UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES

ECOLE DOCTORALE SMRE

UNITE DE SERVICE ET DE RECHERCHE CNRS 3290

LABORATOIRE DE MINIATURISATION POUR L'ANALYSE, LA SYNTHESE ET LA PROTEOMIQUE

THESE

Présentée par

Pauline Le Faouder

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Titre de la thèse

Etude des modifications des protéines induites par la fumée de cigarette

Soutenue le 29 octobre 2010 devant la commission d'examen composée de :

Président :	Docteur Florence Pinet
Rapporteurs :	Professeur Laurence Charles
	Docteur Frédéric Aubriet
Examinateur :	Monsieur Iman Emami
Directeur de thèse :	Docteur Christian Rolando
Co-encadrant :	Docteur Caroline Tokarski

A Vincent

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de miniaturisation pour l'analyse, la synthèse et la protéomique de l'université de Lille 1, sciences et technologies. Il a été financé dans le cadre d'une bourse BDI entre la société Biosyntec et le CNRS

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Christian Rolando de m'avoir permis de réaliser ma thèse sous sa direction. Je vous remercie de votre aide, de vos conseils et de votre confiance pendant ces trois années. Vous m'avez donné l'opportunité de travailler sur de nombreux spectromètres de masse me permettant de devenir totalement autonome sur chaque appareil. Je vous remercie enfin de m'avoir permis de présenter mes travaux dans différents congrès internationaux.

Je remercie le Docteur Caroline Tokarski d'avoir co-encadré ce travail. Je te remercie pour les conseils précieux lors du développement méthodologique et de ton aide systématique au niveau des machines. Ce fut un plaisir de partager ton bureau pendant ces trois ans.

Je remercie Monsieur Iman Emami, directeur de la société Biosyntec. Je vous remercie d'avoir co-financé ma thèse et de nous avoir donné votre entière confiance dans le développement scientifique. Je vous remercie également d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail.

Je remercie le Docteur Florence Pinet de l'institut Pasteur de Lille d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je tiens également à remercier les rapporteurs de ce travail de thèse. Merci au Professeur Laurence Charles de l'université de Marseille et au Docteur Frédéric Aubriet de l'université de Metz de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à remercier Anne-Sophie Lacoste, l'ingénieure de la plateforme. Anne-So, nous avons fait nos débuts ensemble dans ce laboratoire et mes trois années ont été exceptionnelles grâce à toi que ce soit sur le plan professionnel et bien sûr amical. Tous les bons moments que nous avons passés au laboratoire et à l'extérieur que ce soit les terrasses de Wazemmes ou Philadelphie resteront gravés, merci pour tout.

Je remercie vivement Sophie Dallongeville et Alexia Ortiz, les deux thésardes de l'équipe protéo. Ah les filles, notre petit groupe de 3 thésardes étaient vraiment top ! Merci pour votre soutien et les supers moments que nous avons passés ensemble ! Maintenant bon courage à vous pour votre dernière année !

Je remercie Geoffrey Vauvy, mon deuxième stagiaire ! Ce fut un vrai plaisir de t'encadrer pendant ton stage, après tu es arrivé en poste et tu m'as aidé pour la fin de mes manips de thèse. C'était vraiment agréable de travailler avec toi. Bonne chance à toi et merci!

Je remercie également l'ensemble de l'équipe de protéomique et de chimie organique du laboratoire.

Un grand merci à Grégory Tricot. Je te remercie pour tous les moments de détente que nous avons passés ensemble que ce soit au RU tous les midis et les terrasses avec Anne-So. Je te remercie également pour ton écoute et ton soutien tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier vivement Hervé Vezin, le monsieur RPE du C4. Tu as toujours été présent pour moi et tu m'as aidée dans les moments les moins faciles. Merci de m'avoir tant aidé lors de ma rédaction et tout ça toujours autour d'un bon café ! Merci beaucoup Hervé.

Merci à Hélène Déléris et Karine Delhaye. Vous êtes deux gestionnaires exceptionnelles ! J'ai pu passer des moments formidables avec vous deux et cela va me manquer.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui travaillent (ou pas) au C4, je remercie ainsi Nadia, Marc, Bertrand, Laurent, Julien, Virginie, Mélanie, Maylis (qui vient d'arriver), Francis (et les longues heures passées dans le froid à remplir le bidon d'azote)…

BONNE ROUTE A TOUS

D'un côté plus personnel, je remercie du fond du cœur ma famille et particulièrement mes parents. Vous m'avez soutenue et encouragée tout au long de ma thèse, de mon départ vers Lille aux dernières minutes avant la soutenance. Cela n'a pas dû être toujours très facile mais vous avez toujours été là. Merci infiniment.

Vincent, ma thèse n'a pas dû être très facile pour toi non plus, enfin surtout la fin ! Je te remercie de m'avoir toujours aidée mentalement et scientifiquement même à 900 km ! Je pense sincèrement que je n'aurais jamais pu finir la rédaction sans toi. Merci pour ton attention, ton soutien, en fait je te dis juste merci d'être là avec moi.

RESUME

La fumée de cigarette, reconnue comme carcinogène, est un aérosol complexe composé de plusieurs milliers de substances chimiques susceptibles de réagir avec les biomolécules. Aussi l'identification de modifications des protéines induites par la phase gazeuse de la fumée de cigarette s'avère être un enjeu majeur à la compréhension de pathologies comme les cancers des voies respiratoires ou les maladies cardiovasculaires.

L'objectif de ce travail a été de développer une méthode d'analyse basée sur la spectrométrie de masse à haute résolution afin d'identifier et de localiser les modifications des protéines exposées à la phase gazeuse de la fumée de cigarette. Deux techniques ont été utilisées : l'analyse MALDI-TOF-TOF et l'analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. Dans le but de comprendre la réaction avec la fumée de cigarette, des modèles de réactions ont été développés sur des peptides et protéines standards. Ainsi des réactions d'oxydation et de nitration ont été effectués à partir des radicaux libres $HO^{\bullet}$ et $NO_2^{\bullet}$ tandis que des réactions de formation d'adduits ont été réalisées à partir d'un équivalent molaire d'aldéhydes commerciaux (formaldéhyde, acétaldehyde, malonaldéhyde, acroléine, crotonaldéhyde et glyoxal).

Ces mêmes standards ont ensuite été exposés à la fumée de cigarette. Par comparaison avec les modèles de réaction, des adduits provenant d'aldéhydes ont pu être identifiés et localisés sur des résidus lysines. Cependant aucun adduit provenant de réaction avec des radicaux n'a été mis en évidence. Ces résultats permettent donc de conclure que les protéines sont principalement modifiées par les aldéhydes contenus dans la fumée de cigarette.

ABSTRACT

Cigarette smoke, well known to be carcinogen, is a high complex aerosol composed of further thousands of chemicals able to react with biomolecules. Also the identification of protein modifications induced by gas phase of cigarette smoke is a major stake for the understanding of some pathology like cancers of airways and cardiovascular diseases.

The aim of this work was to develop an analytical method based on high resolution mass spectrometry in order to identify and localize protein modifications induced by cigarette smoke. Two techniques were used: a MALDI-TOF-TOF analysis and a nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR analysis. In order to understand reaction with cigarette smoke, model reactions were developed on standard peptides and protein. Thus oxidation and nitration were realized using $HO^{\bullet}$ and $NO_2^{\bullet}$ free radicals while formation of adducts was performed using 1 molar equivalent of different commercial aldehydes (formaldehyde, acetaldehyde, malonaldehyde, acrolein, crotonaldehyde and glyoxal).

These standards were subsequently exposed to cigarette smoke. By comparison with model reactions, adducts coming from aldehydes were identified and localized on lysine residues. However, no adduct from the reaction with free radicals was highlighted. These results allowed concluding that proteins are principally modified by aldehydes contained in cigarette smoke.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS **5**

RESUME **9**

TABLE DES MATIÈRES **13**

ABREVIATIONS **17**

LISTE DES FIGURES **19**

LISTE DES TABLEAUX **25**

INTRODUCTION GENERALE **29**

CHAPITRE I : ANALYSE PROTEOMIQUE **33**

1. La protéomique **33**

1.1 Analyse protéomique classique 33

1.2 Analyse de modifications 34

1.2.1 Types de modifications 34

1.2.2 Identification des modifications 36

2. Analyse par spectrométrie de masse **37**

2.1 MALDI-TOF-TOF 37

2.1.1 La source MALDI 37

2.1.2 L'analyseur à temps de vol 39

2.1.3 La spectrométrie de masse TOF/TOF en tandem 41

2.2 NanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR 42

2.2.1 La nano chromatographie liquide 43

2.2.2 La source nano électrospray 44

2.2.3 L'analyseur FT-ICR 45

3. Analyse de peptides et de protéines 50
3.1 L'angiotensine I 51
3.1.1 Analyse MALDI-TOF-TOF 51
3.1.2 Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR 53
3.2 La substance P 54
3.2.1 Analyse MALDI-TOF-TOF 55
3.2.2 Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR 56
3.3 L'α-lactalbumine 58
3.3.1 Analyse MALDI-TOF-TOF 59
3.3.2 Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR 62

CHAPITRE II : DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE POUR L'ANALYSE DE MODIFICATIONS 67

1. Introduction 67

2. Modifications induites par des radicaux libres 68
2.1 Généralités 68
2.1.1 Définition 68
2.1.2 Production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote *in vivo* 68
2.1.3 Dommages cellulaires causés par les radicaux libres 70
2.1.4 Radicaux libres et pathologies 71
2.2 Radical hydroxyle 72
2.2.1 Réactivité du radical hydroxyle 72
2.2.2 Analyse par spectrométrie de masse 72
2.3 Les espèces réactives de l'azote (RNS) 78
2.3.1 Réactivité des oxydes d'azote 78
2.3.2 Analyse par spectrométrie de masse 78

3. Modifications induites par des aldéhydes 84
3.1 Les aldéhydes saturés 85
3.1.1 Le formaldéhyde 85
3.1.2 L'acétaldéhyde 95

3.2 Les aldéhydes conjugués ... 101
3.2.1 L'acroléine ... 102
3.2.2 Le crotonaldéhyde ... 107
3.3 Les dialdéhydes ... 111
3.3.1 Le malonaldéhyde ... 111
3.3.2 Le glyoxal ... 115

4. Conclusion ... 121

CHAPITRE III : APPLICATION A L'ANALYSE DES MODIFICATIONS INDUITES PAR LA FUMEE DE CIGARETTE ... 123

1. La fumée de cigarette ... 123
1.1 Composition de la phase gazeuse ... 124
1.1.1 Les espèces radicalaires ... 124
1.1.2 Les espèces carbonylées ... 125
1.1.3 Autres composants majoritaires ... 126
1.2 Fumée de cigarette et protéomique ... 127

2. Analyse des adduits engendrés par la fumée de cigarette ... 128
2.1 Fumage ... 128
2.2 Analyse des adduits engendrés par la fumée d'une bouffée de cigarette ... 130
2.2.1 L'angiotensine I ... 130
2.2.2 La substance P ... 135
2.3 Analyse des adduits engendrés par la fumée d'une cigarette ... 139
2.3.1 L'angiotensine I ... 139
2.3.2 La substance P ... 143
2.3.3 L'α-lactalbumine ... 147
2.4 Analyse des adduits minoritaires ... 149

3. Conclusion ... 152

CONCLUSION GENERALE ... 155

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 159

ANNEXES 163

1. Matériels et méthodes 163

1.1 Modifications *in vitro* de peptides et de protéines 163

1.2 Analyse par spectrométrie de masse 166

2. Réduction des échantillons au $NaBD_3CN$ 168

3. Spectres de fragmentation 172

3.1 Spectres de fragmentation MALDI-TOF-TOF 172

3.2 Spectres de fragmentation nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR 181

4. Nomenclature des acides aminés 185

ABREVIATIONS

α-LA : α-lactalbumine

AA : Acétaldéhyde

ACR : Acroléine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messager

CA : Crotonaldéhyde

COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Desease

DTT : Dithiotréitol

eq : équivalent

FA : Formaldéhyde

GO : Glyoxal

HCCA : α-cyano-4-hydroxycinnamic acid

FT-ICR : Fourier Transform Ionic Cyclotronic Resonance

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

MS : Mass spectrometry

MS/MS : Mass spectrometry/mass spectrometry ou spectrométrie de masse en tandem

MDA : Malonaldéhyde

nanoESI : nano electrospray ionisation

nanoLC : nano liquid chromatography

MPT : Modification post-traductionnelle

RCS : Reactive Carbonyl Species

RL : Radical libre

ROS : Reactive oxygen species

RNS : Reactive nitrogen species

SP : Substance P

TFE : Trifluoroéthanol

TNM : Tétranitrométhane

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Protocole d'une analyse protéomique. 34
Figure 2 : Principe de l'ionisation MALDI..... 39
Figure 3 : Schéma du principe de l'analyseur à temps de vol (A) en mode linéaire, (B) en mode réflectron. 40
Figure 4 : Schéma interne du MALDI-TOF-TOF. Spectromètre de masse d'Applied Biosystems. 42
Figure 5 : Principe de l'ionisation électrospray. A : Schéma d'une source électrospray. B : Mécanisme de la formation des ions désolvatés. 44
Figure 6 : Schéma d'une cellule ICR cubique. 46
Figure 7 : Phase d'excitation. Passage d'un mouvement incohérent des ions (à gauche) à un mouvement cohérent par application d'un champ électrique permettant de mettre en phase les ions et de mesurer leur courant induit sur les plaques de détection [23]. 47
Figure 8 : Principe de la transformée de Fourier. Passage d'un signal sinusoïdal amorti exponentiellement en temps (à gauche) à un spectre de fréquence par transformée de Fourier [23]. 48
Figure 9 : Spectromètre de masse nanoESI-FT-ICR Bruker Daltonics 9,4 T. 50
Figure 10 : Séquence de 10 acides aminés de l'angiotensine I. 51
Figure 11 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF en mode réflectron positif de 500 fmol d'angiotensine I native. 52
Figure 12 : Analyse MS^2 de l'angiotensine I native par MALDI-TOF-TOF. Spectre MS^2 de l'ion à m/z = 1296,685 ainsi que la représentation de la séquence avec les fragments identifiés. L'astérisque correspond à la perte de NH_3. 52
Figure 13 : Spectre MS nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de 200 fmol d'angiotensine I native 53
Figure 14 : Analyse MS^2 de l'angiotensine I native par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. Spectre MS^2 de l'ion à m/z 432,900 ainsi que la représentation de la séquence avec les fragments identifiés..... 54
Figure 15 : Séquence peptidique de la substance P. 54
Figure 16 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF en mode réflectron positif de 500 fmol de substance P native..... 55

Figure 17 : Analyse MS^2 de la substance P native par MALDI-TOF-TOF. Spectre MS^2 de l'ion à m/z 1347,73 ainsi que la représentation de la séquence avec les fragments identifiés..... 56
Figure 18 : Spectre MS nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de 500 fmol de substance P. 57
Figure 19 : Analyse MS^2 de la substance P native par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. 57
Figure 20 : Structure de l'α-lactalbumine. Figure issue de la publication de Permyakov et al [33]. Les ponts disulfures sont représentés en jaune. 58
Figure 21 : Séquence de 142 acides aminés de l'α-lactalbumine bovine 59
Figure 22 : Spectre MS de l'α-lactalbumine native. 59
Figure 23 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse du digest de l'α-LA par MALDI-TOF-TOF. 60
Figure 24 : Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de 500 fmol d'α-lactalbumine native..... 62
Figure 25 : Comparaison des massifs isotopiques de l'a-lactalbumine entre la simulation informatique et le spectre expérimental. A : Spectre de déconvolution nanoESI-Qh-FT-ICR MS de l'α-LA à 500 fmol/µL, 1 µL injecté. B : Profil isotopique théorique de l'α-LA tracé à partir de sa formule brute ($C_{626}H_{958}N_{162}O_{196}S_9$). 63
Figure 26 : Chromatogrammes du digest d'α-LA. A : gradient non optimisé ; B : gradient optimisé ; C Chromatogramme du digest de l'α-LA associé au gradient non-optimisé, D : Chromatogramme du digest de l'α-LA associé au gradient optimisé. 64
Figure 27 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse du digest de l'α-LA native par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. 65
Figure 28 : L'inflammation chronique causée par des agents biologiques, chimiques et physiques est associée à l'augmentation des risques de cancers et autres maladies. Figure issue de l'article de Ohshima *et al* et traduite [38]..... 69
Figure 29 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée au radical $HO^{\bullet}$. Analyse de 1 pmol..... 73
Figure 30 : Spectre MS^2 MALDI-TOF-TOF de l'ion à m/z 1312,68 de l'angiotensine I oxydée ainsi que la représentation de la séquence avec les fragments identifiés..... 73
Figure 31 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'angiotensine I oxydée. Injection de 1 pmol. 74

