jose, USA) décrit précédemment à partir d'extrait des glandes salivaires de tiques non infectées et nourries pendant 3 jours (GSnegJ+3).

Pour l'analyse de reproductibilité, trois extraits indépendant de glandes salivaires à une concentration de 2 équivalent tique/5 μL ont été analysés (injection UDP, plaque de collecte scellée par un film d'aluminium, pré-colonne Dionex Acclaim *PepMap* C18, 500 μm x 15 mm, colonne Dionex Acclaim *PepMap* C18, 300 μm x 15 cm, 3 μm). Un volume de 5 μL (soit l'équivalent de 2 tiques) a été chargé pendant 3 min sur la pré-colonne à un débit de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec H_2O et 0,1 % (v/v) TFA. Puis les molécules ont été éluées sur la colonne à un débit de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec les éluants suivants : A : H_2O et 0,05 % (v/v) TFA ; B : ACN et 0,045 % (v/v) TFA. Le gradient était le suivant : isocratique à 2 % B pendant 5 min. Gradient de 2 % à 9,5 % B en 15 min. Gradient de 9,5 % à 24,5 % B en 150 min. Gradient de 24,5 % à 59,5 % B en 70 min. Après un isocratique de 5 min à 70 % B, la colonne a été rééquilibrée à 2 % B. Les molécules ont été détectées par spectrophotométrie à $\lambda_{\text{dét}}$ 214 nm dans une cellule de mesure de 45 nL avec un chemin optique de 10 mm.

Pour l'analyse d'extrait de glandes salivaires des tiques non infectées, un extrait à une concentration de 1 équivalent tique/ μL a été analysé (injection UDP, plaque de collecte scellée par un film d'aluminium, pré-colonne Dionex Acclaim 300 C18, 500 μm x 15 mm, 5 μm , colonne Agilent Zorbax 300SB-C18, 300 μm x 15 cm, 3,5 μm). Un volume de 3 μL (soit l'équivalent de 3 tiques) a été injecté pour les tests réalisés sur FBs, de 5 μL (soit l'équivalent de 5 tiques) pour les tests réalisés sur KCs et de 3 μL (soit l'équivalent de 3 tiques) pour l'identification des protéines par nanoLC-MS/MS. Le volume a été chargé pendant 3 min sur la pré-colonne à un débit de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec H_2O et 0,1 % (v/v) TFA. Puis les molécules ont été éluées sur la colonne à un débit de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec les éluants suivants : A : H_2O et 0,05 % (v/v) TFA ; B : ACN et 0,045 % (v/v) TFA. Le gradient était le suivant : isocratique à 2 % B pendant 5 min suivi d'un gradient de 2 % à 9,5 % B en 15 min puis de 9,5 % à 29,5 % B en 80 min et de 29,5 % à 59,5 % B en 60 min. Après un isocratique de 5 min à 80 % B, la colonne

a été rééquilibrée à 2 % B. Les molécules ont été détectées par spectrophotométrie à $\lambda_{\text{dét}}$ 214 nm dans une cellule de mesure de 45 nL avec un chemin optique de 10 mm.

Mise au point de la préparation d'échantillon suite à des problèmes de précipitation

Après avoir observé à deux reprises des problèmes de précipitation des protéines avec le protocole de préparation d'échantillon (trois cycles de congélation/décongélation, agitation vigoureuse (vortex), sonication, centrifugation, évaporation du surnageant et reprise dans eau acidifiée 0,5 % TFA), un protocole sans sonication et un protocole sans sonication et sans évaporation du tampon PBS ont été testés.

Le protocole retenu est le suivant :

Après dissection, les glandes salivaires ont été reprises dans un minimum de tampon PBS (environ 50 μL), puis ont subi trois cycles de congélation/décongélation (-80°C)/agitation vigoureuse. Après centrifugation (10 000g, 4°C , 10 min), une mesure de concentration de protéines (Bio-Rad *Protein Assay*) a été effectuée ont montré que le surnageant contenait entre 8 et 12 μg de protéine / tique selon les dissections. Ce protocole a été réalisé par nos collaborateurs avant de réaliser un test de l'activité lytique sur les FBs afin de vérifier l'activité de l'extrait protéique non séparé par RP-HPLC. Un volume de ce surnageant addition de TFA afin d'obtenir une concentration finale de 0,1 % a ensuite été injecté.

F/ Couplage microHPLC-UV-MS

La chaîne chromatographique Agilent Technologies a été couplée à un spectromètre de masse HCT Ultra (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne). Ce spectromètre de masse de type ESI-IT, a été étalonné avec des composés de référence (Tuning Mix ES, Agilent Technologies).

Les analyses ont été menées en mode d'ionisation ESI positif. Les paramètres généraux du spectromètre de masse ont été les suivants : tension capillaire, $-4\ 000\ \text{V}$; gaz de séchage, 6 L/température de séchage, 300°C . Les analyses MS ont été réalisées dans le mode de résolution "standard enhanced" à une vitesse de balayage de $8100\ \text{m/z}\cdot\text{s}^{-1}$ entre 290 m/z et 2 800 m/z avec un contrôle de la charge d'ions à 100 000 dans un temps de remplissage maximal de 200 ms. Un total de 5 spectres MS a été moyenné pour obtenir les spectres MS finaux. L'ensemble du système était contrôlé par les programmes ChemStation Rev. B.01.03 (Agilent Technologies) et EsquireControl 6.1 Build 78 (Bruker Daltonics).

G/ Mise au point de la digestion enzymatique

Un extrait de glandes salivaires de tiques non infectées et nourries pendant trois jours a été analysé par la méthode RP-HPLC développée. Les fractions ont ensuite été digérées par la trypsine selon les différents protocoles présentés dans le tableau 3 du chapitre III. Pour plus de clarté, l'exemple de la comparaison entre les protocoles 1 et 2 sera utilisé. Les autres comparaisons ont été réalisées de la même manière.

Les mêmes cinq fractions de l'extrait de glandes salivaires de tiques ont été digérées selon les deux protocoles à comparer. Après la collecte, les fractions ont été évaporées sous vide (SpeedVac) jusqu'à un volume minimal en évitant une évaporation à sec. Après reprise des fractions dans 10 μL H_2O , et transfert de la moitié du volume dans une nouvelle plaque, 20 μL de tampon du protocole 1 ont été ajoutés dans la première plaque et 20 μL de tampon du protocole 2 dans la seconde plaque.

Pour l'étape de réduction, 1 μL d'une solution de DTT 210 mM a été ajouté de manière à obtenir une concentration finale de 10 mM DTT, puis les fractions ont été incubées 1 h à 60 °C (dans le cas du protocole 5 uniquement, la réduction a été réalisée par ajout de 1 μL de DTT 252 mM -12 mM DTT final- puis incubation de 30 min à 37 °C). Pour l'étape d'alkylation, 1 μL d'une solution d'IAA à 660 mM a été ajouté de manière à obtenir une concentration finale de 30 mM IAA, puis les fractions ont été incubées 1 h à température ambiante dans le noir (dans le cas du protocole 5 uniquement, l'alkylation a été réalisée par ajout de 1 μL de DTT 880 mM -40 mM IAA final- puis incubation 1 h à température ambiante dans le noir). L'étape de digestion a été réalisée par l'ajout de 2 μL d'une solution de trypsine à 25 ng/ μL suivi d'une incubation à 37°C pendant une nuit. L'arrêt de la digestion a été provoqué par l'ajout de 5 μL d'une solution aqueuse à 0,1% TFA dans chaque fraction. Les solutions ont été évaporées sous vide (SpeedVac) puis reprises dans 5 μL d'une solution aqueuse à 0,1% TFA et injectées en nanoLC-MS/MS.

Les analyses nanoLC-MS/MS ont été réalisées sur un système Agilent 1200 Series HPLC-Chip/MS (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) couplé à un spectromètre de masse amaZon (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) dans les conditions présentées dans le paragraphe suivant. L'identification des protéines est présentée plus loin.

H/ Analyses nanoLC-MS/MS des fractions digérées

Pour l'optimisation du protocole de digestion et l'identification des molécules contenues dans les fractions collectées lors de l'analyse des glandes salivaires de tiques non infectées, les analyses nanoLC-MS/MS ont été réalisées sur un système Agilent 1200 Series HPLC-Chip/MS (Agilent

Technologies, Palo Alto, USA) couplé à un spectromètre de masse amaZon (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne).

Pour l'identification des molécules contenues dans les fractions collectées lors de l'analyse différentielle des glandes salivaires de tiques infectées ou non par *Borrelia*, les analyses nanoLC-MS/MS ont été réalisées sur un système Agilent 1100 Series HPLC-Chip/MS (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) couplé à un spectromètre de masse HCT Plus ion trap (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne).

Dans les deux cas, les puces microfluidiques utilisées contenaient une pré-colonne d'enrichissement Zorbax 300SB-C18 (volume 40 nL, 5 µm, 300 Å) et une colonne Zorbax 300SB-C18 (43 mm x 75 µm, 5 µm, 300 Å). Le mélange peptidique a été chargé pendant 3 min sur la pré-colonne à un débit de 3,75 µL/min avec 98 % (v/v) H₂O, 2 % (v/v) ACN + 0,05 % (v/v) FA. Puis les peptides ont été élués sur la colonne à un débit de 300 nL/min avec les éluants suivants : A : 98 % (v/v) H₂O, 2 % (v/v) ACN + 0,05 % (v/v) FA ; B : 98 % (v/v) ACN, 2 % (v/v) H₂O + 0,05 % (v/v) FA. Le gradient était le suivant : 10 à 30 % B en 1,5 min puis 30 à 60% B en 7,5 min, suivi d'un isocratique de 5 min à 85 % B. La colonne a ensuite été rééquilibrée à 10 % B.

Le spectromètre de masse ESI-IT amaZon, a été étalonné avec des composés de référence (Tuning Mix ES (Agilent Technologies)). Les analyses ont été menées en mode d'ionisation ESI positif. Les paramètres généraux du spectromètre de masse ont été les suivants : tension capillaire, -1 850V ; gaz de séchage, 4 L/min ; température de séchage, 145°C ; passage automatique entre les modes MS et MS/MS. Les analyses MS ont été réalisées dans le mode de résolution « *enhanced resolution* » à une vitesse de balayage de 8 100 m/z.s⁻¹ entre 250 m/z et 1 500 m/z avec un contrôle de la charge d'ions à 200 000 dans un temps de remplissage maximale de 200 ms. Un total de 2 spectres MS a été moyenné pour obtenir les spectres MS finaux. Les 6 ions les plus intenses de chaque spectre MS, préférentiellement doublement ou triplement chargés sont sélectionnés dans une fenêtre de 4 m/z pour être isolés et fragmentés. Après avoir été sélectionnés une fois (1 spectre MS/MS), les ions ont été exclus pendant 0,12 min. L'analyse MS/MS est réalisée dans le mode de résolution « *ultrascan* » à une vitesse de balayage de 32 500 m/z par seconde entre 100 m/z et 2 000 m/z avec un contrôle de la charge d'ions à 300 000. Un total de 2 spectres MS/MS est moyenné pour obtenir les spectres MS/MS finaux. L'ensemble du système était contrôlé par les programmes HyStar 3.2 et Trap control 7.0 (Bruker Daltonics).

Le spectromètre de masse ESI-IT HCT Plus, a été étalonné avec des composés de référence (Tuning Mix ES (Agilent Technologies)). Les analyses ont été menées en mode d'ionisation ESI positif. Les paramètres généraux du spectromètre de masse ont été les suivants : tension capillaire, -1 750V ; gaz de séchage, 4 L/min ; température de séchage, 325°C ; passage automatique entre les modes MS et MS/MS. Les analyses MS ont été réalisées dans le mode de résolution « *standard enhanced* » à une vitesse de balayage de 8 100 m/z.s⁻¹ entre 250 m/z et 1 500 m/z avec un contrôle de la charge d'ions à 100 000 dans un temps de remplissage maximale de 200 ms. Un total de 3 spectres MS a été moyenné pour obtenir les spectres MS finaux. Les 3 ions les plus intenses de chaque spectre MS,

préférentiellement doublement ou triplement chargés sont sélectionnés dans une fenêtre de 4 m/z pour être isolés et fragmentés. Après avoir été sélectionnés une fois (1 spectre MS/MS), les ions ont été exclus pendant 0,12 min. L'analyse MS/MS est réalisée dans le mode de résolution « *ultrascan* » à une vitesse de balayage de 26 000 m/z par seconde entre 100 m/z et 2 000 m/z avec un contrôle de la charge d'ions à 300 000. Un total de 3 spectres MS/MS est moyenné pour obtenir les spectres MS/MS finaux. L'ensemble du système était contrôlé par les programmes ChemStation Rev. B.01.03 (Agilent Technologies) et EsquireControl 5.3 Build 11 (Bruker Daltonics).

I/ Identification des protéines

Les banques de données SwissProt, UniProtKB et NCBI nr des organismes *Ixodes*, *I. ricinus* et *I. scapularis* ont été générées à l'aide de l'interface MSDA développée au sein du laboratoire (<https://msda.unistra>).

Les données brutes (*.raw) acquises lors des analyses LC-MS/MS ont été traitées avec le logiciel DataAnalysis 4.0 SP 2 Build 265 (Bruker Daltonics) et converties en liste de masses : fichier « *mascot generic file* » (*.mgf). Ces listes de masses ont été comparées, à l'aide des moteurs de recherche Mascot et OMSSA, à des listes de masses théoriques issues de la banque de données NCBI nr de l'organisme *Ixodes* (target ou cible) concaténée avec une banque de données constituée des séquences inversées de cette banque cible (decoy ou leurre) (2 x 21 571 entrées au 16/12/12). Cette banque inclut également les contaminants usuels : la trypsine porcine et les kératines humaines. Les listes de masses ont été comparées en admettant une erreur de 0,25 Da sur les ions précurseurs (MS) et sur les ions fragments (MS/MS), un maximum de deux omissions de coupure par la trypsine (*miscleavage*) et les modifications variables des cystéines (carbamidométhylation), des méthionines (oxydation) et des amines N-terminales (acétylation).

Pour la validation des identifications des protéines et l'estimation du taux de faux positifs, le logiciel Scaffold 3.00.07 a été utilisé. Les seuils de score ont été déterminés manuellement afin d'obtenir un taux de faux positifs (FDR) inférieur à 1 % (rapport du nombre de protéines leurres identifiées et du nombre total de protéines identifiées). Pour le logiciel Mascot, la différence entre le « score d'ion » et le « score identité » a été considérée. Pour le logiciel OMSSA, c'est le score sous la forme $-\log_{10}(E\text{-value})$ qui a été pris en compte. Pour les protéines identifiées à partir de deux peptides, le seuil Mascot a été établi à $\text{ion score} - \text{identity score} = -10$ et le seuil OMSSA à $-\log_{10}(E\text{-value}) = -0,4$. Pour les protéines identifiées à partir d'un seul peptide, les seuils ont été plus stricts : $\text{ion score} - \text{identity score} = 18$ et $\log_{10}(E\text{-value}) = 8,80$.

III- Chapitre IV

L'ensemble des manipulations de LC-SRM ont été réalisées sur un système Ultimate 3000 (Thermo Fischer Scientific, San Jose, USA) équipée d'un injecteur automatique (WPS-3000) et d'une pompe capillaire U-HPLC à gradient binaire haute pression (NCP-3500RS CAP) et couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle TSQ Vantage (Thermo Fisher, San Jose, CA, USA) en mode d'ionisation positif. L'ensemble du couplage est piloté par les logiciels Xcalibur 2.1.0 SP 1160, Chromeleon 6.80SR10 Build 2914 et TSQ Tune 2.3.0.1214 SP3 (Thermo Fischer Scientific).

A/ Prélèvement des biopsies

Biopsies saines

Des souris C3H/HeN (Charles River, L'arbresle, France) ont été euthanasiées par overdose de gaz isoflurane. Elles ont ensuite été rasées au niveau du dos, puis des biopsies de diamètre 3 mm (Biopsy Punch, Stiefel) sur la totalité de l'épaisseur de la peau ont été prélevées. Ces biopsies ont immédiatement été plongées pendant une minute dans un bécher d'isopentane refroidi à -80°C par un bain-marie d'azote liquide pour la congélation, puis conservée à -80°C dans du papier d'aluminium jusqu'à utilisation.

Biopsies infectées

Des souris C3H/HeN (Charles River, L'arbresle, France) ont été infectées par une injection intradermique à l'aide d'une seringue de 100 µL d'une culture bactérienne (*Borrelia burgdorferi* ss, c297/4) à une concentration de 10^3 *Borrelia*/100 µL. Trois, cinq, sept ou quinze jours après l'inoculation, elles ont été euthanasiées et les biopsies ont été prélevées dans les mêmes conditions que pour les souris saines.

B/ Evaluation des performances

L'évaluation des performances du couplage LC-SRM a été réalisée à partir d'un digestat tryptique de BSA (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne).