Figure 32 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée au radical $HO^{\bullet}$. Analyse de 1 pmol. 75
Figure 33 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la SP oxydée. Injection de 1 pmol. 76
Figure 34 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR déconvolué de l'α-LA oxydée. Injection de 1 pmol. 77
Figure 35 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA oxydée. 78
Figure 36 *:* Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 10 eq de TNM. Analyse de 1 pmol. 79
Figure 37 : Spectres MS^2 MALDI-TOF-TOF des ions à m/z = 1325,68 (A) et m/z = 1341,68 (B) de l'angiotensine I exposée au TNM ainsi que leur recouvrement de séquence avec les fragments identifiés. 80
Figure 38 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR déconvolué de l'α-LA nitrée 82
Figure 39 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA nitrée. 83
Figure 40 : Réactions entre le résidu tyrosine et le TNM. (1) Nitration du cycle aromatique, (2) Nitration et oxydation du cycle aromatique, (3) Dinitration du cycle aromatique. 83
Figure 41 : Acides aminés réagissant avec les aldéhydes. A : Lysine (K), B : Cystéine (C), C : N-terminal (N-ter), D : Histidine (H), E : Arginine (R). 84
Figure 42 : Réaction de base de Schiff (exemple de réaction à partir d'une amine primaire)..... 85
Figure 43 : Addition de Michael (exemple de réaction à partir d'une amine primaire). 85
Figure 44 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq de FA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol. 87
Figure 45 : Analyse MS^2 de l'angiotensine I exposée au formaldéhyde et réduite au $NaBH_3CN$ par MALDI-TOF-TOF. Spectre MS^2 de l'ion à m/z = 1310,70 ainsi que la représentation de la séquence avec les fragments identifiés. 88
Figure 46 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'angiotensine I exposée au FA et réduite au $NaBH_3CN$. Injection de 1 pmol. 89
Figure 47 : Spectre MS^2 nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'ion à m/z = 437,572 de l'angiotensine I exposée au FA et réduite au $NaBH_3CN$ ainsi que le recouvrement de séquence avec les ions identifiés. 90

Figure 48 : Réaction entre une amine primaire et le formaldéhyde avec formation d'un adduit C(1)H(2). 90
Figure 49 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée à 1 eq de FA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol. 91
Figure 50 : Spectre MS^2 de l'ion à m/z 1375,75 de la substance P exposée au FA et réduite au $NaBH_3CN$ par MALDI-TOF-TOF. 92
Figure 51 : Spectre MS nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la SP exposée à 1 eq de FA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol. 93
Figure 52 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée au FA et réduite au $NaBH_3CN$. 94
Figure 53 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol 97
Figure 54 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'angiotensine I exposée à 1 eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$. Injection de 1 pmol. 97
Figure 55 : Réaction entre une amine primaire et l'acétaldéhyde avec formation d'un adduit C(2)H(4). 98
Figure 56 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la SP exposée à 1 eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$. 99
Figure 57 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la substance P exposée à 1 eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$. Injection de 1 pmol. 100
Figure 58 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée à l'AA et réduite au $NaBH_3CN$. 101
Figure 59 : Formule semi-développée de l'acroléine 102
Figure 60 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq d'ACR et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol. 104
Figure 61 : Réaction entre une amine primaire et l'acroléine. (1) Formation d'une base de Schiff (adduit C(3)H(6)) ; (2) Addition de Michael (adduit C(3)H(6)O(1)). 104
Figure 62 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la SP exposée à 1 eq d'ACR et réduite au $NaBH_3CN$. 105
Figure 63 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée à 1 eq d'ACR et réduite au $NaBH_3CN$. 106

Figure 64 : Formule semi-développée du crotonaldéhyde. 107
Figure 65 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq de CA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol. 108
Figure 66 : Réaction entre une amine primaire et le crotonaldéhyde. (1) Formation d'une base de Schiff (adduit C(4)H(8)) ; (2) Addition de Michael (adduit C(4)H(8)O(1)). 108
Figure 67 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la SP exposée à 1 eq de CA et réduite au $NaBH_3CN$. 109
Figure 68 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée à 1 eq de CA et réduite au $NaBH_3CN$. 110
Figure 69 : Formule semi-développée du MDA 111
Figure 70 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq de MDA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol. 112
Figure 71 : Réaction entre une amine primaire et le MDA. Formation de l'adduit C(3)H(6)O(1) par réaction de base de Schiff. 113
Figure 72 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la SP exposée à 1 eq de MDA et réduite au $NaBH_3CN$. 114
Figure 73 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée à 1 eq de MDA et réduite au $NaBH_3CN$. 115
Figure 74 : Formule semi-développée du glyoxal. 115
Figure 75 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq de GO et réduite au $NaBH_3CN$. 117
Figure 76 : Réaction entre une amine primaire et le glyoxal. Formation de l'adduit C(2)H(4)O(1) par réaction de base de Schiff. 117
Figure 77 : Mécanisme réactionnel entre le glyoxal et le résidu arginine [99]. 118
Figure 78 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée à 1 eq de GO et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol. 119
Figure 79 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée à 1 eq de CA et réduite au $NaBH_3CN$. 120
Figure 80 : Machine à fumer LM1 (Borwaldt, kc) 129
Figure 81 : Adaptation d'un bulleur. 129
Figure 82 : Formule semi-développée de l'acrylonitrile. 131

Figure 83 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol. 132
Figure 84 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. 134
Figure 85 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la SP exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. 136
Figure 86 : Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la SP exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. 137
Figure 87 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$ 140
Figure 88 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la SP exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. 142
Figure 89 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. 144
Figure 90 : Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la SP exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. 146
Figure 91 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. 148
Figure 92 : Formule semi-développée de l'éthanolamine..... 150
Figure 93 : Spectres MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I. A : angiotensine I exposée à une bouffée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$; B : angiotensine I exposée à une bouffée de cigarette, traitée à l'éthanolamine et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol. 150
Figure 94 : Spectres MS MALDI-TOF-TOF de la substance P. A : SP exposée à une bouffée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$; B : SP exposée à une bouffée de cigarette, traitée à l'éthanolamine et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol..... 151

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Modifications post-traductionnelles principales. 35
Tableau 2 : Peptides identifiés lors de l'interrogation des banques de données du digest d'α-LA 61
Tableau 3 : Résultats MASCOT pour l'analyse du digest d'α-LA native par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. 65
Tableau 4 : Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de 1 pmol d'angiotensine I oxydée. 74
Tableau 5 : Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de 1 pmol de substance P oxydée. 76
Tableau 6 : Oxydations identifiées par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-lactalbumine exposé au peroxyde d'hydrogène en présence de Fe(II) 77
Tableau 7 : Modifications identifiées par MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée au TNM. 79
Tableau 8 : Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de 1 pmol d'angiotensine 1 exposée au TNM. 81
Tableau 9 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'α-LA exposée au TNM. 83
Tableau 10 : Modifications observées par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'angiotensine I exposée au FA et réduite au $NaBH_3CN$. 89
Tableau 11 : Modifications observées sur le spectre de masse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la substance P exposée à 1 eq de FA et réduite au $NaBH_3CN$ 93
Tableau 12 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposée au FA 94
Tableau 13 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour l'angiotensine I exposée à1 eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$. 98
Tableau 14 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour la SP exposée à 1 eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$. 100
Tableau 15 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposée à 1 eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$. 101
Tableau 16 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposée 106

Tableau 17 : Modifications identifiées par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour l'angiotensine I exposée à 1 eq de CA et réduite au NaBH3CN. 108
Tableau 18 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposée à 1 eq de CA. 110
Tableau 19 : Modifications identifiées par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour l'angiotensine I exposée à 1 eq de MDA et réduite au $NaBH_3CN$. 113
Tableau 20 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposée à 1 eq de MDA. 115
Tableau 21 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour l'angiotensine I exposée à 1 eq de GO et réduite au $NaBH_3CN$..... 118
Tableau 22 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposé à 1 eq de GO et réduit au $NaBH_3CN$ 120
Tableau 23 : Concentration des composés carbonylés identifiés dans la phase gazeuse de la fumée de cigarette pour du tabac 2R1F [89]..... 125
Tableau 24 : Concentration des principaux gaz présents dans la phase gazeuse de la fumée de cigarette d'après les résultats de Parrish *et al* [112]. Valeurs moyennées pour 5 cigarettes. 126
Tableau 25 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. 132
Tableau 26 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée cigarette et réduite au $NaBD_3CN$. 132
Tableau 27 : Adduits identifiés par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. 134
Tableau 28 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour la SP exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. 136
Tableau 29 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour la SP exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBD_3CN$. 136
Tableau 30 : Adduits identifiés par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour la SP exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$ 138
Tableau 31 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. 141

Tableau 32 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBD_3CN$. 141
Tableau 33 : Adduits identifiés en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette. 143
Tableau 34 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour la substance P exposée à la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. 144
Tableau 35 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour la substance P exposée à la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBD_3CN$. 144
Tableau 36 : Adduits identifiés par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour la SP exposée à la phase gazeuse de la fumée dune cigarette et réduite au $NaBH_3CN$ 146
Tableau 37 : Modifications identifiées par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposée à la fumée d'une cigarette. 148
Tableau 38 : Adduits identifiés en MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à une bouffée de cigarette, traitée à l'éthanolamine et réduite au $NaBH_3CN$. 151
Tableau 39 : Adduits identifiés en MALDI-TOF-TOF pour la SP exposée à une bouffée de cigarette, traitée à l'éthanolamine et réduite au $NaBH_3CN$. 151

INTRODUCTION GENERALE

Le tabac, *Nicotiana tabacum*, est une plante originaire de l'Amérique centrale découverte par Christophe Colomb adulée par les indiens, à l'époque, pour ces vertus magiques et médicamenteuses. Elle fut importée et cultivée en Europe par André Thévet. Sa consommation, réservée initialement à la noblesse sous forme de tabac à priser, fut rapidement commercialisée et représente aujourd'hui un important secteur industriel avec une production annuelle de 6 millions de tonne pour un chiffre d'affaire en France de 14 milliards d'euro et environ 45000 emplois induits. Pendant de nombreuses années, le tabac était relié à la notion de plaisir procuré par la nicotine alcaloïde agoniste des canaux ioniques récepteurs à l'acétylcholine, les récepteurs dit nicotiniques. Sa démocratisation et sa consommation croissante au cours des deux derniers siècles a engendré de nombreux problèmes sur le plan de la santé publique. En effet, au cours du 20e siècle, de nombreuses études ont montré sa toxicité et notamment sa responsabilité dans l'apparition de pathologies lourdes telles que des maladies cardiovasculaires et pulmonaires comme les bronchites chroniques, les maladies pulmonaires obstructives chroniques, les infarctus, l'athérosclérose mais également les cancers de la gorge et des poumons. La toxicité afférente au tabac est due en partie à la fumée de cigarette produite lors de la combustion du tabac. Une partie de cette toxicité est liée à la présence de goudrons qui lors du processus de combustion libère une classe de molécules, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques qui sont de puissants agents mutagènes en créant des dommages au niveau de l'ADN par des mécanismes d'intercalation. D'autres classes de composés comme les radicaux libres, les aldéhydes, les nitrosamines ou encore les phénols peuvent aussi induire des effets toxiques. Ces composés ont des concentrations relativement importantes au sein de la fumée de cigarette et leur toxicité envers des systèmes biologiques est avérée. Cependant les mécanismes par lesquels fumer contribue au développement de maladies restent encore mal connus. Les recherches, d'abord orientées sur les modifications de l'ADN, se sont rapidement tournées vers l'analyse de leur produit d'expression, c'est-à-dire les protéines. Les protéines sont le reflet de l'état d'un système biologique et seule leur étude peut permettre de comprendre son évolution.

Ainsi, la détermination des modifications protéiques est un enjeu majeur pour comprendre le développement des différentes maladies liées au tabagisme. Différentes techniques d'analyse peuvent être utilisées pour déterminer des modifications protéiques. L'immunochimie et la fluorescence sont des techniques classiquement utilisées pour l'identification de modifications. Malheureusement, ces techniques ne permettent pas de localiser précisément une modification. Aussi, l'utilisation de la spectrométrie de masse s'avère être une technique de choix non seulement pour identifier une modification mais aussi pour la localiser de manière précise.

L'objectif de cette thèse est donc de développer une technique d'analyse par spectrométrie de masse haute résolution afin de déterminer les modifications de protéines induites par la fumée de cigarette. Cette détermination comprend d'une part l'identification des modifications et d'autre part leur localisation.

La présentation de ce travail se divise en trois chapitres.

Le premier chapitre est dédié à l'analyse protéomique. Après avoir défini les termes généraux, nous avons souligné l'importance de travailler sur le protéome afin de comprendre le comportement des systèmes biologiques et l'intérêt d'utiliser la spectrométrie de masse. Ensuite, ce chapitre a fait état des différentes techniques d'analyse utilisées lors de ce travail de thèse. Ainsi, le fonctionnement de deux spectromètres de masse est expliqué. Cela inclut les modes d'ionisation, les analyseurs de masse et le couplage avec la chromatographie liquide. Enfin, l'analyse de deux peptides standards et d'une protéine est réalisée en utilisant les techniques décrites auparavant.

Le deuxième chapitre correspond au développement de réactions modèles. Dans le cadre de l'étude de l'impact de la fumée de cigarette sur les protéines, les composants majoritaires et de fortes réactivités constituant la phase gazeuse sont sélectionnés. Des réactions *in-situ* à partir de composés commerciaux sur les peptides et protéines standards décrits dans le chapitre I sont alors réalisées. L'analyse des produits de réaction par spectrométrie de masse permet de répertorier les modifications induites par chaque modèle ainsi que leurs localisations.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude des modifications induites par la phase gazeuse de la fumée de cigarette. Dans un premier temps, les composants majoritaires de la phase gazeuse de la fumée de cigarette sont présentés puis la technique utilisée pour le fumage des peptides et protéines est décrite. Après les analyses par spectrométrie de masse, l'importance des réactions modèles est soulignée et les modifications de protéines induites par la phase gazeuse de la fumée de cigarette sont identifiées et localisées.

CHAPITRE I : ANALYSE PROTEOMIQUE

1. LA PROTEOMIQUE

Le terme protéome est apparu au milieu des années 1990 [1]. Il désigne l'ensemble des protéines produites par une cellule, un tissu ou un organe dans des conditions données et à un moment précis de son développement. Le séquençage du génome humain a été officiellement achevé en 2003, cependant la connaissance seule du génome comporte des limites qui ne permettent pas de décrire précisément un modèle biologique. En effet, un génome conduit à l'expression de plusieurs protéomes en fonction des étapes du cycle cellulaire, de l'état physiologique, de la réponse à des signaux biologiques ou physiques, etc… Ceci confère un aspect dynamique au protéome [2]. Par ailleurs, la complexité de l'étude du protéome augmente avec la présence de modification des protéines. Ces dernières peuvent être induites respectivement de manière enzymatique en réponse à un stimuli (glycosylation, phosphorylation, etc), ou non-enzymatique après exposition à des facteurs environnementaux (fumée de cigarette, UV, etc). Cela met en évidence que seule l'étude du protéome permet de comprendre un système biologique.

Ainsi, le terme protéomique (étude du protéome) est associé à une large gamme de techniques d'analyse recouvrant trois axes principaux : l'identification des protéines, leur quantification et l'identification de leurs modifications.

1.1 Analyse protéomique classique

L'analyse protéomique classique se divise en plusieurs étapes (figure 1). La première étape est l'extraction du matériel protéique du milieu d'étude (cellules, tissus, plasma…). Les protéines sont ensuite séparées sur gel d'électrophorèse mono ou bidimensionnelle en fonction de leurs poids moléculaires et/ou de leurs charges par application d'un champ électrique. Après hydrolyse enzymatique *in-gel*, les protéines sont analysées par spectrométrie de masse et identifiées à partir d'outils de bioinformatique (banques de données protéiques).

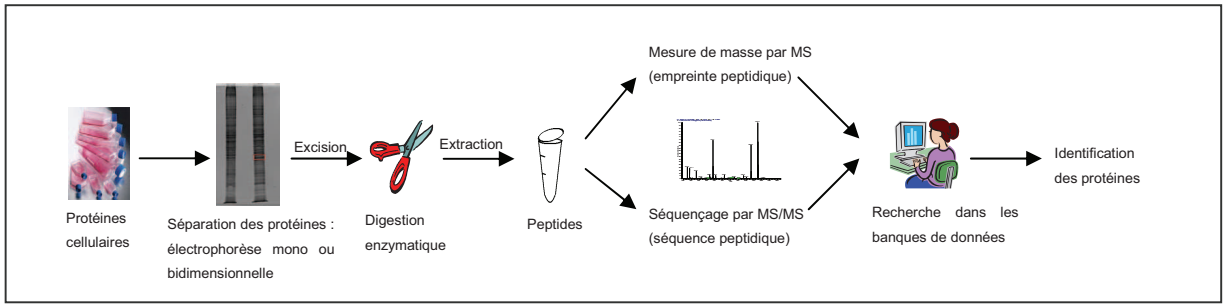


Figure 1 : Protocole d'une analyse protéomique.

Des technologies complémentaires à l'électrophorèse ont été développées pour l'analyse protéomique et notamment pour l'identification de marqueurs protéiques. Aussi, l'analyse protéomique différentielle a fait son apparition dans le but de comparer un échantillon sain avec un échantillon issu d'une pathologie. Cette technique consiste à séparer les extraits protéiques sur des gels différents et comparer les images obtenues à partir de logiciels informatiques afin de détecter des différences d'intensité entre les spots des deux gels. D'autres méthodes basées sur le marquage d'acides aminés des protéines permettent de faciliter les études quantitatives liées à l'analyse protéomique différentielle. L'une d'elle est la technique DIGE (DIfference Gel Electrophoresis). Les échantillons à comparer sont marqués par différents fluorophores et sont séparés sur le même gel d'électrophorèse. L'utilisation de lasers à différentes longueur d'onde lors de la révélation permettra de visualiser directement les niveaux d'expression protéiques. D'autres techniques se basent sur le marquage isotopique comme le SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture) ou l'iTRAQ (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) et utilisent les capacités analytiques de la spectrométrie de masse.

1.2 Analyse de modifications

1.2.1 Types de modifications

Les modifications des protéines interviennent généralement après la traduction des protéines par l'ARNm et impliquent des changements au niveau de la masse et de la structure d'une protéine. Il existe deux types principaux de modifications : les modifications post-traductionnelles (MPT) générées de manière enzymatique et les modifications induites, générées par des facteurs extérieurs c'est-à-dire de manière non-enzymatique.

Les MPT sont des modifications covalentes qui modifient les propriétés physico-chimiques par clivage protéolytique ou par ajout de groupements chimiques sur un ou plusieurs acides aminés. La présence de MPT sur une protéine peut modifier son activité, sa localisation, sa stabilité ainsi que ses interactions avec d'autres protéines. Les principales MPT avec leur fonction sont présentées dans le tableau 1. Ainsi, les MPT ont un rôle de grande importance au niveau des fonctions biologiques des protéines et à l'heure actuelle plus d'une centaine de MPT ont été dénombrées.

Nature des PTM	Δm (Da)	Stabilité	Fonctions
Phosphorylation			Réversible, activation/inactivation d'activités enzymatiques
pTyr	+80	+++	Modulation des interactions moléculaires
pSer, pTHR	+80	+/++	Signalisation
Acétylation	+42	+++	Stabilité protéique, protection N-terminale Régulation des interactions protéine-DNA (histones)
Méthylation	+14	+++	Régulation de l'expression des gènes
Acylation, acides gras			Localisation cellulaire, signalisation, Ancrage membranaire Interactions protéines/protéines
farnésyle	+204	+++	
myristoyle	+210	+++	
palmitoyle… etc	+238	+/++	
Glycosylation			Excrétion des protéines
N-glycosylation	>800	+/++	Reconnaissance cellulaire/signalisation
O-glycosylation	203, >800	+/++	O-GlcNAc, réversible, régulation fonctionnelle
« Ancre » GPI	>1000	++	Ancre Glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ancrage aux enzymes et récepteurs membranaires….
Hydroxyproline	+16	+++	Stabilité des protéines. Interactions protéines-ligands
Sulfatation (sTyr)	+80	+	Modulation Interactions protéine/protéine, récepteur/ligand
Pont disulfure	-2	+	Stabilité protéique, crosslink intra et inter moléculaire
Déamidation	+1	+++	Régulation des interactions protéines/protéines -/ligands Modifications chimique artéfactuelle
Acide pyroglutamique	-17	+++	Stabilité protéique, blocage de l'extrémité N-terminale
Ubiquitine	>1000	+/++	Signal de dégradation
Nitration des tyrosines	+45	+/++	Oxydation / processus inflammatoire

Tableau 1 : Modifications post-traductionnelles principales.
Stabilité : + labile en spectrométrie de masse en tandem, ++ modérément stable, +++ stable

La deuxième famille de modifications correspond à des modifications induites par des facteurs extérieurs tels que les UV ou les polluants environnementaux comme par exemple la fumée de cigarette. Ces modifications sont très variables puisqu'en raison de leur structure, les protéines sont très réactives vis-à-vis de diverses substances chimiques comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les espèces réactives de l'azote (RNS) ou encore les espèces réactives carbonylées (RCS).

Il est encore très difficile de distinguer avec précision les MPT des modifications induites. En effet, à titre d'exemple, si l'on considère la nitration des tyrosines, cette modification peut être induite de manière enzymatique dans un processus inflammatoire mais peut également être générer après exposition à des polluants. Ainsi, l'élucidation de l'origine des modifications reste un enjeu primordial à la compréhension de systèmes biologiques.

1.2.2 Identification des modifications

Les méthodes d'identification de modifications sont vastes et dépendent de la modification recherchée.

Une technique classiquement utilisée pour la détection des modifications est l'immunodétection. Cette technique permet de mettre en évidence une modification protéique par l'utilisation d'anticorps spécifique (par exemple anticorps dirigé contre les nitrotyrosines [3]). Cependant le champ d'utilisation de cette méthode reste limité car elle nécessite la connaissance préalable de la modification. De plus, elle ne détecte qu'un seul type de modification et ne permet pas sa localisation précise au sein de la protéine. Enfin tous les anticorps ne sont pas commercialement disponible et il est souvent long et couteux de les fabriquer.

Aussi, l'utilisation de la spectrométrie de masse est devenue une technique de choix pour la détermination de modifications protéiques. En effet, les avancées technologiques dans ce domaine ont permis d'améliorer considérablement la précision de mesure, le pouvoir résolutif, les limites de détection ainsi que les techniques de quantification de ces appareils. L'apparition des sources d'ionisation électrospray et MALDI associées à des analyseurs comme le FT-ICR et

le temps de vol ont largement contribué à faire de la spectrométrie de masse un outil d'analyse privilégié pour identifier les modifications. Un des atouts de cette technique est le développement de la spectrométrie de masse en tandem permettant la fragmentation des peptides. Généralement, les identifications se font à partir d'interrogation de banques de données. Les banques de données sont des collections de fichiers regroupant les séquences des protéines connues avec des informations sur leurs fonctions et leurs modifications éventuelles. Les outils bio-informatiques sont donc essentiels dans les sciences protéomiques et l'apparition de serveurs tels que Expasy ou MASCOT ont permis l'interrogation des banques de données. Ces serveurs permettent de sélectionner des modifications connues comme les oxydations des méthionines, la carbamidométhylation des cystéines, les phosphorylations… Cependant si la modification n'est pas connue, son identification est alors plus complexe. Dans ce cas une analyse *De Novo* du spectre de fragmentation est indispensable. Certains logiciels permettent ainsi d'identifier de nouvelles modifications, cependant, une analyse manuelle des spectres est souvent privilégiée [4].

2. ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Dans la suite de ce chapitre seront décrites les techniques de spectrométrie de masse qui ont été utilisées lors de cette étude : la technique MALDI-TOF-TOF et la technique nanoESI-FT-ICR couplée à la nano chromatographie liquide.

2.1 MALDI-TOF-TOF

2.1.1 La source MALDI

C'est à la fin des années 1980 que la désorption ionisation laser assistée par matrice (MALDI) a été décrite par Karas et Hillenkamp [5] et par une équipe japonaise (Tanaka et al.

[6]). La technique MALDI repose sur deux étapes principales : la préparation de l'échantillon et l'ionisation.

Dans la première étape, le composé à analyser est mélangé à un solvant contenant une matrice puis est déposé sur un support solide, appelé cible, généralement en acier inoxydable. Le solvant est ensuite évaporé et l'échantillon co-cristallise avec la matrice en donnant un dépôt solide. La matrice utilisée doit répondre à plusieurs critères : elle doit être soluble dans les solvants utilisés pour l'analyse de macrobiomolécules, elle doit absorber fortement à la longueur d'onde du laser et sa concentration doit être en large excès par rapport à la concentration de l'analyte. Son rôle est double puisqu'elle évite à l'échantillon de se dégrader sous l'effet de l'impact laser et elle permet de transférer l'énergie du laser aux analytes pour former les ions en phase gazeuse. Les matrices les plus couramment utilisées en protéomique pour l'analyse de peptides sont l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), et l'acide sinapinique (SA) pour l'analyse des protéines entières. Deux types de laser équipent les sources de MALDI : les lasers pulsés à azote de longueur d'onde 337 nm et les lasers de type Nd-YAG (λ = 355 nm) offrant une fréquence de tir plus rapide.

La deuxième étape correspond au processus d'ionisation (figure 2). Le processus MALDI se déroule en plusieurs étapes [7]. Dans un premier temps, les molécules de matrice sont excitées sous l'effet de l'impact laser entrainant l'accumulation d'une grande quantité d'énergie. Cet apport d'énergie cause la sublimation des cristaux de la matrice et provoque l'expansion de la matrice en phase gazeuse entrainant l'analyte intact. Ensuite, le processus d'ionisation implique probablement un transfert de proton soit avant désorption dans la phase solide soit par collision entre la matrice photoexcitée et l'analyte après désorption [8]. Une fois les ions formés en phase gazeuse, ils sont accélérés par un champ électrostatique vers l'analyseur. Généralement, la source MALDI est couplée à un analyseur à temps de vol. Cependant elle peut également être couplée avec des spectromètres de masse à piège d'ions ou à résonance ionique cyclotronique à transformée de Fourier [9, 10].

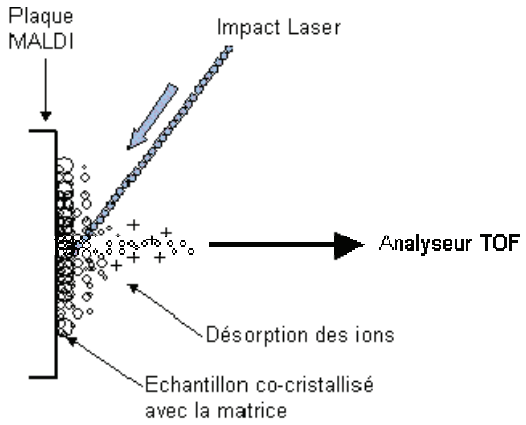


Figure 2 : Principe de l'ionisation MALDI.
L'échantillon est co-cristallisé sur une cible avec une matrice absorbant à la longueur d'onde du laser. Les ions sont générés par excitation de la matrice par le laser.

2.1.2 L'analyseur à temps de vol

Le principe d'un analyseur à temps de vol (TOF), développé dans les années 1950 [11], est de mesurer le temps de vol d'un ion, préalablement accéléré, au travers d'une zone libre de champ (tube de vol) avant d'atteindre le détecteur. Le rapport m/z (masse/charge) est directement lié au temps de vol et à la vitesse des ions d'après les relations suivantes :

$$\frac{1}{2}\,m \times v^2 = z\,V_0 \qquad avec\ V_0 = \frac{d}{t}$$

$$D'où\ \frac{m}{z} = 2V_0\left(\frac{t}{d}\right)^2$$

Où m est la masse, v la vitesse, z le nombre de charge, t le temps, d la longueur du tube de vol et V_0 le potentiel.

Il existe deux modes d'analyse des ions : le mode linéaire (figure 3A) et le mode réflectron (figure 3B).

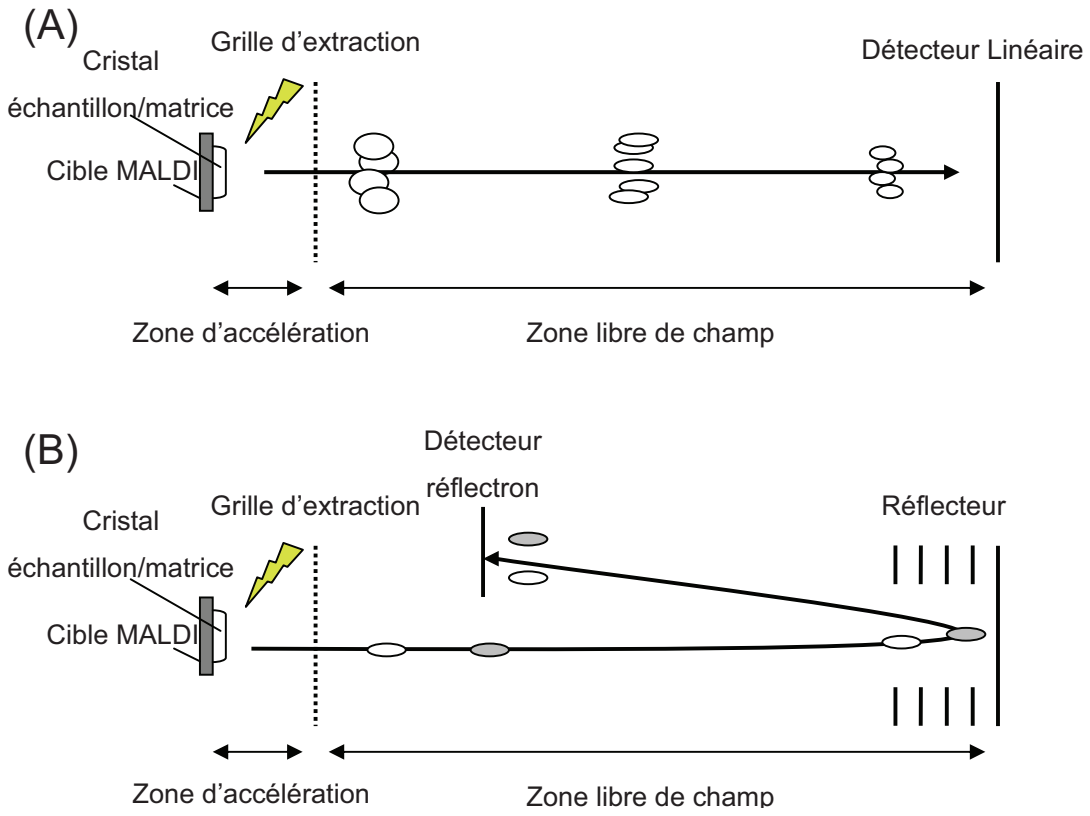


Figure 3 : Schéma du principe de l'analyseur à temps de vol (A) en mode linéaire, (B) en mode réflectron.