La liste des transitions suivies a été éditée à l'aide du logiciel Skyline (MacCoss laboratories, Seattle, USA). Le choix des peptides précurseurs a été réalisé manuellement et a été guidé par des données préalables obtenues en LC-MS/MS. Le choix des transitions a été réalisé à l'aide de filtres suivants :

- 4 transitions par peptide,
- précurseurs doublement chargés,
- fragments monochargés,
- rapport m/z du fragment supérieur au rapport m/z du précurseur.

Le total des transitions suivies s'élève à 103 transitions pour 26 peptides (pour un peptide, seules trois transitions ont pu être sélectionnées).

Le mélange peptidique a été chargé pendant 3 min sur une pré-colonne d'enrichissement Zorbax 300SB-C18 (1 mm x 17 mm, 5 μ m) à un débit de 50 μ L/min avec 98 % H₂O, 2 % ACN et 0,1 % (v/v) FA. Puis les peptides ont été élués sur une colonne Dionex Acclaim PepMap C18 (300 μ m x 15 cm, 3 μ m) à un débit de 5 μ L/min avec les solvants suivants : A : 98 % H₂O, 2 % ACN et 0,1 % (v/v) FA et B : 98 % ACN, 2 % H₂O et 0,1 % (v/v) FA. Le gradient délivré par la pompe binaire était le suivant : gradient de 8 à 25 % B en 20 min puis gradient de 25 à 70 % B en 5 min, suivi d'un isocratique de 3 min à 70 % B. La colonne a ensuite été rééquilibrée à 8 % B.

La source du spectromètre de masse était équipée de la sonde HESI-II portée à une température de 270 °C, un potentiel de -3 400 V. Le spectromètre de masse a été utilisé en mode *full scan* et en mode SRM lors des tests de répétabilité et en mode SRM seulement lors des tests de sensibilité et de résolution et de temps de scan. Pour le mode *full scan* la résolution du quadripôle Q1 a été fixée à 0,7 Da et les mesure ont été effectuée entre 250 m/z et 1 500 m/z . Pour le mode *scheduled SRM*, les paramètres utilisés sont rassemblés dans le tableau suivant :

	Etudes de répétabilité et de sensibilité	Etudes du temps de scan	Etude de résolution
Résolution Q1	0,7 Da	0,7 Da	0,2 Da ; 0,4 Da ; 0,7 Da
Résolution Q3	0,7 Da	0,7 Da	0,7 Da
Mode <i>scheduled SRM</i> (fenêtre de temps)	Oui (4min)	non	Oui (4min)
Temps de scan	min 20 ms	5 ms ; 10 ms ; 15 ms ; 20 ms	min 20 ms

L'argon a été utilisé comme gaz de collision à une pression de 1,5 mTorr.

L'énergie de collision a été déterminée en fonction de la charge et de la masse des peptides précurseurs à l'aide des équations fournies par Thermo Fischer Scientific :

$$z = 2^+ : CE = 0,03 \frac{m}{z} + 2,905$$

$$z = 3^+ : CE = 0,038 \frac{m}{z} + 2,281$$

C/ Extraction des protéines

Optimisation de la nature du tampon

Les biopsies calibrées ont été broyées manuellement à 4°C dans un micro-potter en verre avec 100 µL de tampon. Après transfert dans un eppendorf, le potter est lavé avec deux fois 50 µL de tampon. Les 200 µL de solution ont subi un cycle de sonication d'une minute à froid avec une alternance de 5 secondes d'ultrasons et 5 secondes de repos. Les extraits ont été centrifugés (10 000g, 4°C, 10 min). Le culot a été éliminé et un volume de 1 800 µL d'acétone froid a été ajouté pour faire précipiter les protéines. Après une nuit à -20°C, le surnageant a été éliminé et le culot a été resolubilisé dans 200 µL de tampon.

Les protéines ont ensuite été dosées par la méthode de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, Munich, Allemagne) ou la méthode de Lowry (*Bio-Rad DC Assay*, Munich, Allemagne).

Pour la méthode de Bradford, 2 µL d'HCl 0,1 M sont déposés préalablement dans les puits de la microplaque. Le dosage s'effectue sur 100 µL d'étalon (BSA) ou d'échantillon dilué auxquels sont rajoutés 100 µL de réactif Protein Assay dilué au 2/5^{ème} dans de l'eau. Le mélange est homogénéisé par aspiration/refoulement dans les puits. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue à 595 nm, à l'aide d'un lecteur de microplaque (Tecan, Sunrise™, Männedorf, Switzerland).

Pour la méthode de Lowry, le dosage s'effectue sur 5 µL d'étalon (BSA) ou d'échantillon dilué auxquels sont ajoutés 25 µL de réactif A' (A' = 20 µL de réactif S + 1 mL de réactif A) puis 200 µL de réactif B. Le mélange est homogénéisé par aspiration/refoulement dans les puits. Après 15 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue à 750 nm, à l'aide d'un lecteur de microplaque (Tecan, Sunrise™, Männedorf, Switzerland).

Pour l'étude de l'influence de la précipitation, les protéines ont été extraites dans le tampon 10 mM NaCl, 10 mM NH₄HCO₃, 1 % octyl β-D-glucopyranoside, pH 8,2, et ont été dosées avant et après l'étape de précipitation par la méthode de Lowry.

Le tampon retenu est composé de 10 mM NH₄HCO₃, 1 % octyl β-D-glucopyranoside, 10 mM NaCl, pH 8,2.

Optimisation du protocole d'extraction

Pour la comparaison des cycles de sonication, le cycle court décrit ci-dessus (1 min) a été comparé à un cycle long (4 min avec alternance de 5 secondes d'ultrasons et 5 secondes de repos). Le reste du protocole est identique.

Pour la méthode de broyage à sec, la biopsie est placée dans un tube à froid (N₂ liquide) et broyée par une bille à froid et à sec à l'aide d'un Mikro-dismembrator (Sartorius AG, Göttingen, Allemagne)

pendant 30 sec à 3 000 rpm. La poudre est ensuite reprise dans 4 x 50 µL de tampon, puis la solution est transférée dans un eppendorf avant le cycle de sonication.

Dans chaque cas, après centrifugation (5min, T amb) et récupération du surnageant, les protéines ont été dosées par la méthode de Lowry (Bio-Rad *DC Assay*, Munich, Allemagne).

D/ Digestion des extraits de biopsies cutanées

Pour les analyses par LC-SRM, les extraits obtenus selon le protocole précédent ont été réduits, alkylés et digérés par la trypsine.

Pour l'étape de réduction, 1 µL d'une solution de DTT 2,01 M a été ajouté aux extraits de manière à obtenir une concentration finale de 10 mM, puis les extraits ont été incubés 1 h à 60 °C. Pour l'étape d'alkylation, 10 µL d'une solution d'IAA à 633 mM a été ajouté de manière à obtenir une concentration finale de 30 mM puis les extraits ont été incubés 1 h à température ambiante dans le noir. L'étape de digestion a été réalisée par l'ajout de 6,4 µL d'une solution de trypsine à 0,5 µg/µL suivi d'une incubation à 37°C pendant une nuit. L'arrêt de la digestion a été provoqué par l'ajout de 20 µL d'une solution aqueuse à 0,1% TFA.

Les peptides ont été extraits sur phase solide (Vac t C18, 50 mg, Waters). Les cartouches ont été conditionnées avec 3 x 1 mL de méthanol, 3 x 1 mL d'ACN, puis 3 x 1mL d'eau acidifiée (0,1 % FA). Les digestats ont ensuite été déposés deux fois sur la cartouche. Après rinçage avec 2 x 1 mL d'eau acidifiée (0,1 % FA), les peptides ont été élués avec 600 µL d'une solution contenant 60 % d'ACN et 0,1 % de FA. Après évaporation de l'ACN sous vide (SpeedVac), les peptides ont été repris dans un volume d'eau acidifiée (0,1 % FA).

E/ Développement de la méthode LC-SRM pour la détection d'OspC

Validation des transitions

La validation des transitions a été réalisée sur un mélange des peptides standards marqués dans l'eau à une concentration de 100 fmol/µL par peptide.

1 µL du mélange peptidique a été chargé pendant 3 min sur une pré-colonne d'enrichissement Dionex Acclaim PepMap C18 (500 µm x 15 mm, 5 µm) à un débit de 50 µL/min avec 98 % H₂O, 2 % ACN et 0,1 % (v/v) FA. Puis les peptides ont été élués sur une colonne Dionex Acclaim PepMap C18 (300 µm x 15 cm, 3 µm) à un débit de 5 µL/min avec les solvants suivants : A : 98 % H₂O, 2 % ACN et 0,1 % (v/v) FA et B : 98 % ACN, 2 % H₂O et 0,1 % (v/v) FA. Le gradient délivré par la pompe binaire était le suivant : gradient de 8 à 30 % B en 22 min puis gradient de 30 à 80 % B en 5 min, suivi d'un isocratique de 3 min à 80 % B. La colonne a ensuite été rééquilibrée à 8 % B.

Le spectromètre de masse a été utilisé en mode SRM avec une résolution fixée à 0,7 Da sur Q1 et sur Q3. L'ensemble des transitions a été suivi tout le long de l'analyse avec un temps de scan de 19 ms par transition.

Optimisation de l'énergie de collision

Trois digestats d'extraits de glandes salivaires ont été obtenus selon le protocole décrit précédemment (tampon 10 mM NH_4HCO_3 , 1 % octyl β -D-glucopyranoside, 10 mM NaCl, pH 8,2, broyage manuel, sonication 4 min) et repris dans un volume final de 100 μL de 0,1 % FA.

Un mélange des peptides standards marqués à 100 fmol/ μL par peptide a été préparé dans 0,1 % FA. Ce mélange a été dilué par deux dans 0,1 % FA ou dans trois digestats indépendants d'extraits de biopsies cutanées de souris. La séparation des peptides a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment avec trois injections successives de 2 μL de chacune des solutions à 50 fmol/ μL par peptide.

La méthode d'analyse a été créée à l'aide du logiciel Skyline en renseignant les paramètres du nombre d'énergie de collision supérieure et inférieure à tester (3 dans notre cas, soit 7 énergies différentes au total) et le pas entre deux énergie de collision (5 V ou 2 V dans notre cas)

Le spectromètre de masse a été utilisé en mode scheduled SRM avec une résolution fixée à 0,4 Da sur Q1 et 0,7 Da sur Q3 et un temps de scan de 20 ms au minimum. Les données obtenues ont été traitées à l'aide du logiciel Skyline afin de déterminer l'énergie de collision optimale.

Mise en évidence de l'effet de matrice

Trois digestats d'extraits de glandes salivaires ont été obtenus selon le protocole décrit précédemment (tampon 10 mM NH_4HCO_3 , 1 % octyl β -D-glucopyranoside, 10 mM NaCl, pH 8,2, broyage manuel, sonication 4 min). Pour plus de clarté, le protocole sera décrit pour un seul digestat.

Après évaporation le digestat a été repris dans 10 μL de 0,1 % FA. Cette solution a été diluée 10, 100 et 1 000 fois.

Un mélange des peptides standards marqués à 100 fmol/ μL par peptide a été préparé dans 0,1 % FA. Ce mélange a été dilué par deux dans chacune des dilutions du digestat. La séparation des peptides a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment avec trois injections successives de 2 μL de chacune des solutions à 50 fmol/ μL par peptide.

Le spectromètre de masse a été utilisé en mode *scheduled* SRM avec une résolution fixée à 0,4 Da sur Q1 et 0,7 Da sur Q3 et un temps de scan de 20 ms au minimum. Les données obtenues ont été traitées à l'aide du logiciel Skyline afin de déterminer l'énergie de collision optimale.

Détermination LLOD et LLOQ

Un digestat d'un extrait de glandes salivaires a été obtenu selon le protocole décrit précédemment (tampon 10 mM NH_4HCO_3 , 1 % octyl β -D-glucopyranoside, 10 mM NaCl, pH 8,2, broyage manuel, sonication 4 min) et repris dans un volume final de 100 μL de 0,1 % FA.

Des mélanges des peptides standards marqués à 1, 2, 3, 4, 5, 10, 50 ou 100 fmol/ μL par peptide ont été préparés dans 0,1 % FA.

Ces mélanges ont été dilués par deux soit dans l'extrait de glandes salivaires (avant réduction, alkylation et digestion), soit dans le digestat d'extrait de glandes salivaires. La séparation des peptides a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment avec trois injections successives de 2 μL de chacune des solutions.

Le spectromètre de masse a été utilisé en mode scheduled SRM avec une résolution fixée à 0,4 Da sur Q1 et 0,7 Da sur Q3 et un temps de scan de 20 ms au minimum. Les données obtenues ont été traitées à l'aide du logiciel Skyline afin de déterminer l'énergie de collision optimale.

F/ Analyse des biopsies cutanées infectées

Méthode LC-SRM

Les biopsies infectées par la souche c297/4 sont extraites selon le protocole optimisé, décrit précédemment (10 mM NH_4HCO_3 , 1 % octyl β -D-glucopyranoside, 10 mM NaCl, pH 8,2 ; broyage manuel, sonication 4 min ; pas de précipitation des protéines).

Un mélange des peptides standards marqués à 100 fmol/ μL ou 5 fmol/ μL par peptide a été préparé dans 0,1 % FA. Ce mélange a été dilué par deux dans chacune des dilutions du digestat. La séparation des peptides a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment avec trois injections successives de 2 μL de chacune des solutions

Le mélange peptidique a été chargé pendant 3 min sur une pré-colonne d'enrichissement Dionex Acclaim PepMap C18 (1 mm x 17 mm, 5 μm) à un débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ puis élué sur une colonne Dionex Acclaim PepMap C18 (300 μm x 15 cm, 3 μm) à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les solvants de la voie A de la pompe nano et de la pompe de chargement étaient constitués de 100 % H_2O et 0,05 % (v/v) FA, et celui de la voie B de la pompe nano de 100 % ACN et 0,045 % (v/v) FA. Le gradient délivré par la pompe binaire était le suivant : gradient de gradient de 8 à 30 % B en 22 min puis gradient de 30 à 80 % B en 5 min, suivi d'un isocratique de 3 min à 80 % B. La colonne a ensuite été rééquilibrée à 8 % B.

Le spectromètre de masse a été utilisé en mode *scheduled* SRM avec une fenêtre de 4 min autour du temps de rétention des peptides, une résolution de 0,4 Da pour Q1 et 0,7 Da pour Q3 et un temps de scan minimum de 20 ms par peptide.

Méthode SDS-PAGE-LC-SRM

L'électrophorèse sur gel SDS-PAGE a été réalisée sur des gels de polyacrylamide constitués d'un gel de concentration (7,5 % acrylamide/bisacrylamide ; 125 mM Tris/HCl pH 6,8 ; 0,1 % (p/v) SDS ; 0,05 % (p/v) APS ; 0,01 % (v/v) TEMED) et d'un gel de séparation (15 % acrylamide/bisacrylamide ; 375 mM Tris/HCl pH 8,8 ; 0,1 % (p/v) SDS ; 0,05 % (p/v) APS ; 0,01 % (v/v) TEMED). Le tampon de migration était constitué de 25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 0,1 % (p/v) de SDS. La migration a été effectuée à l'aide d'un MiniProtean III (Bio-Rad, Munich, Allemagne) sous voltage constant.

10, 25 ou 50 µg de protéines extraites ont été diluées au ½ dans du tampon de Laemmli 2X (125 mM Tris/HCl pH 6,8, 40 % (p/v) glycerol, 4 % (p/v) SDS, 0,1 % (p/v) DTT, 0,025 % (p/v) bleu de bromophénol) et ont été chauffées 5 min à 95°C. La totalité a été déposée sur gel. 10 µL d'une solution de marqueurs de poids moléculaire Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad) ont également été déposés.

Pour les gels destinés aux analyses LC-SRM, les protéines ont été fixées 30 min dans une solution aqueuse de 45 % (v/v) méthanol, 5 % (v/v) acide acétique, puis colorées à l'aide d'une solution colloïdale de bleu de Coomassie (0,12 % (p/v), 10 % (v/v) acide phosphorique, 10 % (p/v) sulfate d'ammonium, 20 % (v/v) méthanol) pendant une nuit. Puis les gels ont été décolorés par une succession de bains d'eau ultrapure. Les bandes observées dans la zone d'intérêt ont été excisées. Une étape de prétraitement a été réalisée à l'aide d'un robot de pré-digestion (MassPREP Station, Waters, Manchester, Angleterre). Les bandes ont été lavées 2 fois 10 min dans un mélange ACN/NH₄HCO₃ 25 mM (1:1) afin d'éliminer le colorant. Les bandes ont ensuite été déshydratés par l'ACN pendant 5 min et les protéines ont été réduites par 50 µL de DTT (10 mM dans une solution de NH₄HCO₃ 25 mM, 1h, 60°C) puis alkylées par 50 µL d'une solution d'iodoacétamide (55 mM dans une solution de NH₄HCO₃ 25 mM, 20 min, T amb). Les bandes ont ensuite été lavées par 100 µL d'une solution de NH₄HCO₃ 25 mM et déshydratées par de l'ACN.