Dans le mode linéaire, les ions formés par irradiation laser sont expulsés de la source par paquets et accélérés vers le tube de vol par une différence de potentiel appliquée entre une électrode et la grille d'extraction conférant aux ions la même énergie cinétique. Ensuite, les ions entrent dans le tube de vol où ils sont séparés en fonction de leur vitesse acquise avant d'atteindre le détecteur à l'extrémité du tube de vol. L'analyseur en mode linéaire a une très bonne sensibilité mais est peu résolutif. Les facteurs principaux affectant la résolution du signal

sont la distribution temporelle, la distribution spatiale et la distribution en énergie cinétique initiales des ions.

Une manière d'améliorer la résolution en masse des analyseurs à temps de vol est d'employer un réflecteur électrostatique. Ce réflecteur, ou réflectron, est constitué d'une série d'anneaux ou grilles de potentiels croissants agissant comme un miroir électrostatique. Le réflectron permet la refocalisation des ions de même rapport m/z mais possédant une dispersion en énergie cinétique. Ceci permet de synchroniser leur arrivée au détecteur. Pour cela, les ions sont ralentis, réfléchis et ré-accélérés par le réflecteur. Ainsi, la refocalisation des ions permet un gain en résolution mais diminue la sensibilité et introduit une limitation dans la gamme de masse.

2.1.3 La spectrométrie de masse TOF/TOF en tandem

Les améliorations techniques réalisées sur les analyseurs à temps de vol ont permis de développer des expériences de fragmentation MS^2. Le mode PSD (Post Source Decay) permet d'observer des ions fragments produits par dégradation dans la zone libre de champ des molécules ionisées dans la source. Cependant cette technique présente des limites au niveau de la sensibilité, de la résolution et du manque de contrôle des conditions d'activation des ions précurseurs. Aussi, des appareils possédant une cellule de collision avant le réflecteur ont été développés [12] (figure 4). La cellule de collision est prévue pour la dissociation de l'ion précurseur par collision avec un gaz neutre mais les spectres de fragmentation peuvent être réalisés sans gaz de collision. Le principe de la fragmentation est simple. Les ions sont tout d'abord accélérés à la sortie de la source puis après sélection des ions parents, ils sont décélérés avant d'entrer dans la chambre de collision. Après collision et fragmentation, les ions précurseurs restants et les ions fragments sont réaccélérés par extraction pulsée et analysés par le deuxième tube de vol. Ainsi, la réalisation de spectres MS^2 sur ce type d'appareil est plus rapide, plus résolutive et sensible, ce qui a permis le développement de l'analyse protéomique à haut débit.

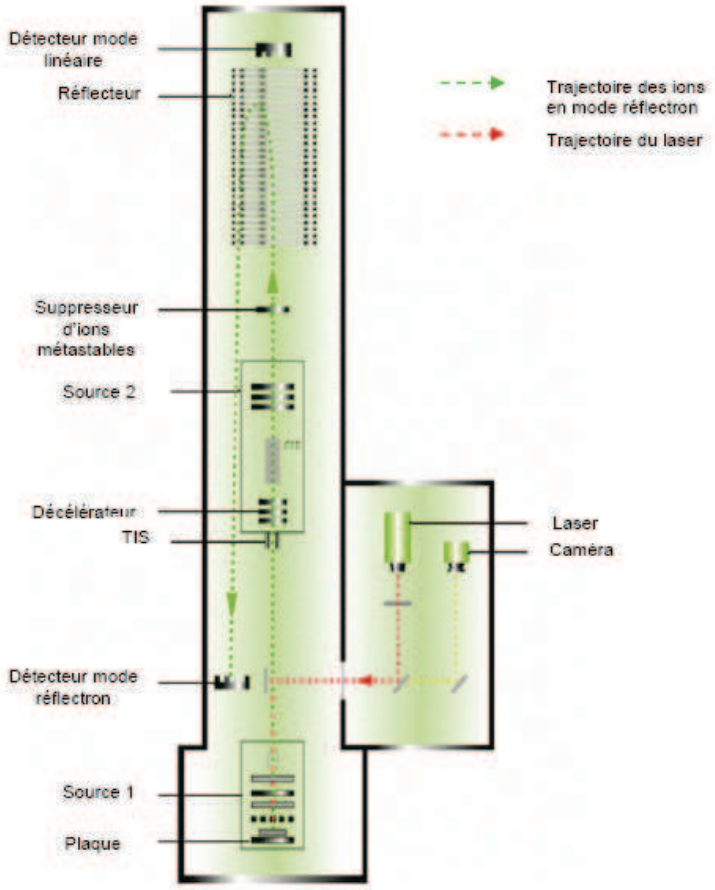


Figure 4 : Schéma interne du MALDI-TOF-TOF. Spectromètre de masse d'Applied Biosystems.

2.2 NanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR

Le couplage en ligne de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse est devenu une technique de choix pour l'analyse de mélanges complexes de peptides et de protéines dans le domaine de la protéomique. Cet outil n'a cessé d'évoluer, notamment grâce au développement des sources d'ionisation à pression atmosphérique (ESI, APCI) à la fin des années 1980. Afin d'améliorer les seuils de détection en consommant le moins d'échantillon possible, les sources nano électrospray (nanoESI) ont été développées et le couplage en ligne adapté grâce à la nano chromatographie liquide.

2.2.1 La nano chromatographie liquide

La nano chromatographie liquide (nanoLC) a été développée à la fin des années 1980 par Karlsson et al. [13] par diminution du diamètre interne des colonnes. Elle présente trois avantages majeurs comparée à la chromatographie liquide conventionnelle : l'augmentation de la sensibilité, la réduction de la consommation en échantillon et en solvant et la compatibilité avec les sources nanoESI. Les nanocolonnes classiquement utilisées en analyse protéomique ont un diamètre interne de 75 µm. Le corps est généralement constitué d'un capillaire en silice fondu de longueur comprise entre 5 et 25 cm au bout duquel est inséré un fritté. Plusieurs types de phases stationnaires existent, les plus couramment utilisées sont les phases inverses de type C4 ou C18. Les phases C4 avec des pores de 300 Å sont dédiées à l'analyse de protéines entières tandis que les phases C18 avec des pores de 100 Å sont privilégiées pour l'analyse de digestats. Récemment, des colonnes C18 avec des pores de 300 Å ont été développées et mises sur le marché favorisant l'analyse de mélanges possédant une gamme de masse étendue.

Afin d'améliorer les performances de nanoséparation, un système de préconcentration vient compléter le système de séparation. Il a deux rôles majeurs : concentrer l'échantillon et le dessaler. Les colonnes de préconcentration sont courtes, 5 mm en général, et la phase est identique à celle de la colonne analytique. L'utilisation en ligne d'un système de préconcentration nécessite deux vannes d'injection et deux systèmes de pompages indépendants. L'injection de l'échantillon se déroule en trois étapes:

- L'échantillon est chargé dans la boucle d'injection : 1 µL d'échantillon est prélevé et complété à 10 µL avec un solvant ayant une faible force éluante (tampon aqueux).
- il est envoyé en tête de précolonne à l'aide du même solvant que lors de l'injection pour y être concentré et dessalé.
- Il est enfin désorbé par une élution en sens inverse (backflush) et envoyé sur la colonne analytique.

Les avancées technologiques réalisées en nano chromatographie liquide ont ainsi permis l'amélioration des couplages en ligne avec la spectrométrie de masse. Leur utilisation est devenue un outil indispensable à l'analyse protéomique.

2.2.2 La source nano électrospray

La méthode d'ionisation par électrospray est une technique d'ionisation décrite par Fenn *et al.* en 1984 [14]. La source nano électrospray (nanoESI) est inspirée des sources électrospray et a été développée dans les années 1990 par Wilm et Mann [15, 16]. Deux types de sources nanoESI peuvent être décrits :

- La source off-line où l'échantillon est introduit dans une aiguille et poussé avec une seringue. La pointe de l'aiguille a une dimension de 1 à 2 µm permettant de travailler avec des débits de l'ordre de quelques dizaines de nL/min.

- La source on-line est utilisée en couplage avec la nano chromatographie liquide. Pour une meilleure compatibilité avec les débits de la nanoLC (environ 200 nL/min), la pointe de l'aiguille a un diamètre de 8 µm.

L'ionisation par nanoESI est obtenue par application, à pression atmosphérique, d'un potentiel (entre 1,5 et 2 kV) sur une aiguille en verre recouverte d'un alliage conducteur (généralement à base d'or et de palladium) dans laquelle est infusé l'échantillon. Ce potentiel provoque une accumulation de charge à la surface du liquide qui va se rompre pour former un spray (appelé cône de Taylor) contenant des gouttelettes fortement chargées. Le mécanisme d'ionisation est présenté figure 5.

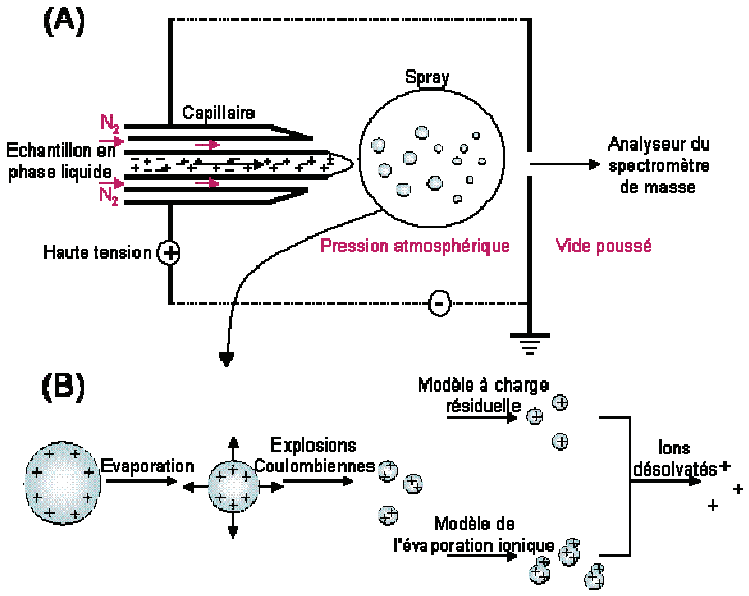


Figure 5 : Principe de l'ionisation électrospray. A : Schéma d'une source électrospray. B : Mécanisme de la formation des ions désolvatés.

L'évaporation du solvant contenu dans les gouttelettes va provoquer leur rétrécissement et ainsi augmenter la densité de charge jusqu'au moment où les forces coulombiennes répulsives approchent le niveau des forces de cohésion des gouttelettes et provoquent leur explosion formant un cône de Taylor. La fission des gouttelettes se produit avant la limite de Rayleigh car les gouttelettes sont déformées par le champ électrique intense auquel elles sont soumises. L'équation de la limite de Rayleigh montre une proportionnalité entre le rayon de la gouttelette R et sa charge (q_R) comme le montre l'équation ci-dessous, où e est la charge élémentaire de la gouttelette, γ la tension superficielle du liquide et ε_0 la permittivité du vide :

$$q_R = z_R e = 8\pi (\gamma \varepsilon_0 R^3)^{1/2}$$

Ce processus se répète. La densité de charge augmente encore par évaporation du solvant ou par formation d'un nouveau jet de gouttelettes encore plus petites jusqu'au moment où leur densité de charge devient suffisante pour provoquer la désorption d'ion [8, 17]. Les ions ainsi produits peuvent être mono ou multichargés en fonction du nombre de sites ionisables de la molécule. L'obtention de molécules multichargées permet l'analyse de molécules de hauts poids moléculaires (supérieur à 100 000 Da). En mode positif, les ions sont du type $(M+zH)^{z+}$ où M est la masse moléculaire, z le nombre de charge et H la masse du proton. Les ions ont alors un rapport masse-sur-charge m/z = (M+zH)/z. La masse de l'ion est alors obtenue par calcul de déconvolution.

Les sources nanoESI connaissent un grand essor depuis 10 ans en raison de la sensibilité très élevée et de la facilité à réaliser des couplages avec la nano chromatographie liquide.

2.2.3 L'analyseur FT-ICR

L'utilisation de la résonance d'ions cyclotronique (ICR pour ion Cyclotron resonance) avec la spectrométrie a été développée par Sommer [18] en 1949 mais c'est seulement dans les années 1980 que la spectrométrie de masse à transformée de Fourier a été décrite par Comisarow et Marshall [19-21]. Cette technique a montré de très grandes capacités en termes de résolution et de précision de masse et est à présent incontournable dans le domaine de l'analyse protéomique.

Le principe de détection des ions est basé sur la mesure de la fréquence de rotation des ions dans un champ magnétique intense. Il peut être décrit dans le cas d'une cellule cubique constituée de six plaques où chaque paire de plaques parallèles tient un rôle distinct : piégeage, excitation et détection (figure 6). Cependant différents types de cellules ont été développées comme la cellule cylindrique fermée, la cellule cylindrique ouverte ou encore la double cellule cubique [22], l'objectif commun à ces différents types de cellules étant de concilier les impératifs de piégeage avec ceux de l'excitation et de la détection.

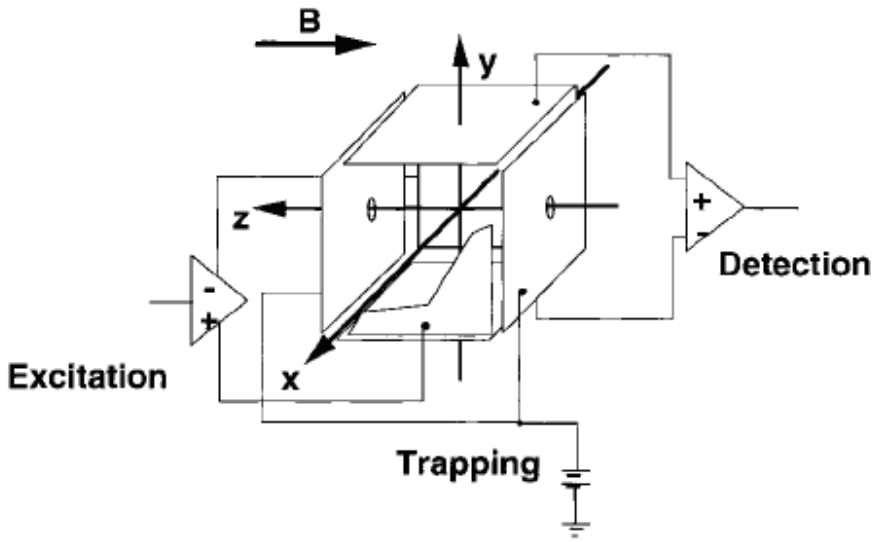


Figure 6 : Schéma d'une cellule ICR cubique.

Une particule chargée q ayant une vitesse v dans un champ magnétique uniforme B est animée d'un mouvement de rotation appelé mouvement cyclotronique. Ce mouvement résulte de l'action opposée de la force de Lorentz définie par l'équation $\vec{F}_B = qv \wedge \vec{B}$

et la force centrifuge $F_c = \frac{mv^2}{r}$

où m est la masse de l'ion et r le rayon de la trajectoire qu'il décrit ; la vitesse angulaire de l'ion étant définie par $\omega = \frac{v}{r}$

Ainsi, l'ion a une trajectoire circulaire résultant de l'équilibre de ces deux forces permettant de déterminer la fréquence de rotation cyclotronique :

$$m\omega^2 r = qB\omega r$$

d'où $\omega = \frac{qB}{m} = \frac{eB}{m/z}$

et $\upsilon = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{eB}{2\pi m/z} = \frac{1{,}535611 \times 10^7 B}{m/z}$

avec υ en Hertz et B en Tesla.

Il résulte de cette équation que la fréquence cyclotronique ne dépend que du champ magnétique et du rapport m/z de l'ion. Cependant, cette mesure ne peut pas être effectuée juste après le piégeage dans la cellule En effet, pour être détectés, les ions de même rapport m/z doivent circuler en paquets et avoir un rayon cyclotron élevé. Or ils peuvent avoir des énergies cinétiques initiales différentes et avoir été produits à différents instants, ce qui se traduit par une distribution spatiale large. Il est donc nécessaire de faire passer les ions de même m/z d'un mouvement d'ensemble incohérent à un mouvement d'ensemble cohérent, c'est à dire à rayon et à phase identiques (figure 7). Cette étape, appelée phase d'excitation, consiste à appliquer un courant électrique entre deux plaques opposées et a pour résultat non seulement de mettre en phase les ions de même rapport m/z mais aussi de provoquer une trajectoire passant à proximité de la paroi perpendiculaire à l'orbite.

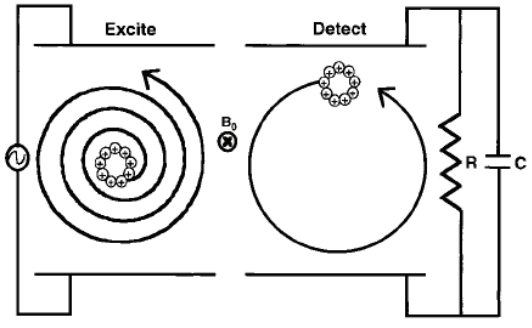


Figure 7 : Phase d'excitation. Passage d'un mouvement incohérent des ions (à gauche) à un mouvement cohérent par application d'un champ électrique permettant de mettre en phase les ions et de mesurer leur courant induit sur les plaques de détection [23].

Il a été démontré que lors de l'excitation d'un ion à sa fréquence cyclotronique avec une tension V_0 appliquée pendant une durée T_{exc}, le rayon de l'orbite est donné par l'équation [24]:

$$r = \frac{V_0 T_{\text{exc}}}{B_0}$$

où r est le rayon cyclotron, V_0 la tension appliquée, Texc le temps d'excitation et B0 le champ magnétique.

Le rayon cyclotron des ions ne dépend donc que de la tension appliquée et du temps de l'excitation et pas du rapport m/z. Aussi le contrôle de ces deux paramètres permet d'amener les ions à un rayon optimal de manière à les faire passer près des plaques de détection pour une mesure sensible sans distorsion du signal. La rotation cohérente des ions à large rayon crée un courant miroir sur les plaques de détection par interaction électrostatique entre les ions et les électrons du métal. Le signal transitoire observé pour des ions de même rapport m/z est une sinusoïde amortie exponentiellement (figure 8). Ce signal amorti est dû à divers facteurs dont les collisions ion-molécule et la répulsion coulombienne [25], qui détruisent la cohérence du paquet d'ions, qui finit par avoir une distribution radiale homogène et ne plus induire de courant dans les plaques de détection. Dans le cas où un ensemble d'ions de rapports m/z différents sont détectés, le signal correspond à la superposition des courants induits pour chaque rapport m/z. La transformée de Fourier permet de transformer ce signal en un spectre de fréquences cyclotroniques, lui-même converti en un spectre de masse.

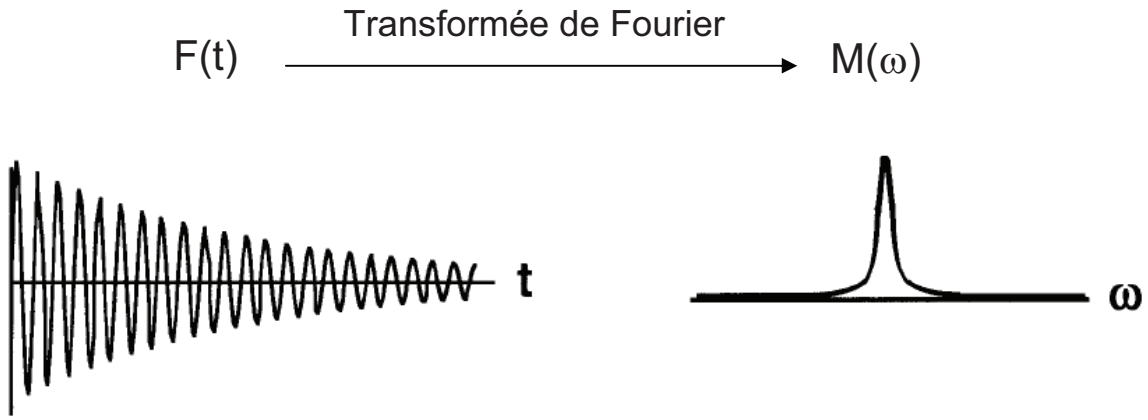


Figure 8 : Principe de la transformée de Fourier. Passage d'un signal sinusoïdal amorti exponentiellement en temps (à gauche) à un spectre de fréquence par transformée de Fourier [23].

Il existe deux modes principaux de transport des ions entre la source d'ions et la cellule ICR : les multipôles et les guides électrostatiques. Concernant les multipôles, ce sont généralement des hexapôles ou des octopôles qui sont utilisés. La fréquence et l'intensité de la tension radiofréquence appliquée aux électrodes des multipôles sont réglées afin de transmettre tous les ions suivant l'axe *z*. Pour les guides électrostatiques, un système de lentilles électrostatiques assure l'accélération, la focalisation puis la décélération des ions pour les transporter de la source à la cellule. Les instruments actuels sont basés soit sur du transport multipolaire soit sur un guide électrostatique, avec un hexapôle de stockage en aval de la source d'ionisation, ce qui permet d'optimiser la sensibilité de l'appareil.

La résolution est liée au champ magnétique et au rapport m/z d'après la relation :

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{zeBcste}{2m}$$

où cste est une constante d'amortissement du signal qui est inversement proportionnelle à la pression.

La résolution de l'appareil augmente avec l'intensité du champ magnétique et diminue avec la pression dans la cellule ICR. Dans tous les cas, étant donné la durée limitée de la mesure du signal, la résolution augmente avec la fréquence cyclotron, ce qui implique qu'elle diminue avec le rapport m/z des ions. La précision en masse dépend de la résolution mais également de la qualité de la calibration de l'appareil [26]. Une calibration interne permet d'atteindre une précision de l'ordre de 1-2 ppm sur une gamme de masse de 500 à 1500.

Ainsi, les spectromètres de masse FT-ICR font partie des appareils qui offrent les meilleurs pouvoirs de résolution et de précision de masse et permettent la détermination des structures primaires et secondaires des protéines par analyse MS et MS/MS, ainsi que de leur conformation, par étude d'échanges H/D [27].

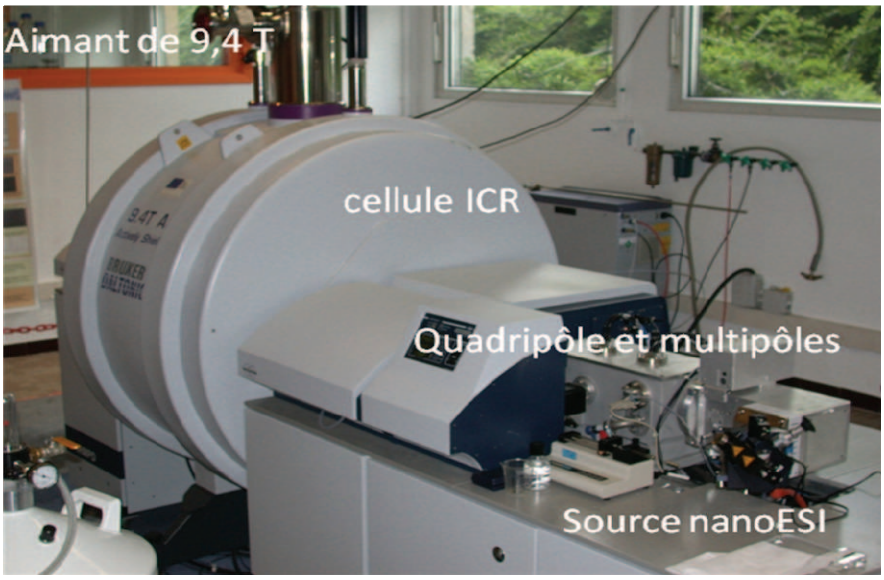


Figure 9 : Spectromètre de masse nanoESI-FT-ICR Bruker Daltonics 9,4 T.

Ainsi,

Les évolutions technologiques effectuées au niveau de la miniaturisation des techniques de chromatographie liquide et des techniques d'ionisation ont permis le développement de l'analyse protéomique. Basé sur les instruments décrits précédemment, nous avons entrepris l'analyse de trois standards peptidiques et protéiques.

3. ANALYSE DE PEPTIDES ET DE PROTEINES

Les modèles de réaction qui seront présentés dans le chapitre II ainsi que l'identification des modifications induites par la phase gazeuse de la fumée de cigarette (chapitre III) ont été effectués sur deux peptides : l'angiotensine I et la substance P, classiquement utilisés dans la littérature pour les développements expérimentaux, et une protéine l'α-lactalbumine. Avant d'étudier des modifications post-traductionnelles, il est indispensable de réaliser en amont les analyses des peptides et protéines natives. Ainsi, les analyses ont été réalisées conjointement sur

les spectromètres de masse MALDI-TOF-TOF 4800 (Applied Biosystems) et nano-ESI-FT-ICR (Bruker Daltonics 9,4 T), ce dernier étant couplé à une chaine de nano chromatographie liquide (Dionex).

3.1 L'angiotensine I

En cas de chute de la pression artérielle, l'angiotensinogène est synthétisée par le foie et est transférée dans le plasma. Cette glycoprotéine est clivée sous l'action de la rénine libérant un décapeptide biologiquement inactif l'angiotensine I dont la séquence est représentée figure 10. L'enzyme de conversion transforme ensuite l'angiotensine I en angiotensine II, octopeptide actif par clivage de la liaison peptidique entre la phénylalanine (F) et l'histidine (H) [28] (Cf nomenclature des acides aminés en annexe 4).

H_2N - D R V Y I H P F H L - COOH

Figure 10 : Séquence de 10 acides aminés de l'angiotensine I.

3.1.1 Analyse MALDI-TOF-TOF

Les analyses MS et MS^2 de l'angiotensine I native ont été réalisées dans un premier temps sur le spectromètre de masse MALDI-TOF-TOF en mode réflectron positif. Le spectromètre est calibré en amont avec un mélange peptidique composé d'angiotensine II (MH^+ = 1046,542 Da), d'angiotensine I (MH^+ = 1296,685 Da), de neurotensine (MH^+ = 1672,918 Da), d'ACTH fragments 1-17 (MH^+ = 2093,087 Da) et d'ACTH fragments 18-39 (MH^+ = 2465,199 Da). Ainsi, l'angiotensine I monochargée MH^+ est observée sur le spectre de masse au rapport m/z 1296,685 ($(\Delta m/m)\times 10^6$ = 0,1 ppm) (figure 11). Cet ion parent a ensuite été sélectionné et fragmenté au sein de la cellule de collision en utilisant l'argon comme gaz de collision. Le spectre de fragmentation montre un recouvrement de séquence total entre b_2^+ et b_9^+ ainsi qu'entre y_2^+ et y_9^+ (figure 12). Enfin la précision de mesure obtenue sur les ions fragments est de ± 20 ppm, les ions ayant une répartition homogène autour de zéro.

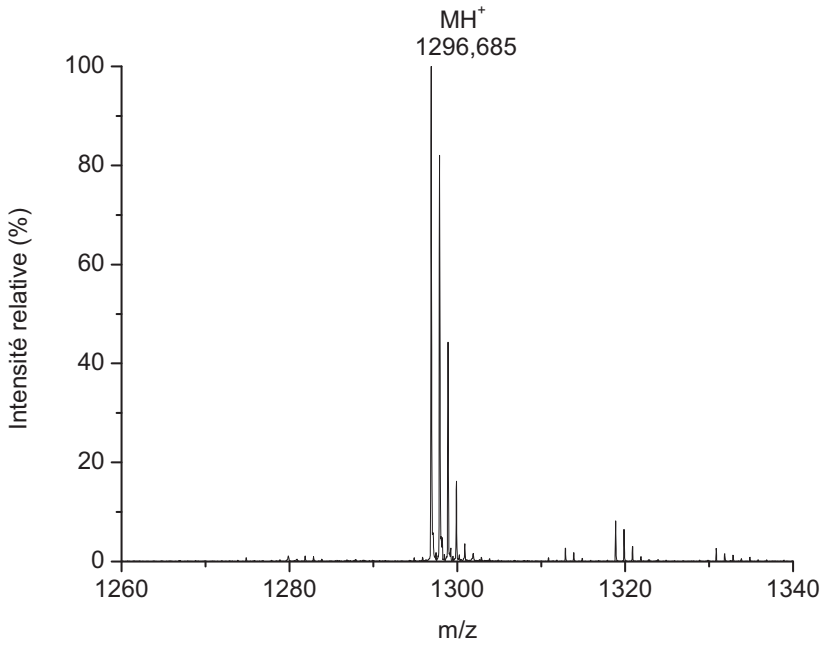


Figure 11 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF en mode réflectron positif de 500 fmol d'angiotensine I native. Analyse de 500 fmol, matrice HCCA

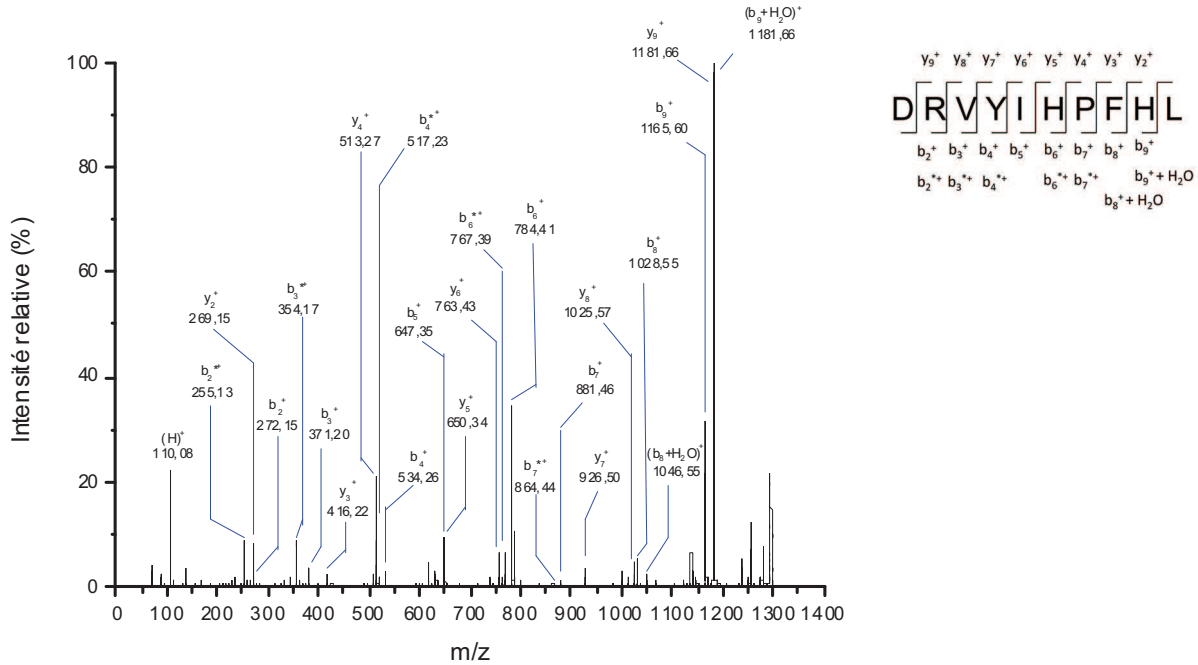


Figure 12 : Analyse MS^2 de l'angiotensine I native par MALDI-TOF-TOF. Spectre MS^2 de l'ion à m/z = 1296,685 ainsi que la représentation de la séquence avec les fragments identifiés. L'astérisque correspond à la perte de NH_3.