20 µL de trypsine à 12,5 ng/µL ont été ajoutés et la digestion enzymatique *in-gel* a été effectuée à 37°C durant une nuit.

Les peptides générés ont été extraits par ajout de 35 µL d'une solution aqueuse de 60 % (v/v) ACN et 1 % (v/v) FA, sous agitation pendant 1h à température ambiante. L'excès d'ACN est évaporé (SpeedVac) pendant 20 à 30 min en évitant l'évaporation totale. Puis les peptides ont été repris dans un volume 10 µL avec une solution aqueuse de FA à 0,1 % avant d'être injectés en LC-SRM.

Les gels destinés aux analyses par Western-blot, ont été rincés rapidement dans la solution de transfert (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0,0375 % (p/v) SDS et 20 % (v/v) méthanol), puis déposés sur une membrane de nitrocellulose (Protran, Whatman, Dassel, Allemagne) préincubée au moins 10 min dans le tampon de transfert. La membrane et le gel ont été placés entre deux papiers

Whatman 3M dans une cassette de transfert (Mini Trans-Blot, Bio-Rad, Munich, Allemagne). Le transfert a été réalisé sur la nuit à 4°C (140 mA pendant 15 min puis 50 mA) dans le tampon de transfert.

Après transfert, les membranes ont été incubées 1 h dans une solution de lait écrémé à 5 % (p/v) dans une solution de PBS contenant 0,05 % (p/v) de Tween 100 (notées PBS/Tween par la suite) puis incubées pendant 1 journée avec l'anticorps primaire (don de J. Hovius à N. Boulanger) dilué 2 500 fois dans une solution de PBS/Tween contenant 1 % de lait écrémé. Les membranes ont ensuite été lavées 3 fois 10 min dans du PBS/Tween puis incubées pendant 2 h avec l'anticorps secondaire (horseradish peroxidase, GE Healthcare) dilué 10 000 fois dans une solution de PBS/Tween contenant 1 % de lait écrémé. Après 3 rinçages de 10 min dans la solution de PBS/Tween, les protéines d'intérêt ont été révélées par chimioluminescence à l'aide du kit ECL Western Blotting Analysis et du système d'acquisition Gene Gnome® (SynGene, Cambridge, Angleterre).

IV-Chapitre V

A/ Prélèvement des biopsies

Biopsies saines et infectées

Les biopsies saines et infectées ont été prélevées comme précédemment décrit (partie expérimentale, Chapitre IV). La seule différence réside dans les souches de *Borrelia* utilisées pour l'infection des souris : *B. burgdorferi* ss N40 ou B31

B/ Optimisation de la préparation d'échantillon

Découpe des biopsies

Les biopsies emballées dans l'aluminium ont été conservées sur de la carboglace le temps des transferts, notamment entre Strasbourg et Archamps, pour éviter toute dégradation causée par des variations de température. Elles ont ensuite été réchauffées dans l'enceinte du cryostat (entre -18°C et -22°C). Tous les instruments utilisés lors de la découpe (pinceau, pinces, support d'échantillon) ont été placés préalablement dans l'enceinte du cryostat afin d'être équilibrés à la température de travail lors de la découpe. Les températures de l'enceinte et du porte échantillon ont été ajustées en fonction de l'échantillon comme détaillé dans le manuscrit.

La « colle » polymérique Jung Tissue Freezing Medium™ (Leica Microsystems) est conservée sous forme liquide à température ambiante. Quelques gouttes de cette colle sont déposées sur le support d'échantillon refroidi. Lorsqu'elle se solidifie avec la baisse de température, la biopsie est déposée à la surface de façon à ce qu'elle soit la plus plane possible et en veillant à ce que seule la surface inférieure de la biopsie soit en contact avec la « colle ». Le support est ensuite déposé sur le bloc amovible.

Le plan de coupe est ajusté en réalisant des coupes de 5 µm, puis des coupes d'épaisseur 10 µm ont été réalisées pour l'analyse par MALDI-MSI.

Transfert des coupes sur lame ITO

Après la découpe de la biopsie, une lame ITO conservée à température ambiante a été apposée sur la coupe fraîchement réalisée. La lame ITO est conservée sur la glace le temps de réaliser une étape de dessiccation sous vide pendant 30 min.

Etape de lavage des coupes

Pour les coupes qui ont subi une étape de lavage, les lames ITO ont été immergées pendant 30 s dans une solution d'éthanol à 70 % puis 30 s dans une solution à 95 % d'éthanol. Les lames ITO ont ensuite été placées au dessiccateur sous vide pendant 15 min.

Optimisation de la matrice

Pour l'optimisation de la composition de la matrice, celle-ci a été déposée à l'aide d'une pipette. Sur chaque coupe, 1 μ L de la matrice testée a été déposé. Les lames ITO ont ensuite été placées au dessiccateur pendant 15 min.

Pour le dépôt de matrice par spray, le sprayeur ImagePrep (Bruker Daltonics) a été utilisé. Les méthodes utilisées pour le dépôt ont été adaptées des méthodes fournies par Bruker Daltonics.

Traitement des lames ITO

Pour améliorer l'adhérence des coupes de biopsies de peau sur les lames ITO, ces dernières ont été enrobées d'une solution de contenant 0,05 % (w/v) de poly-lysine (Sigma-Aldrich P8920) et 0,07 % (v/v) d'Igepal (Sigma-Aldrich I7771). 100 μ L de cette solution ont été déposés sur chaque lame ITO puis ont été étalés au maximum à l'aide d'un grattoir de cellules. Le film formé doit être fin et continu. Les lames ont ensuite été séchées à 37 °C.

Acquisition des données MS

Les coupes de biopsies cutanée ont été analysées par spectrométrie de masse sur un instrument de type MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) contrôlé par le logiciel flexControl 3.0.183.0 (Bruker Daltonics). Les analyses ont été réalisées en mode linéaire positif avec un potentiel d'accélération de 20 kV. Le délai d'extraction a été fixé à 100 ns et la fréquence du laser (smartbeam II) à 100 Hz. Les acquisitions ont été réalisées entre 1 000 et 30 000 m/z avec cut off fixé à 1 000 m/z.

Pour l'optimisation de l'étape de lavage et de la composition de la solution de matrice (dépôt pipette), la coupe a été balayée manuellement par le laser et 4 000 tirs ont été additionnés.

Pour l'optimisation du dépôt de matrice par spray, l'acquisition a été réalisée automatiquement à l'aide du logiciel FlexImaging 3.0 (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne)

Les données brutes (*.raw) acquises lors des analyses MALDI-MS ont été traitées avec le logiciel DataAnalysis 3.0.54.0 (Bruker Daltonics).

C/ Application aux biopsies cutanées

Optimisation de la détection d'OspC

Une biopsie de souris saine de diamètre 5 mm a été découpée au cryostat (température porte-échantillon = -28°C, température enceinte = -20°C, épaisseur de coupe 10 µm). La coupe obtenue a été transférée sur une lame ITO préalablement enrobée par une solution de poly-lysine. Cette lame a été placée 30 min au dessiccateur sous vide, puis immergée 30 s dans une solution de 70 % isopropanol puis 30 s dans une solution de 95 % isopropanol, et de nouveau placée 15 min au dessiccateur sous vide. Deux fois 1 µL d'une solution de la protéine OspC recombinante à 0,3 µg/µL a été déposée sur deux zones de la coupe et une solution de matrice SA, 15 mg/mL dans 50 % ACN, 0,5 % TFA a été déposée par spray à l'ImagePrep.

Deux biopsies de souris infectées par la bactérie *Borrelia* (souche B31 ou N40) de diamètre 5 mm ont été découpées au cryostat (température porte-échantillon = -28°C, température enceinte = -20°C, épaisseur de coupe 10 µm). Les coupes obtenues ont été transférées sur une lame ITO préalablement enrobée par une solution de poly-lysine. Cette lame a été placée 30 min au dessiccateur sous vide, immergée 30 s dans une solution de 70 % isopropanol puis 30 s dans une solution de 95 % isopropanol, et de nouveau placée 15 min au dessiccateur sous vide. Une solution de matrice SA, 15 mg/mL dans 50 % ACN, 0,5 % TFA a été déposée par spray à l'ImagePrep.

Etude longitudinale d'une biopsie de peau

Une biopsie de souris saine de diamètre 5 mm a été découpée au cryostat. Les 28 coupes obtenues ont été transférées sur une lame ITO préalablement enrobée par une solution de poly-lysine. Cette lame a été placée 30 min au dessiccateur sous vide, puis immergée 30 s dans une solution de 70 % isopropanol puis 30 s dans une solution de 95 % isopropanol, et de nouveau placée 15 min au dessiccateur sous vide. Une solution de matrice SA, 15 mg/mL dans 50 % ACN, 0,5 % TFA a été déposée par spray à l'ImagePrep.



Bibliographie



- Abaffy, T., Duncan, R., Riemer, D.D., Tietje, O., Elgart, G., Milikowski, C., DeFazio, R.A. (2010). Differential volatile signatures from skin, naevi and melanoma: a novel approach to detect a pathological process. *PLoS ONE* 5, e13813.
- Ackermann, R., Hörstrup, P., Schmidt, R. (1984). Tick-borne meningopolyneuritis (Garin-Bujadoux, Bannwarth). *Yale J. Biol. Med.* 57, 485–490.
- Adusumilli, S., Booth, C.J., Anguita, J., Fikrig, E. (2010). Passage through *Ixodes scapularis* ticks enhances the virulence of a weakly pathogenic isolate of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 78, 138–144.
- Aebersold, R., Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207.
- Afzelius, A. (1921). Erythema chronicum migrans. *Acta Derm. Venereol.* 2, 120–125.
- Ahmed, H. (2004). Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization (CRC Press).
- Akasaka, Y., Ito, K., Fujita, K., Komiyama, K., Ono, I., Ishikawa, Y., Akishima, Y., Sato, H., Ishii, T. (2005). Activated caspase expression and apoptosis increase in keloids: cytochrome c release and caspase-9 activation during the apoptosis of keloid fibroblast lines. *Wound Repair Regen.* 13, 373–382.
- Alitalo, A., Meri, T., Lankinen, H., Seppälä, I., Lahdenne, P., Hefty, P.S., Akins, D., Meri, S. (2002). Complement Inhibitor Factor H Binding to Lyme Disease Spirochetes Is Mediated by Inducible Expression of Multiple Plasmid-Encoded Outer Surface Protein E Paralogs. *J. Immunol.* 169, 3847–3853.
- Alves, G., Wu, W.W., Wang, G., Shen, R.F., Yu, Y.K. (2008). Enhancing Peptide Identification Confidence by Combining Search Methods. *J. Proteome Res.* 7, 3102–3113.
- America, A.H.P., Cordewener, J.H.G. (2008). Comparative LC-MS: A landscape of peaks and valleys. *Proteomics* 8, 731–749.
- Anderson, J.F., Magnarelli, L.A. (2008). Biology of Ticks. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 22, 195–215.
- Ang, C.-S., Nice, E.C. (2010). Targeted In-Gel MRM: A Hypothesis Driven Approach for Colorectal Cancer Biomarker Discovery in Human Feces. *J. Proteome Res.* 9, 4346–4355.
- Angel, P.M., Caprioli, R.M. (2012a). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Imaging Mass Spectrometry: In Situ Molecular Mapping. *Biochemistry DOI : 10.1021/bi301519p*.
- Angel, T.E., Aryal, U.K., Hengel, S.M., Baker, E.S., Kelly, R.T., Robinson, E.W., Smith, R.D. (2012b). Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chem. Soc. Rev.* 41, 3912–3928.
- Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J.W.R., Das, S., Thomas, V., Persinski, R., Conze, D., Askenase, P.W., Rincón, M., Kantor, F.S., Fikrig, E. (2002). Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity* 16, 849–859.
- Armstrong, D.W., Zhang, L.-K., He, L., Gross, M.L. (2001). Ionic Liquids as Matrixes for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 73, 3679–3686.
- Arnaboldi, P.M., Seedarnee, R., Sambir, M., Callister, S.M., Imperato, J.A., Dattwyler, R.J. (2013). An outer surface protein C (OspC) peptide derived from *Borrelia burgdorferi sensu stricto* as a target for the serodiagnosis of early Lyme disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 474–481.
- Arsene, C.G., Ohlendorf, R., Burkitt, W., Pritchard, C., Henrion, A., Gavin, O., Bunk, D.M., Güttler, B. (2008). Protein Quantification by Isotope Dilution Mass Spectrometry of Proteolytic Fragments: Cleavage Rate and Accuracy. *Anal. Chem.* 80, 4154–4160.
- Asbrink, E., Hovmark, A. (1985). Successful cultivation of spirochetes from skin lesions of patients with erythema chronicum migrans Afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B* 93, 161–163.
- Åsbrink, E., Hovmark, A. (1988). Early and Late Cutaneous Manifestations in *Ixodes*-borne Borreliosis (Erythema Migrans Borreliosis, Lyme Borreliosis)a. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539, 4–15.
- Aston, F.W. (1919). LXXIV. A positive ray spectrograph. *Philosophical Magazine Series 6* 38, 707–714.

- Bankhead, T., Chaconas, G. (2007). The role of VlsE antigenic variation in the Lyme disease spirochete: persistence through a mechanism that differs from other pathogens. *Mol. Microbiol.* *65*, 1547–1558.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., Kuster, B. (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* *389*, 1017–1031.
- Barbour, A.G., Hayes, S.F. (1986). Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* *50*, 381–400.
- Barker, S.C., Murrell, A. (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology* *129*, S15–S36.
- Beaufays, J., Adam, B., Decrem, Y., Prévôt, P.-P., Santini, S., Brasseur, R., Brossard, M., Lins, L., Vanhamme, L., Godfroid, E. (2008a). *Ixodes ricinus* Tick Lipocalins: Identification, Cloning, Phylogenetic Analysis and Biochemical Characterization. *PLoS ONE* *3*, e3941.
- Beaufays, J., Adam, B., Menten-Dedoyart, C., Fievez, L., Grosjean, A., Decrem, Y., Prévôt, P.-P., Santini, S., Brasseur, R., Brossard, M., Vanhaeverbeek, M., Bureau, F., Heinen, E., Lins, L., Vanhamme, L., Godfroid, E. (2008b). Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* Tick Salivary LTb4-Binding Lipocalin, Interferes with Host Neutrophil Function. *PLoS ONE* *3*, e3987.
- Beavis, R.C., Chait, B.T. (1989). Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *3*, 432–435.
- Beavis, R.C., Chaudhary, T., Chait, B.T. (1992). α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* *27*, 156–158.
- Benach, J.L., Bosler, E.M., Hanrahan, J.P., Coleman, J.L., Habicht, G.S., Bast, T.F., Cameron, D.J., Ziegler, J.L., Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Edelman, R., Kaslow, R.A. (1983). Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* *308*, 740–742.
- Berglund, J., Eitrem, R., Ornstein, K., Lindberg, A., Ringér, A., Elmrud, H., Carlsson, M., Runeheggen, A., Svanborg, C., Norrby, R. (1995). An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. *N. Engl. J. Med.* *333*, 1319–1327.
- Beynon, R.J., Doherty, M.K., Pratt, J.M., Gaskell, S.J. (2005). Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat. Methods* *2*, 587–589.
- Bhate, C., Schwartz, R.A. (2011). Lyme disease: Part II. Management and prevention. *J. Am. Acad. Dermatol.* *64*, 639–653.
- Biemann, K. (1990). Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Meth. Enzymol.* *193*, 886–887.
- Blueggel, M., Chamrad, D., Meyer, H.E. (2004). Bioinformatics in proteomics. *Curr. Pharm. Biotechnol.* *5*, 79–88.
- Bowman, A., Dillwith, J., Sauer, J. (1996). Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. *Parasitol. Today* *12*, 388–396.
- Brenner, E.V., Kurilshikov, A.M., Stronin, O.V., Fomenko, N.V. (2012). Whole-genome sequencing of *Borrelia garinii* BgVir, isolated from Taiga ticks (*Ixodes persulcatus*). *J. Bacteriol.* *194*, 5713.
- Brisson, D., Dykhuizen, D.E. (2004). ospC Diversity in *Borrelia burgdorferi* Different Hosts Are Different Niches. *Genetics* *168*, 713–722.
- Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M., Thomas, D., Court, M., Vandenesch, F., Garin, J. (2007). Isotope-labeled Protein Standards Toward Absolute Quantitative Proteomics. *Mol. Cell Proteomics* *6*, 2139–2149.
- Bunch, J., Clench, M.R., Richards, D.S. (2004). Determination of pharmaceutical compounds in skin by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *18*, 3051–3060.
- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L., Grunwaldt, E., Davis, J.P. (1982). Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* *216*, 1317–1319.
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Newman, S.A. (2007). Hidden in plain sight: *Borrelia burgdorferi* and the extracellular matrix. *Trends Microbiol.* *15*, 350–354.