3.1.2 Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR

L'analyse de l'angiotensine I native a ensuite été entreprise en nanoESI-Qh-FT-ICR avec un couplage nanoLC de 3 h. La nanocolonne analytique utilisée est une phase de type inverse C18 avec des pores de 100 Å, adaptée à la séparation de peptides. Le spectre de masse montre la formation de trois ions majoritaires : l'ion moléculaire trichargé à m/z 432,900 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 1,2 ppm), l'ion moléculaire dichargé à m/z 648,848 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 2,2 ppm) et l'ion à m/z 513,283 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 1,9 ppm) correspondant à l'ion fragment y_4^+ (figure 13). Le spectre de fragmentation de l'ion trichargé a été réalisé dans la gamme de masse 300-2000 en mode CID (figure 14). Les séries des ions a et b dominent le spectre de fragmentation avec un maximum d'intensité pour les ions b. Ils sont observés à partir de $(a/b)_4^+$ jusqu'à $(a/b)_9^+$. Enfin, l'ion y_4^+, déjà présent sur le spectre MS, est également identifié sur le spectre MS^2. On note par ailleurs la présence des fragments internes HPF^+ (6-8), $RVYI^+$ (2-5), $RVYIH^+$ (2-7) et $RVYIHPF^+$ (2-8) qui n'avaient pas été observés lors de l'analyse MALDI-TOF-TOF. Enfin, tous les ions issus de la fragmentation de l'angiotensine I native ont des différences de masses par rapport à la masse théorique comprises entre – 0,5 et + 0,5 ppm.

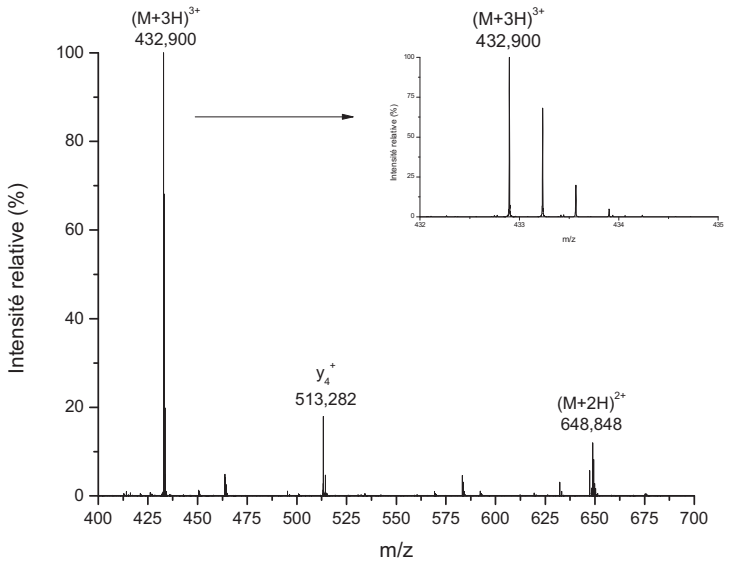


Figure 13 : Spectre MS nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de 200 fmol d'angiotensine I native

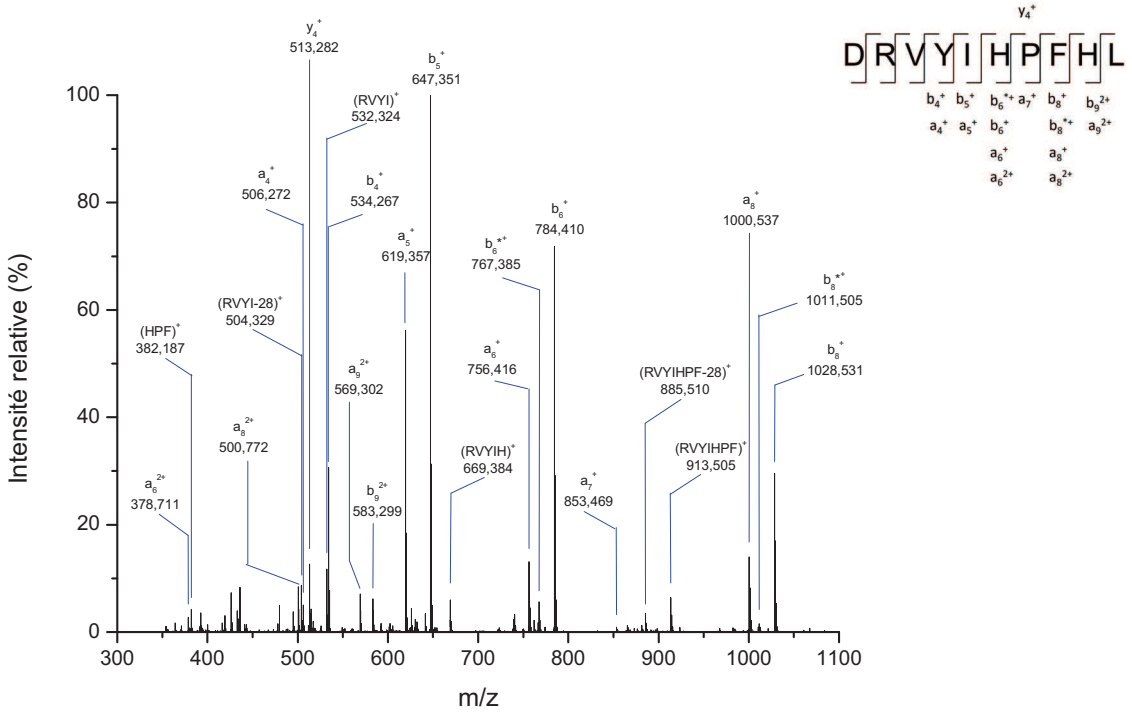


Figure 14 : Analyse MS^2 de l'angiotensine I native par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. Spectre MS^2 de l'ion à m/z 432,900 ainsi que la représentation de la séquence avec les fragments identifiés.

3.2 La substance P

La substance P (SP) est un peptide de 11 acides aminés appartenant à la famille des tachykinines caractérisée par leur site actif situé en C-terminal. La SP a été découverte et décrite dans les années 1970 par Leeman et Chang [29, 30] et est à présent considérée comme étant le principal neurotransmetteur de la douleur. La SP a été choisie comme modèle peptidique car elle contient les principaux acides aminés d'intérêt à savoir l'arginine et la lysine pour leur fonction amine et la méthionine reconnue comme site d'oxydation. Par ailleurs, le site actif de la SP, C-terminal, est bloqué par amidation du groupe carboxyle (figure 15).

$$H_2N - R\ P\ K\ P\ Q\ Q\ F\ F\ G\ L\ M - NH_2$$

Figure 15 : Séquence peptidique de la substance P.

3.2.1 Analyse MALDI-TOF-TOF

Le spectre de masse MALDI-TOF-TOF de la substance P montre deux pics majoritaires aux rapports m/z 1347,74 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,1 ppm) et 1363,74 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 4,3 ppm) correspondant respectivement aux formes native et oxydée du peptide (figure 16), l'oxydation étant une modification post-traductionnelle courante de l'acide aminé méthionine. La fragmentation de l'ion moléculaire MH^+ a été réalisée dans un premier temps en utilisant l'air comme gaz de collision. Il s'est avéré que seuls les ions de hautes masses comme MH^+-H_20 et b_{10}^+ ont été identifiés sur le spectre. L'augmentation de la pression au sein de la cellule de collision n'a pas permis d'obtenir plus d'ions fragments. Ainsi, comme pour l'angiotensine I, l'argon a été choisi comme gaz de collision pour les analyses MS^2. Après ajustement des conditions de fragmentation, le spectre MS^2 obtenu pour l'ion MH^+ présente un recouvrement quasi-total des séries d'ions a et b de $(a/b)_2^+$ à $(a/b)_{10}^+$ et un ion y est identifié (y_8^+). Sur ce spectre MS^2, la présence des fragments internes KP/PK, PKP (2-4), PQQ (4-6) et PQQF (4-7) est également observée (figure 17). Le spectre de fragmentation de la SP oxydée confirme la localisation de l'oxydation sur la méthionine. En effet, le pic majoritaire du spectre de fragmentation observé au rapport m/z 1299,67 correspondant à l'ion $(MH\text{-}SO)^+$, tous les autres ions ont une intensité très faible, cependant certains ions b ont pu être identifiés sans modification (annexe 3).

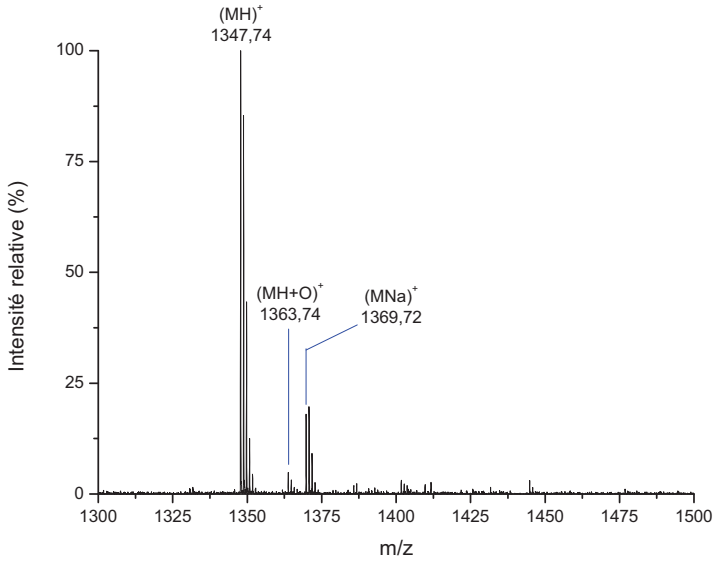


Figure 16 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF en mode réflectron positif de 500 fmol de substance P native.

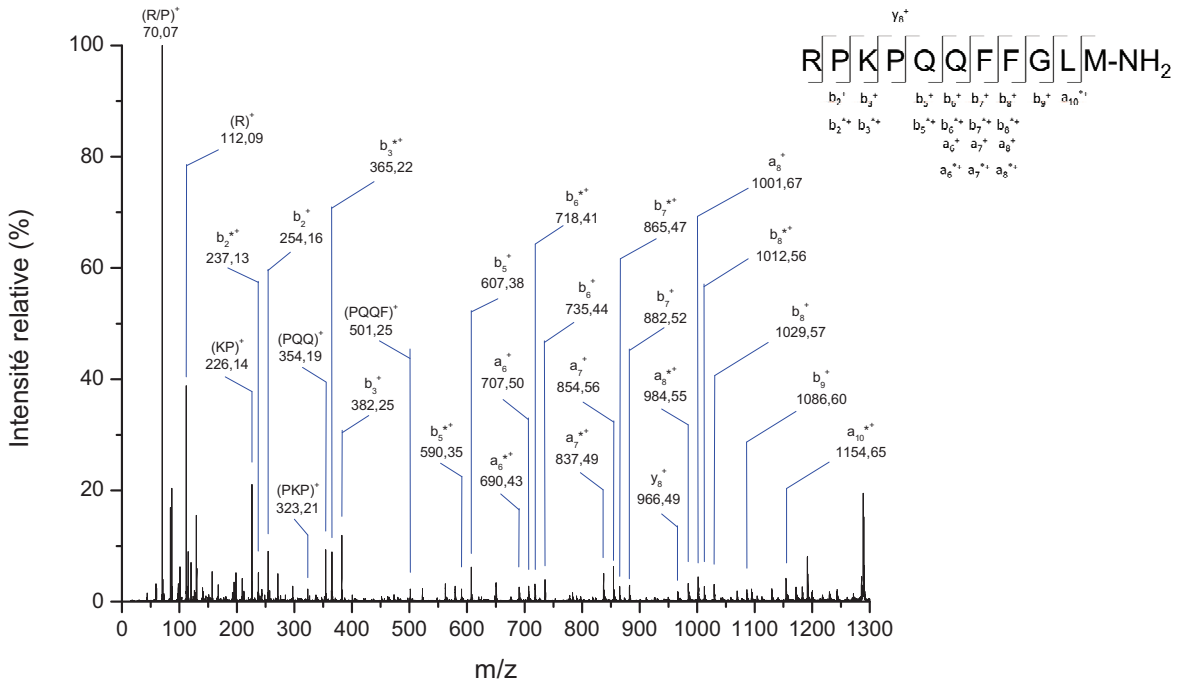


Figure 17 : Analyse MS^2 de la substance P native par MALDI-TOF-TOF. Spectre MS^2 de l'ion à m/z 1347,73 ainsi que la représentation de la séquence avec les fragments identifiés.

3.2.2 Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR

L'analyse a ensuite été réalisée en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR avec les mêmes paramètres chromatographiques que ceux utilisés pour l'analyse de l'angiotensine I.

La substance P est présente sur le spectre MS sous sa forme dichargée au rapport m/z 674,371 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,7 ppm). L'ion qui domine le spectre de masse est à m/z 600,339 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 1,4 ppm). Il correspond à l'ion b_{10}^{2+} (figure 18). Même si l'ionisation par nanoESI est considérée comme une technique d'ionisation douce, la forme oxydée de la substance P s'hydrolyse pendant l'ionisation libérant ainsi l'acide aminé méthionine [31].

Les analyses des spectres MS^2 ne permettent pas d'établir la séquence complète que ce soit pour la forme native comme pour la forme oxydée de la SP. Même si quelques ions a et b sont présents, les informations concernant les localisations des modifications engendrées dans la

suite du travail pourront être identifiées uniquement à partir des ions fragments internes tels que PKP^+ ou $PKPQQ^+$.

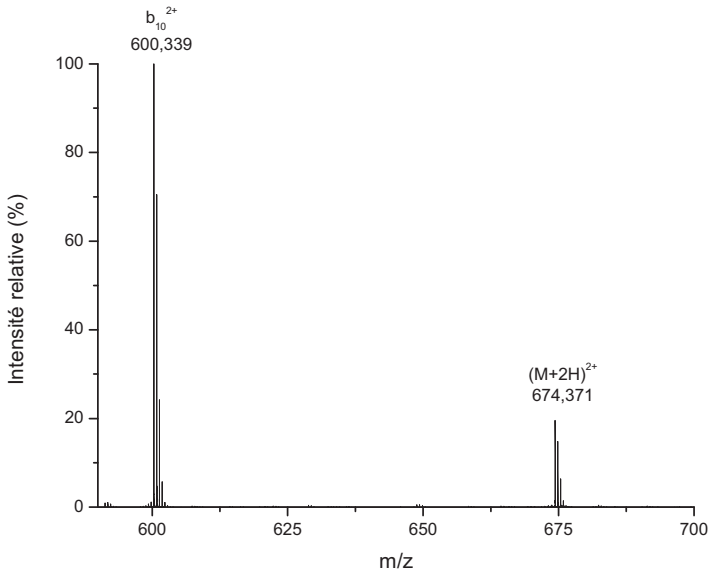


Figure 18 : Spectre MS nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de 500 fmol de substance P.

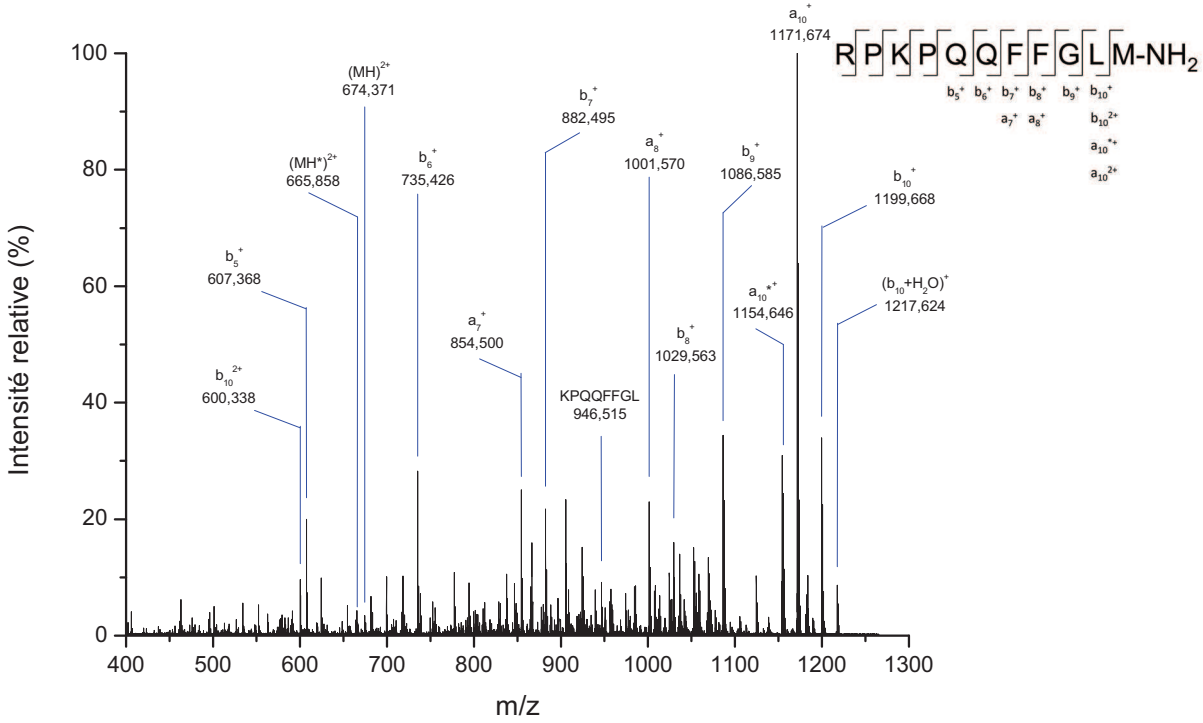


Figure 19 : Analyse MS^2 de la substance P native par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR.
Spectre MS^2 de l'ion à m/z 674,371 ainsi que la représentation de la séquence avec les fragments identifiés.