- Caldwell, R.L., Caprioli, R.M. (2005). Tissue Profiling by Mass Spectrometry A Review of Methodology and Applications. *Mol. Cell. Proteomics* 4, 394–401.
- Callipo, L., Caruso, G., Foglia, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., Laganà, A. (2010). Immunoprecipitation on magnetic beads and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for carbonic anhydrase II quantification in human serum. *Anal. Biochem.* 400, 195–202.
- Cameron, A.E., Eggers, D.F. (1948). An Ion "Velocitron". *Review of Scientific Instruments* 19, 605–607.
- Campbell, G.L., Fritz, C.L., Fish, D., Nowakowski, J., Nadelman, R.B., Wormser, G.P. (1998). Estimation of the Incidence of Lyme Disease. *Am. J. Epidemiol.* 148, 1018–1026.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P.G. (2004). Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327–1333.
- Caprioli, R.M., Farmer, T.B., Gile, J. (1997). Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* 69, 4751–4760.
- Carroll, J.A., Garon, C.F., Schwan, T.G. (1999). Effects of Environmental pH on Membrane Proteins in *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 67, 3181–3187.
- Casjens, S., Palmer, N., van Vugt, R., Huang, W.M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R.J., Haft, D., Hickey, E., Gwinn, M., White, O., Fraser, C.M. (2000). A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 35, 490–516.
- Casjens, S.R., Mongodin, E.F., Qiu, W.-G., Dunn, J.J., Luft, B.J., Fraser-Liggett, C.M., Schutzer, S.E. (2011a). Whole-Genome Sequences of Two *Borrelia afzelii* and Two *Borrelia garinii* Lyme Disease Agent Isolates. *J. Bacteriol.* 193, 6995–6996.
- Casjens, S.R., Fraser-Liggett, C.M., Mongodin, E.F., Qiu, W.-G., Dunn, J.J., Luft, B.J., Schutzer, S.E. (2011b). Whole Genome Sequence of an Unusual *Borrelia burgdorferi* *Sensu Lato* Isolate. *J. Bacteriol.* 193, 1489–1490.
- Chan, K., Awan, M., Barthold, S.W., Parveen, N. (2012a). Comparative molecular analyses of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* strains B31 and N40D10/E9 and determination of their pathogenicity. *BMC Microbiology* 12, 157.
- Chan, K., Casjens, S., Parveen, N. (2012b). Detection of Established Virulence Genes and Plasmids To Differentiate *Borrelia burgdorferi* Strains. *Infect. Immun.* 80, 1519–1529.
- Chandra, S., Smith, D.R., Morrison, G.H. (2000). Subcellular imaging by dynamic SIMS ion microscopy. *Anal. Chem.* 72, 104A–114A.
- Chaurand, P., Schwartz, S.A., Caprioli, R.M. (2002). Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 676–681.
- Chaurand, P., Schriver, K.E., Caprioli, R.M. (2007). Instrument design and characterization for high resolution MALDI-MS imaging of tissue sections. *J. Mass Spectrom.* 42, 476–489.
- Chevallet, M., Luche, S., Diemer, H., Strub, J.-M., Van Dorsselaer, A., Rabilloud, T. (2008). Sweet silver: a formaldehyde-free silver staining using aldoses as developing agents, with enhanced compatibility with mass spectrometry. *Proteomics* 8, 4853–4861.
- Chmelar, J., Oliveira, C.J., Rezacova, P., Francischetti, I.M.B., Kovarova, Z., Pejler, G., Kopacek, P., Ribeiro, J.M.C., Mares, M., Kopecky, J., Kotsyfakis, M. (2011). A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood* 117, 736–744.
- Chmelar, J., Calvo, E., Pedra, J.H.F., Francischetti, I.M.B., Kotsyfakis, M. (2012). Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *J. Proteomics* 75, 3842–3854.
- Choumet, V., Carmi-Leroy, A., Laurent, C., Lenormand, P., Rousselle, J.-C., Namane, A., Roth, C., Brey, P.T. (2007). The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the *Plasmodium* life cycle: a global proteomic study. *Proteomics* 7, 3384–3394.

- Christe, M., Rutti, B., Brossard, M. (2000). Cytokines (IL-4 and IFN-gamma) and antibodies (IgE and IgG2a) produced in mice infected with *Borrelia burgdorferi sensu stricto* via nymphs of *Ixodes ricinus* ticks or syringe inoculations. *Parasitol. Res.* *86*, 491–496.
- Clauser, K.R., Baker, P., Burlingame, A.L. (1999). Role of Accurate Mass Measurement (± 10 ppm) in Protein Identification Strategies Employing MS or MS/MS and Database Searching. *Anal. Chem.* *71*, 2871–2882.
- Coburn, J., Fischer, J.R., Leong, J.M. (2005). Solving a sticky problem: new genetic approaches to host cell adhesion by the Lyme disease spirochete. *Mol. Microbiol.* *57*, 1182–1195.
- Colby, S.M., King, T.B., Reilly, J.P., Lubman, D.M. (1994). Improving the resolution of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by exploiting the correlation between ion position and velocity. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *8*, 865–868.
- Cottingham, K. (2010). 1DE proves its worth... again. *J. Proteome Res.* *9*, 1636–1636.
- Couvreur, B., Beauvais, J., Charon, C., Lahaye, K., Gensale, F., Denis, V., Charlotheaux, B., Decrem, Y., Prévôt, P.P., Brossard, M., Vanhamme, L., Godfroid, E. (2008). Variability and Action Mechanism of a Family of Anticomplement Proteins in *Ixodes ricinus*. *PLoS ONE* *3*, e1400.
- Craig, R., Cortens, J.P., Beavis, R.C. (2004). Open Source System for Analyzing, Validating, and Storing Protein Identification Data. *J. Proteome Res.* *3*, 1234–1242.
- Crippa, M., Rais, O., Gern, L. (2002). Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* *2*, 3–9.
- Daix, V., Schroeder, H., Praet, N., Georgin, J.-P., Chiappino, I., Gillet, L., De Fays, K., Decrem, Y., Lebouille, G., Godfroid, E., Bollen, A., Pastoret, P.-P., Gern, L., Sharp, P.M., Vanderplasschen, A. (2007). *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Mol. Biol.* *16*, 155–166.
- Das, S., Banerjee, G., DePonte, K., Marcantonio, N., Kantor, F.S., Fikrig, E. (2001). Salp25D, an *Ixodes scapularis* Antioxidant, Is 1 of 14 Immunodominant Antigens in Engorged Tick Salivary Glands. *J. Infect. Dis.* *184*, 1056–1064.
- Déruaz, M., Frauenschuh, A., Alessandri, A.L., Dias, J.M., Coelho, F.M., Russo, R.C., Ferreira, B.R., Graham, G.J., Shaw, J.P., Wells, T.N.C., Teixeira, M.M., Power, C.A., Proudfoot, A.E.I. (2008). Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J. Exp. Med.* *205*, 2019–2031.
- DeSouza, L.V., Romaschin, A.D., Colgan, T.J., Siu, K.W.M. (2009). Absolute Quantification of Potential Cancer Markers in Clinical Tissue Homogenates Using Multiple Reaction Monitoring on a Hybrid Triple Quadrupole/Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* *81*, 3462–3470.
- Deutsch, E.W., Lam, H., Aebersold, R. (2008). PeptideAtlas: a resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows. *EMBO Rep* *9*, 429–434.
- Dickinson, R.G., O'Hagan, J.E., Schotz, M., Binnington, K.C., Hegarty, M.P. (1976). Prostaglandin in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* *54*, 475–486.
- Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., Alice, M.B. (1968). Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* *49*, 2240–2249.
- Domanski, D., Percy, A.J., Yang, J., Chambers, A.G., Hill, J.S., Freue, G.V.C., Borchers, C.H. (2012). MRM-based multiplexed quantitation of 67 putative cardiovascular disease biomarkers in human plasma. *Proteomics* *12*, 1222–1243.
- Dongré, A.R., Jones, J.L., Somogyi, Á., Wysocki, V.H. (1996). Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model. *J. Am. Chem. Soc.* *118*, 8365–8374.
- Douglas, D.J., Frank, A.J., Mao, D. (2005). Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* *24*, 1–29.
- Ebnet, K., Brown, K.D., Siebenlist, U.K., Simon, M.M., Shaw, S. (1997). *Borrelia burgdorferi* activates nuclear factor-kappa B and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts. *J. Immunol.* *158*, 3285–3292.

- Eicken, C., Sharma, V., Klabunde, T., Owens, R.T., Pikas, D.S., Höök, M., Sacchettini, J.C. (2001). Crystal Structure of Lyme Disease Antigen Outer Surface Protein C from *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* 276, 10010–10015.
- Elias, J.E., Haas, W., Faherty, B.K., Gygi, S.P. (2005). Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. *Nat. Meth.* 2, 667–675.
- Eng, J.K., McCormack, A.L., Yates, J.R. (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 5, 976–989.
- Enthaler, B., Pruns, J.K., Wessel, S., Rapp, C., Fischer, M., Wittern, K.P. (2012). Improved sample preparation for MALDI-MSI of endogenous compounds in skin tissue sections and mapping of exogenous active compounds subsequent to ex-vivo skin penetration. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 1159–1167.
- Enthaler, B., Trusch, M., Fischer, M., Rapp, C., Pruns, J.K., Vietzke, J.-P. (2013). MALDI imaging in human skin tissue sections: focus on various matrices and enzymes. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 1159–1170.
- Evans, C., Noirel, J., Ow, S.Y., Salim, M., Pereira-Medrano, A.G., Couto, N., Pandhal, J., Smith, D., Pham, T.K., Karunakaran, E., Zou, X., Biggs, C.A., Wright, P.C. (2012). An insight into iTRAQ: where do we stand now? *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 1011–1027.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71.
- Fikrig, E., Pal, U., Chen, M., Anderson, J.F., Flavell, R.A. (2004). OspB Antibody Prevents *Borrelia burgdorferi* Colonization of *Ixodes scapularis*. *Infect. Immun.* 72, 1755–1759.
- Fingerle, V., Rauser, S., Hammer, B., Kahl, O., Heimerl, C., Schulte-Spechtel, U., Gern, L., Wilske, B. (2002). Dynamics of Dissemination and Outer Surface Protein Expression of Different European *Borrelia burgdorferi* Senu Lato Strains in Artificially Infected *Ixodes ricinus* Nymphs. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1456–1463.
- Fournier, I., Thomy, V., Salzet, M., Wisztorski, M., Verplanck, N. (2007). Masks Useful for Maldi Imaging of Tissue Sections, Processes of Manufacture and Uses Thereof. PCT/EP2007/054253.
- Francischetti, I.M.B., Valenzuela, J.G., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C. (2002). Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 99, 3602–3612.
- Francischetti, I.M.B., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C. (2003). Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme Disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 869–875.
- Francischetti, I.M.B., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C. (2004). Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thromb. Haemost.* 91, 886–898.
- Francischetti, I.M.B., Sá-Nunes, A., Mans, B.J., Santos, I.M., Ribeiro, J.M.C. (2009). The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* 14, 2051–2088.
- Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Wathley, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O., Venter, J.C. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390, 580–586.
- Frauschuh, A., Power, C.A., Déruaz, M., Ferreira, B.R., Silva, J.S., Teixeira, M.M., Dias, J.M., Martin, T., Wells, T.N.C., Proudfoot, A.E.I. (2007). Molecular Cloning and Characterization of a Highly Selective Chemokine-binding Protein from the Tick *Rhipicephalus sanguineus*. *J. Biol. Chem.* 282, 27250–27258.
- Fusaro, V.A., Mani, D.R., Mesirov, J.P., Carr, S.A. (2009). Prediction of high-responding peptides for targeted protein assays by mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 27, 190–198.
- Gagnon, H., Franck, J., Wisztorski, M., Day, R., Fournier, I., Salzet, M. (2012). TARGETED MASS spectrometry Imaging: Specific Targeting Mass Spectrometry imaging technologies from history to perspective. *Prog. Histochem. Cytoc.* 47, 133–174.

- Gallien, S., Duriez, E., Domon, B. (2011). Selected reaction monitoring applied to proteomics. *J. Mass Spectrom.* *46*, 298–312.
- Gao, Q., Madian, A.G., Liu, X., Adamec, J., Regnier, F.E. (2010). Coupling protein complex analysis to peptide based proteomics. *J. Chrom. A* *1217*, 7661–7668.
- García, M.C. (2005). The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* *825*, 111–123.
- Garg, R., Juncadella, I.J., Ramamoorthi, N., Ashish, Ananthanarayanan, S.K., Thomas, V., Rincón, M., Krueger, J.K., Fikrig, E., Yengo, C.M., Anguita, J. (2006). Cutting Edge: CD4 Is the Receptor for the Tick Saliva Immunosuppressor, Salp15. *J. Immunol.* *177*, 6579–6583.
- Garin, C., Bujadoux (1922). Paralyse par les tiques. *J. Méd. Lyon* *3*, 765–767.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* *13*, 1423–1433.
- Gaspar, A.R., Joubert, A.M., Crause, J.C., Neitz, A.W. (1996). Isolation and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp. Appl. Acarol.* *20*, 583–598.
- Geer, L.Y., Markey, S.P., Kowalak, J.A., Wagner, L., Xu, M., Maynard, D.M., Yang, X., Shi, W., Bryant, S.H. (2004). Open Mass Spectrometry Search Algorithm. *J. Proteome Res.* *3*, 958–964.
- Gerber, S.A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M.W., Gygi, S.P. (2003). Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *PNAS* *100*, 6940–6945.
- Gern, L., Lebet, N., Moret, J. (1996). Dynamics of *Borrelia burgdorferi* infection in nymphal *Ixodes ricinus* ticks during feeding. *Exp. Appl. Acarol.* *20*, 649–658.
- Gern, L., Estrada-Peña, A., Frandsen, F., Gray, J.S., Jaenson, T.G., Jongejan, F., Kahl, O., Korenberg, E., Mehl, R., Nuttall, P.A. (1998). European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Zentralbl. Bakteriol.* *287*, 196–204.
- Geromanos, S.J., Vissers, J.P.C., Silva, J.C., Dorschel, C.A., Li, G.-Z., Gorenstein, M.V., Bateman, R.H., Langridge, J.I. (2009). The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* *9*, 1683–1695.
- Gilar, M., Olivova, P., Daly, A.E., Gebler, J.C. (2005). Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* *77*, 6426–6434.
- Gillespie, R.D., Dolan, M.C., Piesman, J., Titus, R.G. (2001). Identification of an IL-2 Binding Protein in the Saliva of the Lyme Disease Vector Tick, *Ixodes scapularis*. *J. Immunol.* *166*, 4319–4326.
- Gillet, L.C., Navarro, P., Tate, S., Röst, H., Selevsek, N., Reiter, L., Bonner, R., Aebersold, R. (2012). Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol. Cell Proteomics* *11*, O111.016717.
- Gillette, M.A., Carr, S.A. (2013). Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nat. Meth.* *10*, 28–34.
- Görg, A., Postel, W., Weser, J., Günther, S., Strahler, J.R., Hanash, S.M., Somerlot, L. (1987). Horizontal two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension in the presence of nonionic detergent. *Electrophoresis* *8*, 45–51.
- Goto-Inoue, N., Hayasaka, T., Zaima, N., Setou, M. (2011). Imaging mass spectrometry for lipidomics. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* *1811*, 961–969.
- Grimm, D., Tilly, K., Byram, R., Stewart, P.E., Krum, J.G., Bueschel, D.M., Schwan, T.G., Policastro, P.F., Elias, A.F., Rosa, P.A. (2004). Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: A protein induced in ticks for infection of mammals. *PNAS* *101*, 3142–3147.
- Gromov, P., Skovgaard, G.L., Palsdottir, H., Gromova, I., Østergaard, M., Celis, J.E. (2003). Protein Profiling of the Human Epidermis from the Elderly Reveals Up-regulation of a Signature of Interferon- γ -induced

Polypeptides That Includes Manganese-superoxide Dismutase and the p85 β Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Mol. Cell Proteomics* 2, 70–84.

Gross, J.H. (2011). *Mass Spectrometry: A Textbook* (Springer).

Guo, X., Booth, C.J., Paley, M.A., Wang, X., DePonte, K., Fikrig, E., Narasimhan, S., Montgomery, R.R. (2009). Inhibition of Neutrophil Function by Two Tick Salivary Proteins. *Infect. Immun.* 77, 2320–2329.

Gwakisa, P., Yoshihara, K., Long To, T., Gotoh, H., Amano, F., Momotani, E. (2001). Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. *Vet. Parasitol.* 99, 53–61.

Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 17, 994–999.

Hajnická, V., Vancová, I., Kocáková, P., Slovák, M., Gasperík, J., Sláviková, M., Hails, R.S., Labuda, M., Nuttall, P.A. (2005). Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology* 130, 333–342.

Halvey, P.J., Ferrone, C.R., Liebler, D.C. (2012). GeLC-MRM Quantitation of Mutant KRAS Oncoprotein in Complex Biological Samples. *J. Proteome Res.* 11, 3908–3913.

Hannier, S., Liversidge, J., Sternberg, J.M., Bowman, A.S. (2003). *Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes. *Parasite Immunol.* 25, 27–37.

Hannier, S., Liversidge, J., Sternberg, J.M., Bowman, A.S. (2004). Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission. *Immunology* 113, 401–408.

Hannigan, A., Burchmore, R., Wilson, J.B. (2007). The Optimization of Protocols for Proteome Difference Gel Electrophoresis (DiGE) Analysis of Preneoplastic Skin. *J. Proteome Res.* 6, 3422–3432.

Hart, P.J., Francese, S., Claude, E., Woodroffe, M.N., Clench, M.R. (2011). MALDI-MS imaging of lipids in ex vivo human skin. *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 115–125.

Heller, M., Michel, P.E., Morier, P., Crettaz, D., Wenz, C., Tissot, J.-D., Reymond, F., Rossier, J.S. (2005). Two-stage Off-GelTM isoelectric focusing: Protein followed by peptide fractionation and application to proteome analysis of human plasma. *Electrophoresis* 26, 1174–1188.

Hellwege, J., Meri, T., Heikkilä, T., Alitalo, A., Panelius, J., Lahdenne, P., Seppälä, I.J.T., Meri, S. (2001). The Complement Regulator Factor H Binds to the Surface Protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* 276, 8427–8435.

Hervey, W.J., Strader, M.B., Hurst, G.B. (2007). Comparison of Digestion Protocols for Microgram Quantities of Enriched Protein Samples. *J. Proteome Res.* 6, 3054–3061.

Hirschfeld, M., Kirschning, C.J., Schwandner, R., Wesche, H., Weis, J.H., Wooten, R.M., Weis, J.J. (1999). Cutting Edge: Inflammatory Signaling by *Borrelia burgdorferi* Lipoproteins Is Mediated by Toll-Like Receptor 2. *J. Immunol.* 163, 2382–2386.

Hollström, E. (1951). Successful treatment of erythema migrans Afzelius. *Acta Derm. Venereol.* 31, 235–243.

Holman, S.W., Sims, P.F.G., Evers, C.E. (2012). The use of selected reaction monitoring in quantitative proteomics. *Bioanalysis* 4, 1763–1786.

Holstein Sherwood, C.A., Gafken, P.R., Martin, D.B. (2011). Collision energy optimization of b- and y-ions for multiple reaction monitoring mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 10, 231–240.

Hovius, J.W., Schuijt, T.J., Groot, K.A. de, Roelofs, J.J.T.H., Oei, G.A., Marquart, J.A., Beer, R. de, Veer, C. van't, Poll, T. van der, Ramamoorthi, N., Fikrig, E., Dam, A.P. van (2008a). Preferential Protection of *Borrelia burgdorferi* *Sensu Stricto* by a Salp 15 Homologue in *Ixodes ricinus* Saliva. *J. Infect. Dis.* 198, 1189–1197.

Hovius, J.W.R., Ramamoorthi, N., Van't Veer, C., de Groot, K.A., Nijhof, A.M., Jongejan, F., van Dam, A.P., Fikrig, E. (2007). Identification of Salp15 homologues in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7, 296–303.

- Hovius, J.W.R., Levi, M., Fikrig, E. (2008b). Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. *PLoS Med* 5, e43.
- Hovius, J.W.R., de Jong, M.A.W.P., den Dunnen, J., Litjens, M., Fikrig, E., van der Poll, T., Gringhuis, S.I., Geijtenbeek, T.B.H. (2008c). Salp15 Binding to DC-SIGN Inhibits Cytokine Expression by Impairing both Nucleosome Remodeling and mRNA Stabilization. *PLoS Pathog* 4, e31.
- Huang, C.-M., Foster, K.W., DeSilva, T., Zhang, J., Shi, Z., Yusuf, N., Kampen, K.R.V., Elmets, C.A., Tang, D.C. (2003). Comparative Proteomic Profiling of Murine Skin. *J. Invest. Dermatol.* 121, 51–64.
- Hubálek, Z. (2009). Epidemiology of lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol.* 37, 31–50.
- Huber, C.G., Premstaller, A. (1999). Evaluation of volatile eluents and electrolytes for high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry of proteins. I. Liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 849, 161–173.
- Huillet, C., Adrait, A., Lebert, D., Picard, G., Trauchessec, M., Louwagie, M., Dupuis, A., Hittinger, L., Ghaleh, B., Corvoisier, P.L., Jaquinod, M., Garin, J., Bruley, C., Brun, V. (2012). Accurate Quantification of Cardiovascular Biomarkers in Serum Using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ™) and Selected Reaction Monitoring. *Mol. Cell Proteomics* 11.
- Hussain, S.H., Limthongkul, B., Humphreys, T.R. (2013). The Biomechanical Properties of the Skin. *Dermatologic Surgery* 39, 193–203.
- Hüttenhain, R., Soste, M., Selevsek, N., Röst, H., Sethi, A., Carapito, C., Farrah, T., Deutsch, E.W., Kusebauch, U., Moritz, R.L., Niméus-Malmström, E., Rinner, O., Aebersold, R. (2012). Reproducible quantification of cancer-associated proteins in body fluids using targeted proteomics. *Sci. Transl. Med.* 4, 142ra94.
- Iribarne, J.V., Thomson, B.A. (1976). On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* 64, 2287–2294.
- Ishihama, Y. (2005). Proteomic LC–MS systems using nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1067, 73–83.
- Jaulhac, B., Nicolini, P., Piemont, Y., Monteil, H. (1991). Detection of *Borrelia burgdorferi* in cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. *N. Engl. J. Med.* 324, 1440.
- Jaulhac, B., Chary-Valckenaere, I., Sibilia, J., Javier, R.M., Piémont, Y., Kuntz, J.L., Monteil, H., Pourel, J. (1996). Detection of *Borrelia burgdorferi* by DNA amplification in synovial tissue samples from patients with Lyme arthritis. *Arthritis Rheum.* 39, 736–745.
- Jiang, B.G., Zheng, Y.C., Tong, Y.G., Jia, N., Huo, Q.B., Fan, H., Ni, X.B., Ma, L., Yang, X.F., Jiang, J.F., Cao, W.C. (2012). Genome sequence of *Borrelia afzelii* Strain HLJ01, isolated from a patient in China. *J. Bacteriol.* 194, 7014–7015.
- Johnson, R.C., Hyde, F.W., Rumpel, C.M. (1984a). Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57, 529–537.
- Johnson, R.C., Schmid, G.P., Hyde, F.W., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J. (1984b). *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic Agent of Lyme Disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 496–497.
- Jones, E.A., Deininger, S.-O., Hogendoorn, P.C.W., Deelder, A.M., McDonnell, L.A. (2012). Imaging mass spectrometry statistical analysis. *J. Proteomics* 75, 4962–4989.
- Jongejan, F., Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl, S3–14.
- Jurchen, J.C., Rubakhin, S.S., Sweedler, J.V. (2005). MALDI-MS imaging of features smaller than the size of the laser beam. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 1654–1659.
- Kaiser Jr., R.E., Graham Cooks, R., Stafford Jr., G.C., Syka, J.E.P., Hemberger, P.H. (1991). Operation of a quadrupole ion trap mass spectrometer to achieve high mass/charge ratios. *Int. J. Mass Spectrom.* 106, 79–115.
- Kaletas, B.K., van der Wiel, I.M., Stauber, J., Dekker, L.J., Güzel, C., Kros, J.M., Luider, T.M., Heeren, R.M.A. (2009). Sample preparation issues for tissue imaging by imaging MS. *Proteomics* 9, 2622–2633.

- Karas, M., Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* *60*, 2299–2301.
- Kebarle, P., Verkerk, U.H. (2009). Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.* *28*, 898–917.
- Kern, A. (2011). Inflammation cutanée lors de la transmission vectorielle de la borreliose de Lyme : étude sur modèle murin. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg.
- Kern, A., Collin, E., Barthel, C., Michel, C., Jaulhac, B., Boulanger, N. (2011). Tick saliva represses innate immunity and cutaneous inflammation in a murine model of lyme disease. *Vector Borne Zoonotic Dis.* *11*, 1343–1350.
- Keshishian, H., Addona, T., Burgess, M., Kuhn, E., Carr, S.A. (2007). Quantitative, Multiplexed Assays for Low Abundance Proteins in Plasma by Targeted Mass Spectrometry and Stable Isotope Dilution. *Mol. Cell Proteomics* *6*, 2212–2229.
- Keshishian, H., Addona, T., Burgess, M., Mani, D.R., Shi, X., Kuhn, E., Sabatine, M.S., Gerszten, R.E., Carr, S.A. (2009). Quantification of Cardiovascular Biomarkers in Patient Plasma by Targeted Mass Spectrometry and Stable Isotope Dilution. *Mol. Cell Proteomics* *8*, 2339–2349.
- Khavari, P.A. (2006). Modelling cancer in human skin tissue. *Nat Rev Cancer* *6*, 270–280.
- Kim, Y.J., Zaidi-Ainouch, Z., Gallien, S., Domon, B. (2012). Mass spectrometry-based detection and quantification of plasma glycoproteins using selective reaction monitoring. *Nat. Protoc.* *7*, 859–871.
- Kiyonami, R., Schoen, A., Prakash, A., Peterman, S., Zabrouskov, V., Picotti, P., Aebersold, R., Huhmer, A., Domon, B. (2011). Increased Selectivity, Analytical Precision, and Throughput in Targeted Proteomics. *Mol Cell Proteomics* *10*.
- Konnai, S., Nishikado, H., Yamada, S., Imamura, S., Ito, T., Onuma, M., Murata, S., Ohashi, K. (2011). Molecular identification and expression analysis of lipocalins from blood feeding taiga tick, *Ixodes persulcatus* Schulze. *Exp. Parasitol.* *127*, 467–474.
- Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I.M.B., Mather, T.N., Andersen, J.F., Ribeiro, J.M.C. (2006). Antiinflammatory and Immunosuppressive Activity of Sialostatin L, a Salivary Cystatin from the Tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* *281*, 26298–26307.
- Kotsyfakis, M., Karim, S., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C. (2007). Selective Cysteine Protease Inhibition Contributes to Blood-feeding Success of the Tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* *282*, 29256–29263.
- Kowalski, T.J., Tata, S., Berth, W., Mathiason, M.A., Agger, W.A. (2010). Antibiotic treatment duration and long-term outcomes of patients with early lyme disease from a lyme disease-hyperendemic area. *Clin. Infect. Dis.* *50*, 512–520.
- Kraiczy, P., Stevenson, B. (2013). Complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*: Structure, function and regulation of gene expression. *Ticks Tick Borne Dis.* *4*, 26–34.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Brade, V., Zipfel, P.F. (2001a). Further Characterization of Complement Regulator-Acquiring Surface Proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* *69*, 7800–7809.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V., Zipfel, P.F. (2001b). Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. *Eur. J. Immunol.* *31*, 1674–1684.
- Kuhn, E., Wu, J., Karl, J., Liao, H., Zolg, W., Guild, B. (2004). Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ¹³C-labeled peptide standards. *Proteomics* *4*, 1175–1186.
- Kuhn, E., Addona, T., Keshishian, H., Burgess, M., Mani, D.R., Lee, R.T., Sabatine, M.S., Gerszten, R.E., Carr, S.A. (2009). Developing Multiplexed Assays for Troponin I and Interleukin-33 in Plasma by Peptide Immunoaffinity Enrichment and Targeted Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* *55*, 1108–1117.
- Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Luft, B.J., Koide, S., Dunn, J.J., Lawson, C.L., Swaminathan, S. (2001). Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *EMBO J* *20*, 971–978.

- Kuzyk, M.A., Smith, D., Yang, J., Cross, T.J., Jackson, A.M., Hardie, D.B., Anderson, N.L., Borchers, C.H. (2009). Multiple Reaction Monitoring-based, Multiplexed, Absolute Quantitation of 45 Proteins in Human Plasma. *Mol. Cell Proteomics* 8, 1860–1877.
- Labandeira-Rey, M., Seshu, J., Skare, J.T. (2003). The Absence of Linear Plasmid 25 or 28-1 of *Borrelia burgdorferi* Dramatically Alters the Kinetics of Experimental Infection via Distinct Mechanisms. *Infect. Immun.* 71, 4608–4613.
- Ladislav Wiza, J. (1979). Microchannel plate detectors. *Nucl. Instrum. Methods* 162, 587–601.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. , Published Online: 15 August 1970; | Doi:10.1038/227680a0 227, 680–685.
- Lagarrigue, M., Becker, M., Lavigne, R., Deininger, S.-O., Walch, A., Aubry, F., Suckau, D., Pineau, C. (2011). Revisiting Rat Spermatogenesis with MALDI Imaging at 20- μ m Resolution. *Mol. Cell Proteomics* 10.
- Lange, V., Malmström, J.A., Didion, J., King, N.L., Johansson, B.P., Schäfer, J., Rameseder, J., Wong, C.-H., Deutsch, E.W., Brusniak, M.-Y., Bühlmann, P., Björck, L., Domon, B., Aebersold, R. (2008a). Targeted Quantitative Analysis of *Streptococcus pyogenes* Virulence Factors by Multiple Reaction Monitoring. *Mol. Cell Proteomics* 7, 1489–1500.
- Lange, V., Picotti, P., Domon, B., Aebersold, R. (2008b). Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* 4, 222.
- Lawrie, C.H., Nuttall, P.A. (2001). Antigenic profile of *Ixodes ricinus*: effect of developmental stage, feeding time and the response of different host species. *Parasite Immunol.* 23, 549–556.
- Lebet, N., Gern, L. (1994). Histological examination of *Borrelia burgdorferi* infections in unfed *Ixodes ricinus* nymphs. *Exp. Appl. Acarol.* 18, 177–183.
- Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., Godfroid, E. (2002a). Characterization of a Novel Salivary Immunosuppressive Protein from *Ixodes ricinus* Ticks. *J. Biol. Chem.* 277, 10083–10089.
- Leboulle, G., Rochez, C., Louahed, J., Ruti, B., Brossard, M., Bollen, A., Godfroid, E. (2002b). Isolation of *Ixodes ricinus* salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 225–233.
- Lefevre, T., Thomas, F., Schwartz, A., Levashina, E., Blandin, S., Brizard, J.-P., Le Bourligu, L., Demettré, E., Renaud, F., Biron, D.G. (2007). Malaria Plasmodium agent induces alteration in the head proteome of their *Anopheles* mosquito host. *Proteomics* 7, 1908–1915.
- Lemaire, R., Wisztorski, M., Desmons, A., Tabet, J.C., Day, R., Salzert, M., Fournier, I. (2006a). MALDI-MS Direct Tissue Analysis of Proteins: Improving Signal Sensitivity Using Organic Treatments. *Anal. Chem.* 78, 7145–7153.
- Lemaire, R., Tabet, J.C., Ducoroy, P., Hendra, J.B., Salzert, M., Fournier, I. (2006b). Solid Ionic Matrixes for Direct Tissue Analysis and MALDI Imaging. *Anal. Chem.* 78, 809–819.
- Lemaire, R., Desmons, A., Tabet, J.C., Day, R., Salzert, M., Fournier, I. (2007). Direct Analysis and MALDI Imaging of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Sections. *J. Proteome Res.* 6, 1295–1305.
- Letrillart, L., Ragon, B., Hanslik, T., Flahault, A. (2005). Lyme disease in France: a primary care-based prospective study. *Epidemiol. Infect.* 133, 935–942.
- Leuba-Garcia, S., Martinez, R., Gern, L. (1998). Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks and in the skin of mice. *Zentralbl. Bakteriol.* 287, 475–484.
- Li, J., Steen, H., Gygi, S.P. (2003). Protein Profiling with Cleavable Isotope-coded Affinity Tag (cICAT) Reagents The Yeast Salinity Stress Response. *Mol. Cell Proteomics* 2, 1198–1204.
- Liang, F.T., Brown, E.L., Wang, T., Iozzo, R.V., Fikrig, E. (2004). Protective Niche for *Borrelia burgdorferi* to Evade Humoral Immunity. *Am. J. Pathol.* 165, 977–985.
- Lindgren, E., Jaenson, T.G.T. (2006). Lyme Borreliosis in Europe: Influences of Climate and Climate Change, Epidemiology, Ecology and Adaptation Measures (WHO).
- Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., Yates, J.R. (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotech.* 17, 676–682.