3.3 L'α-lactalbumine

L'α-lactalbumine (α-LA) est une petite glycoprotéine globulaire, acide (pI 4-5) synthétisée au niveau de la glande mammaire. Elle possède un site spécifique à la fixation du calcium (II) entre les acides aminés 79 et 88 lui assurant une grande stabilité de structure (figure 20). L'α-LA est par ailleurs l'un des deux composants principal à la fabrication de l'enzyme appelée lactose synthase qui catalyse l'étape finale de la biosynthèse du lactose au niveau de la glande mammaire ; l'autre composant à cette biosynthèse étant le galactosyltransférase. Il a été montré récemment que la complexation de l'α-LA avec l'acide oléique engendrait une activité cytotoxique contre les tumeurs entrainant l'apoptose des cellules cancéreuses [32].

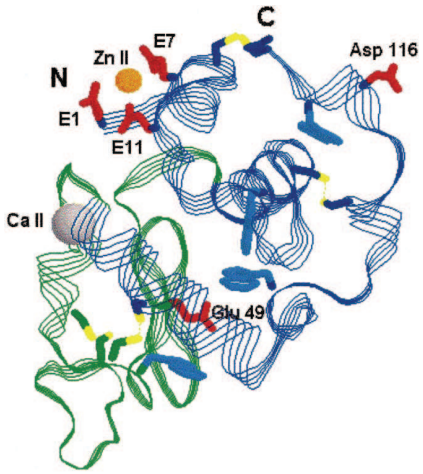


Figure 20 : Structure de l'α-lactalbumine. Figure issue de la publication de Permyakov et al [33]. Les ponts disulfures sont représentés en jaune.

L'α-LA bovine est constituée de 142 acides aminés dont les dix-neuf premiers correspondent au prépeptide (figure 21) [33, 34]. Ce prépeptide n'étant pas présent dans la protéine commerciale, nous considérerons, dans la suite de cette étude, la protéine à partir de l'acide aminé 20. Enfin, l'α-LA possède 8 cystéines entrainant la formation de quatre ponts disulfures entre les cystéines 25-139, 80-96, 92-110 et 37-130. Elle ne possède donc aucune cystéine libre. Cette protéine a été choisie comme modèle car elle peut être obtenue commercialement pure, c'est à dire sans modifications post-traductionnelles telles que les glycosylations. De plus, elle ne possède pas d'isoforme. Par ailleurs, il s'agit d'une protéine de faible poids moléculaire (14 kDa) ce qui favorisera l'analyse par spectrométrie de masse.

MMSFVSLLLV[10] GILFHATQAE[20] QLTKCEVFRE[30] LKDLKGYGGV[40] SLPEWVCTTF[50]
HTSGYDTQAI[60] VQNNDSTEYG[70] LFQINNKIWC[80] KDDQNPHSSN[90] ICNISCDKFL[100]
DDDLTDDIMC[110] VKKILDKVGI[120] NYWLAHKALC[130] SEKLDQWLCE[140] KL

Figure 21 : Séquence de 142 acides aminés de l'α-lactalbumine bovine

3.3.1 Analyse MALDI-TOF-TOF

L'analyse en protéine entière de l'α-LA a été réalisée en utilisant le mode linéaire positif du MALDI-TOF-TOF. La protéine est d'abord mélangée à la matrice (rapport 1 : 1) puis une gouttelette de 0,5 µL du mélange est déposée sur la cible MALDI. La technique de mélange en amont a permis d'obtenir une cristallisation plus homogène que lors d'un mélange matrice/échantillon directement effectué sur plaque. Or l'étape de cristallisation est primordiale à l'analyse MALDI-TOF-TOF afin d'obtenir un maximum de sensibilité. Néanmoins, l'analyse en mode linéaire est une technique peu résolutive et peu précise ne permettant d'obtenir qu'un large massif avec une résolution de 180 (figure 22). La détermination de la masse moléculaire est dans ce cas très approximative. Aussi, il est évident que l'identification des modifications induites par des radicaux de faibles masses, par des aldéhydes et enfin par la phase gazeuse de la fumée de cigarette n'est pas possible dans de telles conditions expérimentales.

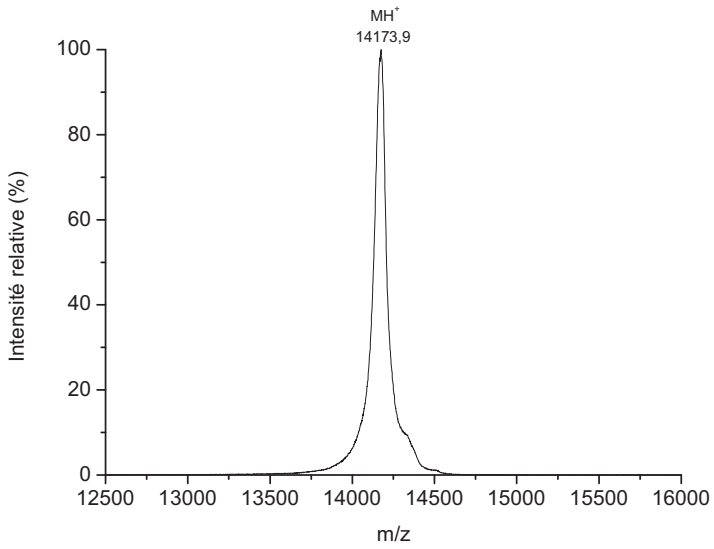


Figure 22 : Spectre MS de l'α-lactalbumine native.
Analyse MALDI-TOF-TOF en mode linéaire positif. Analyse de 1 pmol, matrice HCCA

L'analyse du digest protéique s'avère être une technique plus adéquate pour ce type de spectromètre de masse. Après avoir été dénaturée par du TFE, la protéine est réduite par du DTT, entrainant la rupture des quatre ponts disulfures, puis afin d'empêcher leur reformation, elle est alkylée avec de l'iodoacétamide. Elle est enfin digérée à la trypsine, enzyme qui coupe spécifiquement après les acides aminés lysines et arginines. Après calibration du spectre de masse par importation d'un fichier de calibration, la liste des pics monoisotopiques a été générée pour réaliser les interrogations des banques de données via MASCOT. Afin de favoriser l'identification des modifications engendrées par la suite, une banque de données spécifique à l'α-LA a été créée. Les résultats MASCOT obtenus présentent le nombre de peptides identifiés, les masses expérimentales des peptides, les masses théoriques, l'écart entre les valeurs expérimentales et théoriques, la séquence du peptide ainsi que les modifications post-traductionnelles. Dans le cas de la protéine native, plusieurs digestions ont été effectuées afin de comparer les résultats. Les recouvrements de séquence obtenus sont de 100 %. Cependant il s'avère que lors de certaines analyses par spectrométrie de masse, le recouvrement ne soit que de 65 %. Cela correspond à l'absence du peptide (36-77) à m/z 4711,17 sur le spectre de masse. Ce peptide à une masse élevée ce qui ne favorise pas son ionisation.

Les modifications post-traductionnelles entrées dans la banque de données montrent la présence de sites naturellement oxydés tel que la méthionine 109 (tableau 2). Par ailleurs la rupture des quatre ponts disulfures lors de la réduction au DTT est vérifiée par la présence des cystéines 25, 37, 80, 92, 96, 110, 130 et 139 carbamidométhylées.

E[20] QLTKCEVFRE[30] LKDLKGYGGV[40] SLPEWVCTTF[50] HTSGYDTQAI[60]
VQNNDSTEYG[70] LFQINNKIWC[80] KDDQNPHSSN[90] ICNISCDKFL[100]
DDDLTDDIMC[110] VKKILDKVGI[120] NYWLAHKALC[130] SEKLDQWLCE[140] KL

Figure 23 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse du digest de l'α-LA par MALDI-TOF-TOF. Les acides aminés en rouge correspondent aux peptides toujours identifiés, les acides aminés en violet correspondent au peptide 36-77.

peptide	(m/z)exp	mexp (Da)	mth (Da)	miss cleavage	Séquence	Modifications
20 – 29	1309,484	1308,477	1308,650	1	-.EQLTKCEVFR.E	Carbamidomethyl (C)
20 - 42	1679,640	1678,633	1678,871	1	-.EQLTKCEVFRELK.D	Carbamidomethyl (C)
25- 29	710,220	709,212	709,322	0	K.CEVFR.E	Carbamidomethyl (C)
25 - 32	1023,358	1022,351	1022,522	1	K.CEVFRELK.D	
25 - 32	1080,406	1079,398	1079,543	1	K.CEVFRELK.D	Carbamidomethyl (C)
25 - 35	1436,565	1435,558	1435,749	2	K.CEVFRELKDLK.G	Carbamidomethyl (C)
30- 35	745,335	744,327	744,438	1	R.ELKDLK.G	
36- 77	4711,191	4710,184	4711,168	0	K.GYGGVSLPEWVCTTFHTSGYDTQAIVQNNDSTEYGLFQINNK.I	Carbamidomethyl (C);
36- 77	4727,851	4726,844	4726,156	0	K.GYGGVSLPEWVCTTFHTSGYDTQAIVQNNDSTEYGLFQINNK.I	Carbamidomethyl (C); Oxydation (HW)
78- 98	2492,753	2491,746	2492,052	1	K.IWCKDDQNPHSSNICNISCDK.F	Carbamidomethyl (C); Oxydation (HW)
78- 98	2533,796	2532,788	2533,078	1	K.IWCKDDQNPHSSNICNISCDK.F	2 Carbamidomethyl (C)
78- 98	2590,815	2589,808	2590,100	1	K.IWCKDDQNPHSSNICNISCDK.F	3 Carbamidomethyl (C)
78- 112	4214,479	4213,472	4213,816	2	K.IWCKDDQNPHSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVK.K	3 Carbamidomethyl (C)
78- 112	4271,461	4270,454	4270,837	2	K.IWCKDDQNPHSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVK.K	4 Carbamidomethyl (C)
78- 113	4229,576	4228,568	4227,868	3	K.IWCKDDQNPHSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKK.I	3 Carbamidomethyl (C)
78- 113	4245,522	4244,515	4243,863	3	K.IWCKDDQNPHSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKK.I	Carbamidomethyl (C); Oxydation (M)
78- 113	4286,507	4285,500	4284,889	3	K.IWCKDDQNPHSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKK.I	2 Carbamidomethyl (C)
78- 113	4302,611	4301,604	4300,884	3	K.IWCKDDQNPHSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKK.I	2 Carbamidomethyl (C); Oxydation (M)
78- 113	4343,587	4342,580	4341,911	3	K.IWCKDDQNPHSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKK.I	3 Carbamidomethyl (C)
78- 113	4375,433	4374,425	4373,901	3	K.IWCKDDQNPHSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKK.I	3 Carbamidomethyl (C); Oxydation (HW); Oxydation (M)
78- 113	4400,578	4399,571	4398,932	3	K.IWCKDDQNPHSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKK.I	4 Carbamidomethyl (C)
78- 113	4415,515	4414,507	4414,927	3	K.IWCKDDQNPHSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKK.I	4 Carbamidomethyl (C); Oxydation (M)
82- 98	1946,580	1945,573	1945,789	0	K.DDQNPHSSNICNISCDK.F	Carbamidomethyl (C)
82- 98	2003,575	2002,568	2002,811	0	K.DDQNPHSSNICNISCDK.F	2 Carbamidomethyl (C)
82- 112	3684,179	3683,172	3683,548	1	K.DDQNPHSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVK.K	3 Carbamidomethyl (C)
82 - 113	3812,309	3811,301	3811,643	2	K.DDQNPHSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKK.I	3 Carbamidomethyl (C)
99 - 112	1642,552	1641,544	1641,727	0	K.FLDDDLTDDIMCVK.K	
99 - 112	1699,540	1698,533	1698,748	0	K.FLDDDLTDDIMCVK.K	Carbamidomethyl (C)
99 - 113	1827,617	1826,609	1826,843	1	K.FLDDDLTDDIMCVKK.I	Carbamidomethyl (C)
113 - 127	1797,807	1796,800	1797,030	2	K.KILDKVGINYWLAHK.A	2 Oxydations (HW)
113 - 133	2461,744	2460,736	2460,320	3	K.KILDKVGINYWLAHKALCSEK.L	
114 - 133	1669,727	1668,719	1668,935	1	K.ILDKVGINYWLAHK.A	
114 - 133	1685,725	1684,718	1684,930	1	K.ILDKVGINYWLAHK.A	Oxydation (HW)
118 - 127	1200,494	1199,487	1199,645	0	K.VGINYWLAHK.A	
118 - 127	1216,484	1215,477	1215,640	0	K.VGINYWLAHK.A	Oxydation (HW)
118 - 127	1232,466	1231,459	1231,635	0	K.VGINYWLAHK.A	2 Oxydation (HW)
118- 142	3090,939	3089,931	3089,547	3	K.VGINYWLAHKALCSEKLDQWLCEKL.-	2 Carbamidomethyl (C); Oxydation (HW)
128- 133	707,223	706,216	706,332	0	K.ALCSEK.L	Carbamidomethyl (C)
128 - 141	1722,602	1721,594	1721,812	1	K.ALCSEKLDQWLCEK.L	Carbamidomethyl (C)
128 - 141	1779,613	1778,606	1778,833	1	K.ALCSEKLDQWLCEK.L	2 Carbamidomethyl (C)
128 - 142	1794,626	1793,619	1793,869	2	K.ALCSEKLDQWLCEKL.	Oxydation (HW)
128 - 142	1835,673	1834,666	1834,896	2	K.ALCSEKLDQWLCEKL.	Carbamidomethyl (C)
128 - 142	1851,671	1850,664	1850,891	2	K.ALCSEKLDQWLCEKL.	Carbamidomethyl (C); Oxydation (HW)
128 - 142	1892,690	1891,683	1891,917	2	K.ALCSEKLDQWLCEKL.	2 Carbamidomethyl (C)
128 - 142	1908,677	1907,670	1907,912	2	K.ALCSEKLDQWLCEKL.	2 Carbamidomethyl (C); Oxydation (HW)
134 – 141	1034,357	1033,350	1033,490	0	K.LDQWLCEK.L	
134 – 141	1091,371	1090,363	1090,512	0	K.LDQWLCEK.L	Carbamidomethyl (C)
134 – 141	1107,377	1106,369	1106,507	0	K.LDQWLCEK.L	Carbamidomethyl (C); Oxydation (HW)
134 – 142	1147,421	1146,414	1146,574	1	K.LDQWLCEKL.-	
134 – 142	1163,437	1162,429	1162,569	1	K.LDQWLCEKL.-	Oxydation (HW)
134 – 142	1204,442	1203,435	1203,596	1	K.LDQWLCEKL.-	Carbamidomethyl (C)

Tableau 2 : Peptides identifiés lors de l'interrogation des banques de données du digest d'α-LA

3.3.2 Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR

a. Analyse en protéine entière

L'analyse de la protéine α-LA a été réalisée en couplage nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. La séparation nano-chromatographique a été réalisée sur une nanocolonne en phase inverse de type C18 possédant des pores de 300 Å. L'analyse de 500 fmol montre un pic unique sur le chromatogramme à un temps de rétention de 50 min et avec une largeur de pic à mi-hauteur de 0,5 min. L'analyse indique la présence de sept massifs multichargés majoritaires aux m/z 1091,527 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,4 ppm), 1182,404 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,1 ppm), 1289,805 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,4 ppm), 1418,684 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,1 ppm), 1576,202 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 1,1 ppm), 1773,101 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 1,2 ppm) et 2026,256 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 2,0 ppm) (figure 24). La résolution de l'analyseur FT-ICR permet de déterminer directement la charge de l'ion en fonction de l'écart entre deux pics du massif isotopique. Ici, il s'agit des ions ayant des charges comprises entre 7 et 13.