- Lipschütz, B. (1913). Über eine seltene Erythemform (Erythema chronicum migrans). *Arch. Dermatol. Res.* **118**, 349–356.
- Lipsker, D. (2007). Dermatological aspects of Lyme borreliosis. *Med. Mal. Infect.* **37**, 540–547.
- Lipsker, D., Antoni-Bach, N., Hansmann, Y., Jaulhac, B. (2002). Long-term prognosis of patients treated for erythema migrans in France. *Brit. J. Dermatol.* **146**, 872–876.
- Liu, T., Hossain, M., Schepmoes, A.A., Fillmore, T.L., Sokoll, L.J., Kronewitter, S.R., Izmirlian, G., Shi, T., Qian, W.-J., Leach, R.J., Thompson, I.M., Chan, D.W., Smith, R.D., Kagan, J., Srivastava, S., Rodland, K.D., Camp II, D.G. (2012). Analysis of serum total and free PSA using immunoaffinity depletion coupled to SRM: correlation with clinical immunoassay tests. *J. Proteomics* **75**, 4747–4757.
- Liveris, D., Wang, G., Girao, G., Byrne, D.W., Nowakowski, J., McKenna, D., Nadelman, R., Wormser, G.P., Schwartz, I. (2002). Quantitative Detection of *Borrelia burgdorferi* in 2-Millimeter Skin Samples of Erythema Migrans Lesions: Correlation of Results with Clinical and Laboratory Findings. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1249–1253.
- Liveris, D., Schwartz, I., Bittker, S., Cooper, D., Iyer, R., Cox, M.E., Wormser, G.P. (2011). Improving the Yield of Blood Cultures from Patients with Early Lyme Disease. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2166–2168.
- Liyou, N., Hamilton, S., Elvin, C., Willadsen, P. (1999). Cloning and expression of ecto 5'-nucleotidase from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Insect Mol. Biol.* **8**, 257–266.
- Loeser, E. (2009). Peculiarities of Mobile Phases Containing Formic Acid. *Chroma* **69**, 807–811.
- Lu, P., Vogel, C., Wang, R., Yao, X., Marcotte, E.M. (2007). Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nat. Biotechnol.* **25**, 117–124.
- Lundgren, D.H., Hwang, S.-I., Wu, L., Han, D.K. (2010). Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Rev. Proteomics* **7**, 39–53.
- Maccari, F., Volpi, N. (2008). Structural characterization of the skin glycosaminoglycans in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Int. J. Dermatol.* **47**, 1024–1027.
- MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G.L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D.L., Liebler, D.C., MacCoss, M.J. (2010a). Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* **26**, 966–968.
- MacLean, B., Tomazela, D.M., Abbatiello, S.E., Zhang, S., Whiteaker, J.R., Paulovich, A.G., Carr, S.A., MacCoss, M.J. (2010b). Effect of Collision Energy Optimization on the Measurement of Peptides by Selected Reaction Monitoring (SRM) Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **82**, 10116–10124.
- Magiera, S., Baranowska, I., Kusa, J., Baranowski, J. (2013). A liquid chromatography and tandem mass spectrometry method for the determination of potential biomarkers of cardiovascular disease. *J. Chrom. B* **919–920**, 20–29.
- Mallick, P., Schirle, M., Chen, S.S., Flory, M.R., Lee, H., Martin, D., Ranish, J., Raught, B., Schmitt, R., Werner, T., Kuster, B., Aebersold, R. (2007). Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat. Biotechnol.* **25**, 125–131.
- Mamyryn, B.A. (1994). Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **131**, 1–19.
- Mannelli, A., Bertolotti, L., Gern, L., Gray, J. (2012). Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 837–861.
- Mans, B., Gaspar, A.R.M., Louw, A., Neitz, A.W. (1998). Purification and characterization of apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Comp. Biochem. Phys. B* **120**, 617–624.
- Mantovani, E., Costa, I.P., Gauditano, G., Bonoldi, V.L.N., Higuchi, M.L., Yoshinari, N.H. (2007). Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick borne disease or Lyme disease variation? *Braz. J. Med. Biol. Res.* **40**, 443–456.
- March, R.E. (1997). An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **32**, 351–369.

- Marchal, C. (2010). Inflammation cutanée et borréliose de Lyme : rôle de l'immunité innée et de la tique dans la transmission à l'homme de *Borrelia burgdorferi*. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg.
- Marchal, C., Schramm, F., Kern, A., Luft, B.J., Yang, X., Schuijt, T., Hovius, J., Jaulhac, B., Boulanger, N. (2011). Antialarmin Effect of Tick Saliva during the Transmission of Lyme Disease. *Infect. Immun.* 79, 774–785.
- Marchal, C.M.P., Luft, B.J., Yang, X., Sibia, J., Jaulhac, B., Boulanger, N.M. (2009a). Defensin Is Suppressed by Tick Salivary Gland Extract During the In Vitro Interaction of Resident Skin Cells with *Borrelia burgdorferi*. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2515–2517.
- Marchal, C.M.P., Luft, B.J., Yang, X., Sibia, J., Jaulhac, B., Boulanger, N.M. (2009b). Defensin is suppressed by tick salivary gland extract during the in vitro interaction of resident skin cells with *Borrelia burgdorferi*. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2515–2517.
- Marques, A.R. (2010). Lyme disease: a review. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 10, 13–20.
- Marshall, P., Toteu-Djomte, V., Bareille, P., Perry, H., Brown, G., Baumert, M., Biggadike, K. (2010). Correlation of skin blanching and percutaneous absorption for glucocorticoid receptor agonists by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging and liquid extraction surface analysis with nano-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 82, 7787–7794.
- Martin, D.B., Holzman, T., May, D., Peterson, A., Eastham, A., Eng, J., McIntosh, M. (2008). MRMer, an Interactive Open Source and Cross-platform System for Data Extraction and Visualization of Multiple Reaction Monitoring Experiments. *Mol. Cell Proteomics* 7, 2270–2278.
- Mayne, P.J. (2011). Emerging incidence of Lyme borreliosis, babesiosis, bartonellosis, and granulocytic ehrlichiosis in Australia. *Int. J. Gen. Med.* 4, 845–852.
- McCalley, D.V. (2005). Choice of Buffer for the Analysis of Basic Peptides in Reversed-Phase HPLC. *LCGC Europe* 18, 290–297.
- McDonnell, L.A., Corthals, G.L., Willems, S.M., van Remoortere, A., van Zeijl, R.J.M., Deelder, A.M. (2010). Peptide and protein imaging mass spectrometry in cancer research. *J. Proteomics* 73, 1921–1944.
- McLafferty, F.W., Bryce, T.A. (1967). Metastable-ion characteristics: characterization of isomeric molecules. *Chem. Commun. (London)* 1215–1217.
- McLafferty, F.W., Breuker, K., Jin, M., Han, X., Infusini, G., Jiang, H., Kong, X., Begley, T.P. (2007). Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics. *FEBS J.* 274, 6256–6268.
- McLane, M.A., Joerger, T., Mahmoud, A. (2008). Disintegrins in health and disease. *Front. Biosci.* 13, 6617–6637.
- Mead, J.A., Bianco, L., Ottone, V., Barton, C., Kay, R.G., Lilley, K.S., Bond, N.J., Bessant, C. (2009). MRMaId, the Web-based Tool for Designing Multiple Reaction Monitoring (MRM) Transitions. *Mol. Cell Proteomics* 8, 696–705.
- Miller, L.S. (2008). Toll-like receptors in skin. *Adv. Dermatol.* 24, 71–87.
- Miura, D., Fujimura, Y., Wariishi, H. (2012). In situ metabolomic mass spectrometry imaging: Recent advances and difficulties. *J. Proteomics* 75, 5052–5060.
- Murray, K.K. (2010). Glossary of terms for separations coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 3922–3928.
- Murray, K., Boyd, R., Eberlin, M., Langley, G., Liang, L., Naito, Y. (2006). Standard definitions of terms relating to mass spectrometry: 3rd Draft Document, <http://www.iupac.org/web/ins/2003-056-2-500>.
- Naleway, A.L., Belongia, E.A., Kazmierczak, J.J., Greenlee, R.T., Davis, J.P. (2002). Lyme Disease Incidence in Wisconsin: A Comparison of State-reported Rates and Rates from a Population-based Cohort. *Am. J. Epidemiol.* 155, 1120–1127.
- Narasimhan, S., Koski, R.A., Beaulieu, B., Anderson, J.F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Cappello, M., Fikrig, E. (2002). A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Mol. Biol.* 11, 641–650.

- Narasimhan, S., Montgomery, R.R., DePonte, K., Tschudi, C., Marcantonio, N., Anderson, J.F., Sauer, J.R., Cappello, M., Kantor, F.S., Fikrig, E. (2004). Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *101*, 1141–1146.
- Narasimhan, S., DePonte, K., Marcantonio, N., Liang, X., Royce, T.E., Nelson, K.F., Booth, C.J., Koski, B., Anderson, J.F., Kantor, F., Fikrig, E. (2007). Immunity against *Ixodes scapularis* Salivary Proteins Expressed within 24 Hours of Attachment Thwarts Tick Feeding and Impairs *Borrelia* Transmission. *PLoS ONE* *2*, e451.
- Nau, R., Christen, H.-J., Eiffert, H. (2009). Lyme Disease—Current State of Knowledge. *Dtsch. Arztebl. Int.* *106*, 72–82.
- Neelakanta, G., Li, X., Pal, U., Liu, X., Beck, D.S., DePonte, K., Fish, D., Kantor, F.S., Fikrig, E. (2007). Outer Surface Protein B Is Critical for *Borrelia burgdorferi* Adherence and Survival within *Ixodes* Ticks. *PLoS Pathog* *3*, e33.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* *9*, 255–262.
- Nocton, J.J., Dressler, F., Rutledge, B.J., Rys, P.N., Persing, D.H., Steere, A.C. (1994). Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *N. Engl. J. Med.* *330*, 229–234.
- Nowakowski, J., Schwartz, I., Liveris, D., Wang, G., Rosenfeld, M.E.A., Girao, G., McKenna, D., Nadelman, R.B., Cavaliere, L.F., Wormser, G.P. (2001). Laboratory Diagnostic Techniques for Patients with Early Lyme Disease Associated with Erythema Migrans: A Comparison of Different Techniques. *Clin. Infect. Dis.* *33*, 2023–2027.
- Nuttall, P.A., Paesen, G.C., Lawrie, C.H., Wang, H. (2000). Vector-host interactions in disease transmission. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *2*, 381–386.
- O’Farrell, P.H. (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* *250*, 4007–4021.
- Ong, S.-E. (2012). The expanding field of SILAC. *Anal. Bioanal. Chem.* *404*, 967–976.
- Ong, S.-E., Mann, M. (2005). Mass spectrometry–based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.* *1*, 252–262.
- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. (2002). Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* *1*, 376–386.
- Ong, S.-E., Kratchmarova, I., Mann, M. (2003). Properties of ¹³C-Substituted Arginine in Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC). *J. Proteome Res.* *2*, 173–181.
- Paesen, G.C., Adams, P.L., Harlos, K., Nuttall, P.A., Stuart, D.I. (1999). Tick Histamine-Binding Proteins: Isolation, Cloning, and Three-Dimensional Structure. *Mol. Cell* *3*, 661–671.
- Pal, U., de Silva, A.M., Montgomery, R.R., Fish, D., Anguita, J., Anderson, J.F., Lobet, Y., Fikrig, E. (2000). Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J. Clin. Invest.* *106*, 561–569.
- Pal, U., Li, X., Wang, T., Montgomery, R.R., Ramamoorthi, N., Desilva, A.M., Bao, F., Yang, X., Pypaert, M., Pradhan, D., Kantor, F.S., Telford, S., Anderson, J.F., Fikrig, E. (2004). TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* *119*, 457–468.
- Di Palma, S., Hennrich, M.L., Heck, A.J.R., Mohammed, S. (2012). Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. *J. Proteomics* *75*, 3791–3813.
- Pappin, D.J., Hojrup, P., Bleasby, A.J. (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* *3*, 327–332.
- Paster, B.J., Dewhirst, F.E. (2000). Phylogenetic foundation of spirochetes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *2*, 341–344.

- Patramool, S., Choumet, V., Surasombatpattana, P., Sabatier, L., Thomas, F., Thongrungrat, S., Rabilloud, T., Boulanger, N., Biron, D.G., Missé, D. (2012). Update on the proteomics of major arthropod vectors of human and animal pathogens. *Proteomics* 12, 3510–3523.
- Paul, W., Steinwedel, H. (1953). Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Zeitschrift Naturforschung Teil A* 8, 448–450.
- Pedra, J.H.F., Narasimhan, S., Deponte, K., Marcantonio, N., Kantor, F.S., Fikrig, E. (2006). Disruption of the Salivary Protein 14 in *Ixodes Scapularis* Nymphs and Impact on Pathogen Acquisition. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 677–682.
- Peng, J., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Licklider, L.J., Gygi, S.P. (2003). Evaluation of Multidimensional Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC/LC–MS/MS) for Large-Scale Protein Analysis: The Yeast Proteome. *J. Proteome Res.* 2, 43–50.
- Percy, A.J., Chambers, A.G., Smith, D.S., Borchers, C.H. (2013). Standardized protocols for quality control of MRM-based plasma proteomic workflows. *J. Proteome Res.* 12, 222–233.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J.C., Creasy, D.M., Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567.
- Peterková, K., Vancová, I., Hajnická, V., Slovák, M., Simo, L., Nuttall, P.A. (2008). Immunomodulatory arsenal of nymphal ticks. *Med. Vet. Entomol.* 22, 167–171.
- Picotti, P., Aebersold, R. (2012). Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat. Meth.* 9, 555–566.
- Picotti, P., Aebersold, R., Domon, B. (2007). The Implications of Proteolytic Background for Shotgun Proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 6, 1589–1598.
- Picotti, P., Bodenmiller, B., Mueller, L.N., Domon, B., Aebersold, R. (2009). Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell* 138, 795–806.
- Picotti, P., Rinner, O., Stallmach, R., Dautel, F., Farrah, T., Domon, B., Wenschuh, H., Aebersold, R. (2010). High-throughput generation of selected reaction-monitoring assays for proteins and proteomes. *Nat. Methods* 7, 43–46.
- Piesman, J., Gern, L. (2004). Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology* 129 Suppl, S191–220.
- Piesman, J., Mather, T.N., Sinsky, R.J., Spielman, A. (1987). Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J. Clin. Microbiol.* 25, 557–558.
- Pivarcsi, A., Kemény, L., Dobozy, A. (2004). Innate immune functions of the keratinocytes. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 51, 303–310.
- Prevot, P.-P., Adam, B., Boudjeltia, K.Z., Brossard, M., Lins, L., Cauchie, P., Brasseur, R., Vanhaeverbeek, M., Vanhamme, L., Godfroid, E. (2006). Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *J. Biol. Chem.* 281, 26361–26369.
- Prideaux, B., Stoeckli, M. (2012). Mass spectrometry imaging for drug distribution studies. *J. Proteomics* 75, 4999–5013.
- Prideaux, B., Atkinson, S.J., Carolan, V.A., Morton, J., Clench, M.R. (2007). Sample preparation and data interpretation procedures for the examination of xenobiotic compounds in skin by indirect imaging MALDI-MS. *Int. J. Mass Spectrom.* 260, 243–251.
- Qiu, W.-G. (2008). Wide Distribution of a High-Virulence *Borrelia burgdorferi* Clone in Europe and North America. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1097–1104.
- Qiu, Y., Sousa, E.A., Hewick, R.M., Wang, J.H. (2002). Acid-Labile Isotope-Coded Extractants: A Class of Reagents for Quantitative Mass Spectrometric Analysis of Complex Protein Mixtures. *Anal. Chem.* 74, 4969–4979.
- Rabilloud, T., Lelong, C. (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J. Proteomics* 74, 1829–1841.

- Rabilloud, T., Vaezzadeh, A.R., Potier, N., Lelong, C., Leize-Wagner, E., Chevallet, M. (2009). Power and limitations of electrophoretic separations in proteomics strategies. *Mass Spectrom. Rev.* **28**, 816–843.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J. Proteomics* **73**, 2064–2077.
- Rachinsky, A., Guerrero, F.D., Scoles, G.A. (2008). Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.* **152**, 294–313.
- Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X.F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M.V., Kantor, F.S., Anderson, J.F., Koski, R.A., Fikrig, E. (2005a). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* **436**, 573–577.
- Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X.F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M.V., Kantor, F.S., Anderson, J.F., Koski, R.A., Fikrig, E. (2005b). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* **436**, 573–577.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A.I., Mann, M. (2002). Large-Scale Proteomic Analysis of the Human Spliceosome. *Genome Res.* **12**, 1231–1245.
- Ressom, H.W., Xiao, J.F., Tuli, L., Varghese, R.S., Zhou, B., Tsai, T.-H., Nezami Ranjbar, M.R., Zhao, Y., Wang, J., Di Poto, C., Cheema, A.K., Tadesse, M.G., Goldman, R., Shetty, K. (2012). Utilization of metabolomics to identify serum biomarkers for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Anal. Chim. Acta* **743**, 90–100.
- Reyzer, M.L., Caprioli, R.M. (2007). MALDI-MS-based imaging of small molecules and proteins in tissues. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 29–35.
- Ribeiro, J.M.C., Mather, T.N. (1998). *Ixodes scapularis*: Salivary Kininase Activity Is a Metallo Dipeptidyl Carboxypeptidase. *Exp. Parasitol.* **89**, 213–221.
- Ribeiro, J.C., Weis, J.J., Telford III, S.R. (1990). Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Exp. Parasitol.* **70**, 382–388.
- Ribeiro, J.M., Makoul, G.T., Levine, J., Robinson, D.R., Spielman, A. (1985). Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J. Exp. Med.* **161**, 332–344.
- Ribeiro, J.M., Evans, P.M., MacSwain, J.L., Sauer, J. (1992). *Amblyomma americanum*: characterization of salivary prostaglandins E2 and F2 alpha by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Exp. Parasitol.* **74**, 112–116.
- Ribeiro, J.M., Anderson, J.M., Manoukis, N.C., Meng, Z., Francischetti, I.M. (2011). A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics* **12**, 136.
- Richter, D., Debski, A., Hubalek, Z., Matuschka, F.R. (2012). Absence of Lyme disease spirochetes in larval *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **12**, 21–27.
- Robertson, J., Guy, E., Andrews, N., Wilske, B., Anda, P., Granström, M., Hauser, U., Moosmann, Y., Sambri, V., Schellekens, J., Stanek, G., Gray, J. (2000). A European Multicenter Study of Immunoblotting in Serodiagnosis of Lyme Borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2097–2102.
- Roepstorff, P. (2012). Mass spectrometry based proteomics, background, status and future needs. *Protein Cell* **3**, 641–647.
- Roepstorff, P., Fohlman, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601.
- Rollend, L., Fish, D., Childs, J.E. (2013). Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: A summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis.* **4**, 46–51.
- Rosa, P.A., Tilly, K., Stewart, P.E. (2005). The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 129–143.
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A., Pappin, D.J. (2004). Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. *Mol. Cell Proteomics* **3**, 1154–1169.

- Roy, S., Touboul, D., Brunelle, A., Germain, D.-P., Prognon, P., Laprévote, O., Chaminade, P. (2006). Imaging mass spectrometry: a new tool for the analysis of skin biopsy. Application in Fabry's disease. *Ann. Pharm. Fr.* *64*, 328–334.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver, J.H. (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis* *2*, 123–128.
- Ruppen-Cañás, I., López-Casas, P.P., García, F., Ximénez-Embún, P., Muñoz, M., Morelli, M.P., Real, F.X., Serna, A., Hidalgo, M., Ashman, K. (2012). An improved quantitative mass spectrometry analysis of tumor specific mutant proteins at high sensitivity. *Proteomics* *12*, 1319–1327.
- Russell, W.K., Park, Z.Y., Russell, D.H. (2001). Proteolysis in Mixed Organic–Aqueous Solvent Systems: Applications for Peptide Mass Mapping Using Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* *73*, 2682–2685.
- Saalbach, A., Klein, C., Schirmer, C., Briest, W., Anderegg, U., Simon, J.C. (2010). Dermal fibroblasts promote the migration of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 444–454.
- Sangamnatdej, S., Paesen, G.C., Slovak, M., Nuttall, P.A. (2002). A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect Mol. Biol.* *11*, 79–86.
- Santino, I., Dastoli, F., Sessa, R., Del Piano, M. (1997). Geographical incidence of infection with *Borrelia burgdorferi* in Europe. *Panminerva Med.* *39*, 208–214.
- Santos, M., Ribeiro-Rodrigues, R., Lobo, R., Talhari, S. (2010). Antibody reactivity to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto antigens in patients from the Brazilian Amazon region with skin diseases not related to Lyme disease. *Int. J. Dermatol.* *49*, 552–556.
- Sá-Nunes, A., Bafica, A., Lucas, D.A., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C., Francischetti, I.M.B. (2007). Prostaglandin E2 Is a Major Inhibitor of Dendritic Cell Maturation and Function in *Ixodes scapularis* Saliva. *J. Immunol.* *179*, 1497–1505.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* *199*, 223–231.
- Schägger, H., Cramer, W.A., von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* *217*, 220–230.
- Schmidt, A., Kellermann, J., Lottspeich, F. (2005). A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* *5*, 4–15.
- Schramm, F. (2012). Inflammation cutanée et borréliose de Lyme : étude in vitro des interactions entre les cellules résidentes de la peau et *Borrelia*. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg.
- Schramm, F., Kern, A., Barthel, C., Nadaud, S., Meyer, N., Jaulhac, B., Boulanger, N. (2012). Microarray Analyses of Inflammation Response of Human Dermal Fibroblasts to Different Strains of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto. *PLoS ONE* *7*, e40046.
- Schroeder, H., Daix, V., Gillet, L., Renauld, J.-C., Vanderplasschen, A. (2007). The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species. *Microbes Infect.* *9*, 247–250.
- Schuijt, T.J., Narasimhan, S., Daffre, S., DePonte, K., Hovius, J.W.R., Veer, C. van't, van der Poll, T., Bakhtiari, K., Meijers, J.C.M., Boder, E.T., van Dam, A.P., Fikrig, E. (2011). Identification and Characterization of *Ixodes scapularis* Antigens That Elicit Tick Immunity Using Yeast Surface Display. *PLoS One* *6*, e15926.
- Schutzer, S.E., Fraser-Liggett, C.M., Casjens, S.R., Qiu, W.G., Dunn, J.J., Mongodin, E.F., Luft, B.J. (2011). Whole-Genome Sequences of Thirteen Isolates of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* *193*, 1018–1020.
- Schutzer, S.E., Fraser-Liggett, C.M., Qiu, W.G., Kraiczy, P., Mongodin, E.F., Dunn, J.J., Luft, B.J., Casjens, S.R. (2012). Whole-Genome Sequences of *Borrelia bissettii*, *Borrelia valaisiana*, and *Borrelia spielmanii*. *J. Bacteriol.* *194*, 545–546.
- Schwan, T.G. (2003). Temporal regulation of outer surface proteins of the Lyme-disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 108–112.

- Schwan, T.G., Piesman, J. (2000). Temporal Changes in Outer Surface Proteins A and C of the Lyme Disease-Associated Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the Chain of Infection in Ticks and Mice. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 382–388.
- Schwan, T.G., Piesman, J. (2002). Vector Interactions and Molecular Adaptations of Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes Associated with Transmission by Ticks. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 115–121.
- Schwan, T.G., Piesman, J., Golde, W.T., Dolan, M.C., Rosa, P.A. (1995). Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 2909–2913.
- Schwartz, S.A., Reyzer, M.L., Caprioli, R.M. (2003). Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J. Mass Spectrom.* **38**, 699–708.
- Scrimanti, R.J. (1970). Erythema chronicum migrans. *Arch. Dermatol.* **102**, 104–105.
- Seinost, G., Dykhuizen, D.E., Dattwyler, R.J., Golde, W.T., Dunn, J.J., Wang, I.-N., Wormser, G.P., Schriefer, M.E., Luft, B.J. (1999). Four Clones of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto Cause Invasive Infection in Humans. *Infect. Immun.* **67**, 3518–3524.
- Selevsek, N., Matondo, M., Carbayo, M.S., Aebersold, R., Domon, B. (2011). Systematic quantification of peptides/proteins in urine using selected reaction monitoring. *Proteomics* **11**, 1135–1147.
- Setou, M. (2010). *Imaging Mass Spectrometry: Protocols for Mass Microscopy* (Springer).
- Shadforth, I., Xu, W., Crowther, D., Bessant, C. (2006). GAPP: A Fully Automated Software for the Confident Identification of Human Peptides from Tandem Mass Spectra. *J. Proteome Res.* **5**, 2849–2852.
- Shaw, J., Rowlinson, R., Nickson, J., Stone, T., Sweet, A., Williams, K., Tonge, R. (2003). Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* **3**, 1181–1195.
- Sheikh, M.S., Fornace, A.J. (2000). Role of p53 family members in apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **182**, 171–181.
- Sherwood, C.A., Eastham, A., Lee, L.W., Peterson, A., Eng, J.K., Shteynberg, D., Mendoza, L., Deutsch, E.W., Risler, J., Tasman, N., Aebersold, R., Lam, H., Martin, D.B. (2009a). MaRiMba: A Software Application for Spectral Library-Based MRM Transition List Assembly. *J. Proteome Res.* **8**, 4396–4405.
- Sherwood, C.A., Eastham, A., Lee, L.W., Risler, J., Vitek, O., Martin, D.B. (2009b). Correlation between γ -Type Ions Observed in Ion Trap and Triple Quadrupole Mass Spectrometers. *J. Proteome Res.* **8**, 4243–4251.
- Sherwood, C.A., Eastham, A., Lee, L.W., Risler, J., Mirzaei, H., Falkner, J.A., Martin, D.B. (2009c). Rapid Optimization of MRM-MS Instrument Parameters by Subtle Alteration of Precursor and Product m/z Targets. *J. Proteome Res.* **8**, 3746–3751.
- Shi, T., Su, D., Liu, T., Tang, K., Camp, D.G., Qian, W.-J., Smith, R.D. (2012). Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring-based targeted quantitative proteomics. *Proteomics* **12**, 1074–1092.
- De Silva, A.M., Fikrig, E. (1995). Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in Ixodes ticks during blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**, 397–404.
- Simon, R., Girod, M., Fonbonne, C., Salvador, A., Clément, Y., Lantéri, P., Amouyel, P., Lambert, J.C., Lemoine, J. (2012). Total ApoE and ApoE4 isoform assays in an Alzheimer's disease case-control study by targeted mass spectrometry (n=669): a pilot assay for methionine-containing proteotypic peptides. *Mol. Cell Proteomics* **11**, 1389–1403.
- Simpson, D.M., Beynon, R.J. (2012). QconCATs: design and expression of concatenated protein standards for multiplexed protein quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 977–989.
- Smith, R.P., Schoen, R.T., Rahn, D.W., Sikand, V.K., Nowakowski, J., Parenti, D.L., Holman, M.S., Persing, D.H., Steere, A.C. (2002). Clinical characteristics and treatment outcome of early Lyme disease in patients with microbiologically confirmed erythema migrans. *Ann. Intern. Med.* **136**, 421–428.
- Sorrell, J.M., Caplan, A.I. (2009). Fibroblasts—a diverse population at the center of it all. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **276**, 161–214.
- Standing, K. (2000). Timing the flight of biomolecules: a personal perspective. *Int. J. Mass Spectrom.* **200**, 597–610.

- Stanek, G., Reiter, M. (2011a). The expanding Lyme Borrelia complex—clinical significance of genomic species? *Clin. Microbiol. Infect.* *17*, 487–493.
- Stanek, G., Fingerle, V., Hunfeld, K.P., Jaulhac, B., Kaiser, R., Krause, A., Kristoferitsch, W., O’Connell, S., Ornstein, K., Strle, F., Gray, J. (2011b). Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* *17*, 69–79.
- Stanek, G., Wormser, G.P., Gray, J., Strle, F. (2012). Lyme borreliosis. *Lancet* *379*, 461–473.
- Steere, A.C. (1989). Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* *321*, 586–596.
- Steere, A.C., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Shope, R.E., Andiman, W.A., Ross, M.R., Steele, F.M. (1977). Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum.* *20*, 7–17.
- Steere, A.C., Broderick, T.F., Malawista, S.E. (1978). Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. *Am. J. Epidemiol.* *108*, 312–321.
- Steere, A.C., Grodzicki, R.L., Kornblatt, A.N., Craft, J.E., Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Schmid, G.P., Johnson, E., Malawista, S.E. (1983). The Spirochetal Etiology of Lyme Disease. *N. Engl. J. Med.* *308*, 733–740.
- Steere, A.C., Sikand, V.K., Meurice, F., Parenti, D.L., Fikrig, E., Schoen, R.T., Nowakowski, J., Schmid, C.H., Laukamp, S., Buscarino, C., Krause, D.S. (1998). Vaccination against Lyme Disease with Recombinant *Borrelia burgdorferi* Outer-Surface Lipoprotein A with Adjuvant. *N. Engl. J. Med.* *339*, 209–215.
- Stewart, P.E., Byram, R., Grimm, D., Tilly, K., Rosa, P.A. (2005). The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid* *53*, 1–13.
- Stoeckli, M., Chaurand, P., Hallahan, D.E., Caprioli, R.M. (2001). Imaging mass spectrometry: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat. Med.* *7*, 493–496.
- Stoeckli, M., Staab, D., Schweitzer, A. (2007). Compound and metabolite distribution measured by MALDI mass spectrometric imaging in whole-body tissue sections. *Int. J. Mass Spectrom.* *260*, 195–202.
- Storer, E., Sheridan, A.T., Warren, L., Wayte, J. (2003). Ticks in Australia. *Australas. J. Dermatol.* *44*, 83–89.
- Strle, F., Stanek, G. (2009). Clinical manifestations and diagnosis of lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol.* *37*, 51–110.
- Strle, F., Pleterski-Rigler, D., Stanek, G., Pejovnik-Pustinek, A., Ruzic, E., Cimperman, J. (1992). Solitary borrelial lymphocytoma: report of 36 cases. *Infection* *20*, 201–206.
- Strle, F., Nadelman, R.B., Cimperman, J., Nowakowski, J., Picken, R.N., Schwartz, I., Maraspin, V., Aguero-Rosenfeld, M.E., Varde, S., Lotric-Furlan, S., Wormser, G.P. (1999). Comparison of culture-confirmed erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in New York State and by *Borrelia afzelii* in Slovenia. *Ann. Intern. Med.* *130*, 32–36.
- Strle, F., Ružič-Sabljčić, E., Cimperman, J., Lotrič-Furlan, S., Maraspin, V. (2006). Comparison of Findings for Patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* Isolated from Cerebrospinal Fluid. *Clin. Infect. Dis.* *43*, 704–710.
- Strupat, K., Karas, M., Hillenkamp, F. (1991). 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* *111*, 89–102.
- Sugiura, Y., Shimma, S., Setou, M. (2006). Thin Sectioning Improves the Peak Intensity and Signal-to-Noise Ratio in Direct Tissue Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn* *54*, 45–48.
- Sun, X.X., DeVine, T., Challagundla, K.B., Dai, M.S. (2011). Interplay between Ribosomal Protein S27a and MDM2 Protein in p53 Activation in Response to Ribosomal Stress. *J. Biol. Chem.* *286*, 22730–22741.
- Surinova, S., Schiess, R., Hüttenhain, R., Cerciello, F., Wollscheid, B., Aebersold, R. (2011). On the Development of Plasma Protein Biomarkers. *J. Proteome Res.* *10*, 5–16.
- Svec, F., Huber, C.G. (2006). Monolithic Materials: Promises, Challenges, Achievements. *Anal. Chem.* *78*, 2100–2107.
- Switzer, R.C., 3rd, Merrill, C.R., Shifrin, S. (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* *98*, 231–237.

- Syka, J.E.P., Coon, J.J., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. (2004). Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *PNAS* *101*, 9528–9533.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *2*, 151–153.
- Taverna, D., Nanney, L.B., Pollins, A.C., Sindona, G., Caprioli, R. (2011). Spatial mapping by imaging mass spectrometry offers advancements for rapid definition of human skin proteomic signatures. *Exp. Dermatol.* *20*, 642–647.
- Thézénas, M.L., Huang, H., Njie, M., Ramaprasad, A., Nwakanma, D.C., Fischer, R., Digleria, K., Walther, M., Conway, D.J., Kessler, B.M., Casals-Pascual, C. (2013). PfHPRT: A New Biomarker Candidate of Acute Plasmodium falciparum Infection. *J. Proteome Res.* *12*, 1211–1222.
- Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Hamon, C. (2003). Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* *75*, 1895–1904.
- Thomson, J.J. (1913). Bakerian Lecture: Rays of Positive Electricity. *Proc. R. Soc. Lond. A* *89*, 1–20.
- Tilly, K., Krum, J.G., Bestor, A., Jewett, M.W., Grimm, D., Bueschel, D., Byram, R., Dorward, D., VanRaden, M.J., Stewart, P., Rosa, P. (2006). Borrelia burgdorferi OspC Protein Required Exclusively in a Crucial Early Stage of Mammalian Infection. *Infect. Immun.* *74*, 3554–3564.
- Tilly, K., Bestor, A., Jewett, M.W., Rosa, P. (2007). Rapid Clearance of Lyme Disease Spirochetes Lacking OspC from Skin. *Infect. Immun.* *75*, 1517–1519.
- Tyson, K., Elkins, C., Patterson, H., Fikrig, E., de Silva, A. (2007). Biochemical and functional characterization of Salp20, an Ixodes scapularis tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Mol. Biol.* *16*, 469–479.
- Tyson, K.R., Elkins, C., Silva, A.M. de (2008). A Novel Mechanism of Complement Inhibition Unmasked by a Tick Salivary Protein That Binds to Properdin. *J. Immunol.* *180*, 3964–3968.
- Unlü, M., Morgan, M.E., Minden, J.S. (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* *18*, 2071–2077.
- Unwin, R.D., Griffiths, J.R., Leverenz, M.K., Grallert, A., Hagan, I.M., Whetton, A.D. (2005). Multiple Reaction Monitoring to Identify Sites of Protein Phosphorylation with High Sensitivity. *Mol. Cell Proteomics* *4*, 1134–1144.
- Valenzuela, J.G. (2004). Exploring tick saliva: from biochemistry to “sialomes” and functional genomics. *Parasitology* *129 Suppl*, S83–94.
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C. (2000). Purification, Cloning, and Expression of a Novel Salivary Anticomplement Protein from the Tick, Ixodes scapularis. *J. Biol. Chem.* *275*, 18717–18723.
- Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M.B., Pham, V.M., Garfield, M.K., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C. (2002). Exploring the sialome of the tick Ixodes scapularis. *J. Exp. Biol.* *205*, 2843–2864.
- Vančová, I., Hajnická, V., Slovák, M., Kocáková, P., Paesen, G.C., Nuttall, P.A. (2010a). Evasin-3-like anti-chemokine activity in salivary gland extracts of ixodid ticks during blood-feeding: a new target for tick control. *Parasite Immunol.* *32*, 460–463.
- Vančová, I., Hajnická, V., Slovák, M., Nuttall, P.A. (2010b). Anti-chemokine activities of ixodid ticks depend on tick species, developmental stage, and duration of feeding. *Vet. Parasitol.* *167*, 274–278.
- Vizcaíno, J.A., Côté, R., Reisinger, F., M. Foster, J., Mueller, M., Rameseder, J., Hermjakob, H., Martens, L. (2009). A guide to the Proteomics Identifications Database proteomics data repository. *Proteomics* *9*, 4276–4283.
- Voet, D., Voet, J.G. (2005). *Biochimie (De Boeck Supérieur)*.
- Wall, M.J., Crowell, A.M.J., Simms, G.A., Liu, F., Doucette, A.A. (2011). Implications of partial tryptic digestion in organic–aqueous solvent systems for bottom-up proteome analysis. *Anal. Chim. Acta* *703*, 194–203.

- Wang, G., Dam, A.P. van, Schwartz, I., Dankert, J. (1999a). Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications. *Clin. Microbiol. Rev.* *12*, 633–653.
- Wang, I.-N., Dykhuizen, D.E., Qiu, W., Dunn, J.J., Bosler, E.M., Luft, B.J. (1999b). Genetic Diversity of *ospC* in a Local Population of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Genetics* *151*, 15–30.
- Waxman, L., Smith, D.E., Arcuri, K.E., Vlasuk, G.P. (1990). Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science* *248*, 593–596.
- Webb-Robertson, B.-J.M., Cannon, W.R., Oehmen, C.S., Shah, A.R., Gurumoorthi, V., Lipton, M.S., Waters, K.M. (2008). A support vector machine model for the prediction of proteotypic peptides for accurate mass and time proteomics. *Bioinformatics* *24*, 1503–1509.
- Weber, K., Preac-Mursic, V., Wilske, B., Thurmayer, R., Neubert, U., Scherwitz, C. (1990). A randomized trial of ceftriaxone versus oral penicillin for the treatment of early European Lyme borreliosis. *Infection* *18*, 91–96.
- Wedge, D.C., Krishna, R., Blackhurst, P., Siepen, J.A., Jones, A.R., Hubbard, S.J. (2011). FDR Analysis: A Tool for the Integrated Analysis of Tandem Mass Spectrometry Identification Results from Multiple Search Engines. *J. Proteome Res.* *10*, 2088–2094.
- Whiteaker, J.R., Zhao, L., Anderson, L., Paulovich, A.G. (2010). An Automated and Multiplexed Method for High Throughput Peptide Immunoaffinity Enrichment and Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry-based Quantification of Protein Biomarkers. *Mol. Cell Proteomics* *9*, 184–196.
- Whiteaker, J.R., Zhao, L., Abbatiello, S.E., Burgess, M., Kuhn, E., Lin, C., Pope, M.E., Razavi, M., Anderson, N.L., Pearson, T.W., Carr, S.A., Paulovich, A.G. (2011). Evaluation of Large Scale Quantitative Proteomic Assay Development Using Peptide Affinity-based Mass Spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* *10*.
- Wiley, W.C., McLaren, I.H. (1955). Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Rev. Sci. Instrum.* *26*, 1150–1157.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.-C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F. (1996). From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nat. Biotechnol.* *14*, 61–65.
- Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U. (2007). Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *49*, 13–21.
- Wittig, I., Karas, M., Schägger, H. (2007). High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Mol. Cell Proteomics* *6*, 1215–1225.
- Wolff, M.M., Stephens, W.E. (1953). A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Rev. Sci. Instrum.* *24*, 616–617.
- Wormser, G.P., Ramanathan, R., Nowakowski, J., McKenna, D., Holmgren, D., Visintainer, P., Dornbush, R., Singh, B., Nadelman, R.B. (2003). Duration of antibiotic therapy for early Lyme disease. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* *138*, 697–704.
- Yang, X., Goldberg, M.S., Popova, T.G., Schoeler, G.B., Wikel, S.K., Hagman, K.E., Norgard, M.V. (2000). Interdependence of environmental factors influencing reciprocal patterns of gene expression in virulent *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* *37*, 1470–1479.
- Yang, X.F., Pal, U., Alani, S.M., Fikrig, E., Norgard, M.V. (2004). Essential Role for *OspA/B* in the Life Cycle of the Lyme Disease Spirochete. *J. Exp. Med.* *199*, 641–648.
- Yi, E.C., Li, X.-J., Cooke, K., Lee, H., Raught, B., Page, A., Aneliunas, V., Hieter, P., Goodlett, D.R., Aebersold, R. (2005). Increased quantitative proteome coverage with (13)C/(12)C-based, acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagent and modified data acquisition scheme. *Proteomics* *5*, 380–387.
- You, M., Xuan, X., Tsuji, N., Kamio, T., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T., Fujisaki, K. (2001). Molecular characterization of a troponin I-like protein from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *32*, 67–73.
- Zagatto, E.A.G., Oliveira, C.C., Townshend, A., Worsfold, P. (2011). Flow Analysis with Spectrophotometric and Luminometric Detection (Elsevier).

Zakett, D., Flynn, R.G.A., Cooks, R.G. (1978). Chlorine isotope effects in mass spectrometry by multiple reaction monitoring. *J. Phys. Chem.* **82**, 2359–2362.

Zhang, N., Li, L. (2004). Effects of common surfactants on protein digestion and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of the digested peptides using two-layer sample preparation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 889–896.

Zhang, J.R., Hardham, J.M., Barbour, A.G., Norris, S.J. (1997). Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell* **89**, 275–285.

Zhao, Z., Fleming, R., McCloud, B., Klempner, M.S. (2007). CD14 Mediates Cross Talk between Mononuclear Cells and Fibroblasts for Upregulation of Matrix Metalloproteinase 9 by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **75**, 3062–3069.

Zhou, H., Ranish, J.A., Watts, J.D., Aebersold, R. (2002). Quantitative proteome analysis by solid-phase isotope tagging and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **20**, 512–515.

Zubarev, R.A., Kelleher, N.L., McLafferty, F.W. (1998). Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3265–3266.

Communications Scientifiques

Publication : 1

- Parue Voinot F., Fischer C., Bœuf A., Schmidt C., Delval-Dubois V., Reichardt F., Liewig N., Chaumande B., Ehret-Sabatier L., Lignot JH., Angel F., (2012), **Effects of controlled ingestion of kaolinite (5%) on food intake, gut morphology and in vitro motility in rats.**, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 26 (5), 565-576.
- En révision Kern A., Schnell G., Bœuf A., Sabatier L., Collin E., Barthel C., De Martino S., Jaulhac B., Boulanger N. **Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* ss population and its involvement on *Borrelia* virulence: study on a murine model**, *Infection & Immunity*, publication en cours de révision, sera resoumise en décembre 2012.

Communications orales : 9

- Novembre 2010 Club jeunes SFEAP, Grenoble
Analyses protéomique et peptidomique d'extraits de glandes salivaires de tiques infectées ou non par *Borrelia*
Bœuf A., Delval V., Kern A., Jaulhac B., Boulanger N., Sabatier L.
- Novembre 2010 Journée des doctorants de l'EDSC, Strasbourg
Analyses protéomique et peptidomique d'extraits de glandes salivaires de tiques infectées ou non par *Borrelia*
Bœuf A., Delval V., Kern A., Jaulhac B., Boulanger N., Sabatier L.
- Novembre 2010 Plateforme BioPark d'Archamps, Archamps
Analyses protéomique et peptidomique des interactions tique / *Borrelia* / peau
Bœuf A., Delval V., Kern K., Jaulhac B., Boulanger N., Sabatier L.
- Avril 2011 Club jeunes SFSM, Pissos
Analyses protéomique et peptidomique des interactions tique / *Borrelia* / peau
Bœuf A., Delval V., Kern K., Jaulhac B., Boulanger N., Sabatier L.
- Septembre 2011 HUPO, Genève
Proteomic and peptidomic analyses of tick / *Borrelia* / skin interactions
Bœuf A., Delval V., Kern K., Jaulhac B., Boulanger N., Sabatier L.
- Novembre 2011 REID, Strasbourg
Analyses protéomique et peptidomique des interactions tique / *Borrelia* / peau
Bœuf A., Delval V., Kern A., Arafah K., Bulet P., Jaulhac B., Boulanger N., Sabatier L.
- Avril 2012 Journée des doctorants de l'IPHC, Strasbourg
From proteomic to supramolecular mass spectrometry
Bertaccini D., Bœuf A., Schnell G., Plumel M., Bécard S., Alayi T., Lennon S.
- Septembre 2012 SFSM, Orléans
Détection de *Borrelia burgdorferi* dans des extraits cutanés par LC-SRM
Bœuf A., Schnell G., Kern A., Collin E., Delval V., Jaulhac B., Boulanger N., Sabatier L.
- Octobre 2012 SFEAP, Rouen
Détection de *Borrelia burgdorferi* dans des extraits cutanés par LC-SRM
Bœuf A., Schnell G., Kern A., Collin E., Delval V., Jaulhac B., Boulanger N., Sabatier L.

Communications par affiche, projet de thèse : 4

- Mai 2010 SFC Grand Est, Illkirch
Borréliose de Lyme : développement de méthodes pour l'analyse protéomique et peptidomique
Bœuf A., Delval V., Kern A., Jaulhac B., Boulanger N., Sabatier L.
- Septembre 2010 SFEAP, Marseille
Analyses protéomique et peptidomique des interactions tique / *Borrelia* / peau
Bœuf A., Delval V., Kern A., Jaulhac B., Boulanger N., Sabatier L.
- Septembre 2010 SFSM, Clermont-Ferrand
Analyses protéomique et peptidomique des interactions tique / *Borrelia* / peau
Bœuf A., Delval V., Kern A., Jaulhac B., Boulanger N., Sabatier L.
- Septembre 2012 SFSM, Orléans
Analyses protéomique et peptidomique des molécules impliquées dans la transmission de la borréliose de Lyme
Schnell G., Bœuf A., Delval V., Kern A., Schramm F., Collin E., Jaulhac B., Boulanger N., Sabatier L.

Communications par affiche, projet de master : 8

- Juin 2009 Nano SMS, Nancy
Approche pluridisciplinaire du rôle des solides poreux (argiles et zéolithes) en physiologie digestive et dans la restauration fonctionnelle de l'intestin
Sabatier L., Chaumande B., Delval V., Bœuf A., Lignot J-H., Le Maho Y., Angel F., Fischer C., Liewig N., Brendlé J., Patarin J., Soulard M., Faust A-C, Malbert C-H., Louvrier P.
- Décembre 2009 1ère Rencontre Alsacienne d'Imagerie Biologique, Strasbourg
Importance de l'imagerie dans le suivi minéralogique, physiologique, chimique et protéomique des interactions argiles/intestin
Liewig N., Lignot J-H., Angel F., Fischer C., Le Maho Y., Sabatier L., Chaumande B., Delval V., Bœuf A., Brendlé J., Patarin J., Soulard M., Faust A-C., Malbert C-H., Louvrier P.
- Juillet 2010 SEB 2010, Prague
Effects of geophagia on intestinal morphology and lipid absorption
Reichardt F., Chaumande B., Fischer C., Bœuf A., Voinot F., Thery N., Sabatier L., Angel F., Liewig N., Lignot J.H.
- Août 2010 International meeting on Neurogastroenterology and Motility, Boston
Effects of kaolinite ingestion on lipid absorption, hormonal regulation and intestinal motility
Voinot F., Fischer C., Bœuf A., Sabatier L., Lignot JH., Liewig N., Angel F.
- Septembre 2010 SFEAP, Marseille
Analyse des effets de l'ingestion d'argile par une approche pluridisciplinaire
Bœuf A., Chaumande B., Delval V., Angel F., Fischer C., Voinot F., Lignot J-H, Liewig N., Sabatier L.
- Octobre 2010 Matériaux 2010, Nantes
Rôle des nanosolides poreux (argiles naturelles ou de synthèse) en physiologie digestive et dans la restauration fonctionnelle de l'intestin
Liewig N., Lignot J.-H., Sabatier L., Angel F., Brendlé J., Fischer C., Voinot F., Le Maho Y., Chaumande B., Delval V., Bœuf A., Patarin J., Soulard M., Faust A-C., Malbert C-H., Louvrier P.
- Février 2011 PMNA, Strasbourg
Rôle des solides poreux (argiles et zéolithes) en physiologie digestive et dans la restauration fonctionnelle de l'intestin
Ambroise E., Brendle J., Patarin J., Soulard M., Faust A-C., Sabatier L., Chaumande B., Delval V., Bœuf A., Lignot J-H, Le Maho Y., Angel F., Voinot F., Schmidt C., Fischer C., Liewig N., Malbert C-H., Louvrier P.
- Mai 2011 Ecole Solemio, Orsay
Rôle des solides poreux (argiles et zéolithes) en physiologie digestive
Ambroise E., Brendle J., Patarin J., Soulard M., Faust A-C., Sabatier L., Chaumande B., Delval V., Bœuf A., Lignot J-H, Le Maho Y., Angel F., Voinot F., Schmidt C., Fischer C., Liewig N., Malbert C-H., Louvrier P.

Amandine BOEUF

Développement d'approches protéomiques pour l'étude des interactions tique / *Borrelia* / peau

RESUME

La maladie de Lyme, ou borréliose de Lyme, est une infection bactérienne causée par le spirochète *Borrelia burgdorferi* sensu lato et transmise à l'hôte (homme, animal) par piqûre de tique du genre *Ixodes*. Cette maladie, caractérisée par un polymorphisme clinique important, est la maladie à transmission vectorielle la plus répandue dans l'hémisphère nord. Un traitement par antibiotiques permet une guérison rapide, mais si la maladie est diagnostiquée tardivement, certains symptômes persistent. Actuellement, aucun vaccin n'est commercialisé pour l'homme. Dans ce contexte, nous avons développé des approches protéomiques afin d'apporter de nouveaux éléments de compréhension du mécanisme d'interactions de la triade tique / bactérie / hôte. Ces travaux, visant particulièrement le développement de nouvelles stratégies vaccinales et diagnostiques, sont articulés autour de trois parties :

- L'identification, suite à de nombreuses optimisations, d'une méthode d'analyse HPLC-UV et nanoLC-MS/MS, de protéines présentes dans des extraits de glandes salivaires de tiques et possédant une activité sur la réponse immunitaire innée cutanée. Ces développements ont mis en évidence une liste restreinte de protéines potentiellement bioactives.
- La mise au point, sur un modèle murin, d'une méthode de détection d'une protéine de *Borrelia burgdorferi*, OspC, dans des biopsies cutanées par spectrométrie de masse ciblée LC-SRM. Cette étude a ouvert des perspectives quant au développement de nouveaux outils diagnostiques.
- L'évaluation de la faisabilité de la détection de *Borrelia burgdorferi* directement à la surface de la peau par imagerie par spectrométrie de masse MALDI-MSI.

ABSTRACT

Lyme disease, or Lyme borreliosis, is a bacterial infection caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmitted to the human or animal host by an *Ixodes* tick bite. This disease, characterized by a huge clinical polymorphism, is the most common vector-borne disease in the Northern Hemisphere. An antibiotic treatment allows a fast recovery, but if it is diagnosed too late, some symptoms persist. Currently, no vaccine is marketed for humans. In this context, we have developed proteomic approaches to bring new understanding to the interaction mechanism of the triad tick / bacteria / host. This work, aimed particularly at the development of new vaccinal and diagnostic strategies, has three parts:

- Identification, after numerous optimizations, of the analytical method HPLC-UV and nanoLC-MS/MS, of proteins that are present in tick salivary gland extracts and having activity on cutaneous innate immunity response. This work has highlighted a list of proteins with a potential biological activity.
- Development, with a murine model, of a method for detecting *Borrelia burgdorferi* protein, OspC, in cutaneous biopsies by targeted mass spectrometry LC-SRM. This study has opened up perspectives concerning new diagnostic tools.
- Evaluation of the feasibility of the *Borrelia burgdorferi* detection directly on the skin surface by MALDI imaging mass spectrometry.

Mots clés : Maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, *Ixodes*, Analyse protéomique, Chromatographie Liquide Haute Performance, Spectrométrie de masse, *Selected Reaction Monitoring*.