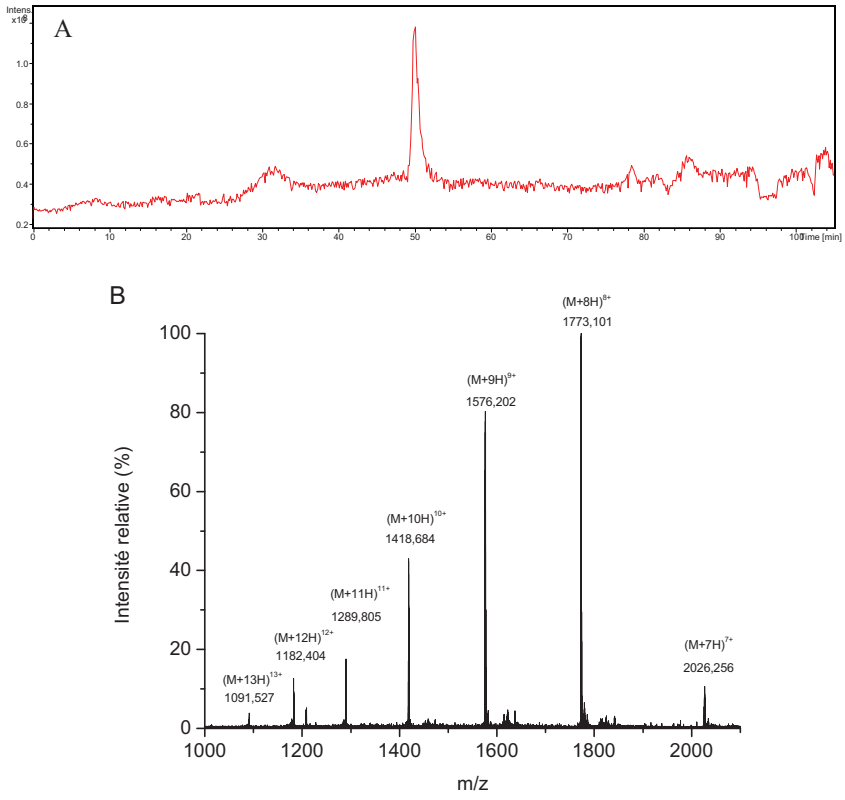


Figure 24 : Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de 500 fmol d'α-lactalbumine native
A : Chromatogramme ; B : Spectre de masse nanoESI-Qh-FT-ICR multichargé.

La déconvolution du spectre multichargé a été réalisée via le logiciel MaxEnt (Maximum Entropy). Elle a permis de déterminer la masse exacte de la protéine à 14177 Da (figure 25 A). Or l'α-LA a une masse théorique 14185 Da correspondant à la formule brute $C_{626}H_{966}N_{162}O_{196}S_9$. Cette différence de masse de 8 Da correspond à la perte de huit hydrogènes. Cela est dû à la formation de quatre ponts disulfures caractéristique de la structure de l' α-LA.

La simulation informatique du spectre de la protéine à partir de sa formule brute reconsidérée c'est-à-dire $C_{626}H_{958}N_{162}O_{196}S_9$ est présentée figure 25 B. Le massif isotopique obtenu sur le spectre théorique simulé concorde avec le spectre expérimental déconvolué. Ce résultat nous permet de conclure que la protéine commerciale possède quatre ponts disulfures et a une masse de 14177 Da.

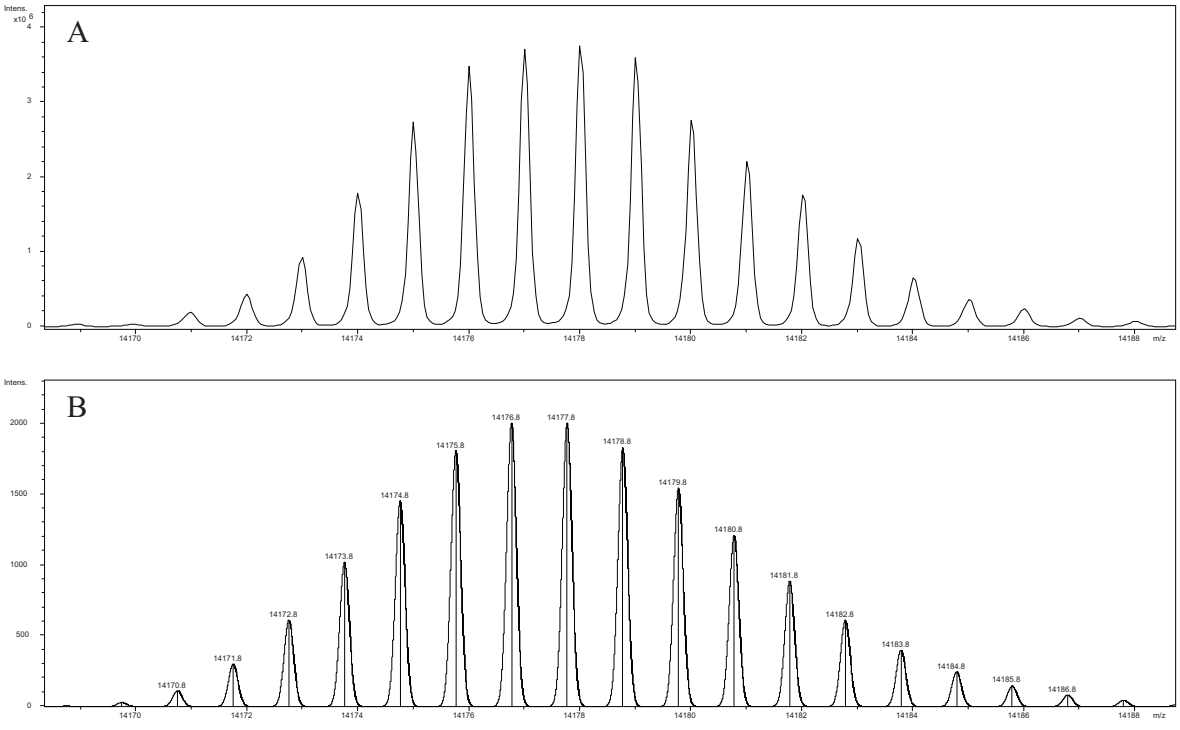


Figure 25 : Comparaison des massifs isotopiques de l'a-lactalbumine entre la simulation informatique et le spectre expérimental. A : Spectre de déconvolution nanoESI-Qh-FT-ICR MS de l'α-LA à 500 fmol/µL, 1 µL injecté. B : Profil isotopique théorique de l'α-LA tracé à partir de sa formule brute ($C_{626}H_{958}N_{162}O_{196}S_9$).

b. Analyse du digest protéique

La séparation du mélange peptidique a été réalisée sur la colonne C18 possédant des pores de 100 Å, avec un gradient de 3h. Dans un premier temps, un gradient du tampon organique possédant une pente de 0,75 %/min entre la 10ème et la 130ème minute a été utilisé (figure 26 A). Il s'est avéré que lors de l'utilisation de ce gradient, la majorité des peptides de l'α-LA était éluée entre la 30ème et la 40ème minute avec un non retour à la ligne de base entre certains pics (figure 26 C). Par conséquent, un allongement du gradient s'est révélé être indispensable à l'analyse du digest de cette protéine, aussi un deuxième gradient avec une pente de 0,16 %/min a été utilisé (figure 26 B). Dans ce cas, une séparation optimale des peptides est observée (figure 26 D). Les interrogations du spectre MS du digest de la protéine native dans les banques de données conduisent toujours à un recouvrement de séquence de 65% correspondant à l'absence du peptide 36-77. Malgré un élargissement de la gamme de masse à 400-2500, ce peptide n'a pas été identifié. La recherche de ce peptide par appel d'ion n'a pas permis son identification. Cependant, l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR permet d'identifier quatre oxydations localisées sur la méthionine 109, les tryptophanes 79 et 123 ainsi que sur l'histidine 126 (tableau 3).

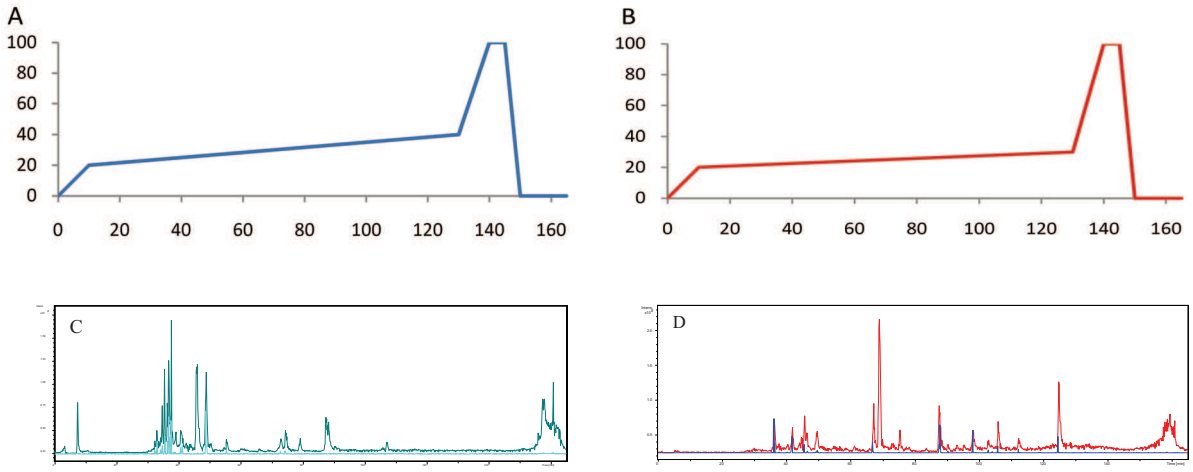


Figure 26 : Chromatogrammes du digest d'α-LA. A : gradient non optimisé ; B : gradient optimisé ; C Chromatogramme du digest de l'α-LA associé au gradient non-optimisé, D : Chromatogramme du digest de l'α-LA associé au gradient optimisé.

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Miss cleavage	Score	Peptide	Modifications
355,668	709,322	709,322	0,3	0	24	^{25}CEVFR^{29}	carbamidométhyl (C)
360,855	1079,544	1079,543	0,2	1	14	^{25}CEVFRELK^{32}	carbamidométhyl (C)
540,779	1079,544	1079,543	0,4	1	27	^{25}CEVFRELK^{32}	carbamidométhyl (C)
546,263	1090,511	1090,512	-0,6	0	42	^{134}LDQWLCEK^{141}	carbamidométhyl (C)
400,888	1199,643	1199,645	-1,8	0	40	^{118}VGINYWLAHK^{127}	
600,830	1199,646	1199,645	0,3	0	46	^{118}VGINYWLAHK^{127}	
602,806	1203,597	1203,596	0,8	1	27	^{134}LDQWLCEKL^{142}	carbamidométhyl (C)
602,806	1203,598	1203,596	1,7	1	43	^{134}LDQWLCEKL^{142}	carbamidométhyl (C)
411,553	1231,637	1231,635	-1,4	0		^{118}VGINYWLAHK^{127}	2 oxydations (HW)
437,224	1308,650	1308,650	-0,1	1	37	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	carbamidométhyl (C)
479,590	1435,749	1435,749	0,0	2	9	^{25}CEVFRELKDLK^{35}	carbamidométhyl (C)
557,318	1668,933	1668,935	-1,5	1	35	^{114}ILDKVGINYWLAHK^{127}	
418,241	1668,933	1668,935	-1,2	1	61	^{114}ILDKVGINYWLAHK^{127}	
850,384	1698,754	1698,748	3,3	0	1	^{99}FLDDDLTDDIMCVK^{112}	carbamidométhyl (C)
572,590	1714,749	1714,743	-3,4	0		^{99}FLDDDLTDDIMCVK^{112}	carbamidométhyl (C), oxydation (M)
593,950	1778,829	1778,833	-2,3	1	37	^{128}ALCSEKLDQWLCEK^{141}	2 carbamidométhyl (C)
450,264	1797,027	1797,030	-1,5	2	3	^{113}KILDKVGINYWLAHK^{127}	2 oxydations (HW)
600,018	1797,032	1797,030	-0,8	2		^{113}KILDKVGINYWLAHK^{127}	2 oxydations (HW)
631,646	1891,915	1891,917	-1,0	2	50	^{128}ALCSEKLDQWLCEKL^{142}	2 carbamidométhyl (C)
668,610	2002,808	2002,811	-1,4	0	71	^{82}DDQNPHSSNICNISCDK^{98}	2 carbamidométhyl (C)
624,020	2492,050	2492,052	0,8	1		^{78}IWCKDDQNPHSSNICNISCDK^{98}	carbamidométhyl (C), oxydation (W)
648,530	2590,089	2590,100	-4,2	1	71	^{78}IWCKDDQNPHSSNICNISCDK^{98}	3 carbamidométhyl (C)
864,372	2590,094	2590,100	-2,3	1	64	^{78}IWCKDDQNPHSSNICNISCDK^{98}	3 carbamidométhyl (C)

Tableau 3 : Résultats MASCOT pour l'analyse du digest d'α-LA native par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR.

E^{20} QLTKCEVFRE^{30} LKDLKGYGGV^{40} SLPEWVCTTF^{50} HTSGYDTQAI^{60}
VQNNDSTEYG^{70} LFQINNKIWC^{80} KDDQNPHSSN^{90} ICNISCDKFL^{100}
DDDLTDDIMC^{110} VKKILDKVGI^{120} NYWLAHKALC^{130} SEKLDQWLCE^{140} KL

Figure 27 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse du digest de l'α-LA native par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR.

En conclusion

Nous avons réalisé les analyses de trois standards peptidiques et protéiques natifs par spectrométrie de masse haute résolution. Celles-ci ont été réalisées systématiquement sur les deux spectromètres de masse afin d'assurer leur identification avec le maximum de précision. Cela nous a permis d'obtenir des informations complémentaires notamment sur la fragmentation des peptides standards angiotensine I et substance P.

CHAPITRE II : DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE POUR L'ANALYSE DE MODIFICATIONS

1. INTRODUCTION

La fumée de cigarette est une matrice chimique complexe. Son analyse complète est loin d'être achevée puisque si 4700 substances ont pu être identifiées, le nombre de produits inconnus est estimé à 100 000 [35]. Tous ces composés sont séparés en deux phases : la phase particulaire et la phase gazeuse (Chapitre III, §1).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la réactivité des composés de la phase gazeuse de la fumée de cigarette et plus particulièrement aux espèces réactives de l'oxygène (ROS), aux espèces réactives de l'azote (RNS) et aux espèces réactives carbonylées (RCS) qui la composent. Cependant étudier directement l'impact de la fumée de cigarette sur des protéines s'avère complexe car tous ces composés sont susceptibles de réagir sur les différents résidus protéiques. Aussi nous avons décidé de développer des réactions modèles. Le choix s'est porté sur deux espèces radicalaires : le radical hydroxyle ($HO^{\bullet}$) et le radical nitroxyl ($NO_2^{\bullet}$), puis sur six aldéhydes : le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'acroléine, le crotonaldéhyde, le malonaldéhyde et enfin le glyoxal.

L'objectif de ces réactions modèles est d'identifier et de localiser par spectrométrie de masse haute résolution les modifications induites par chaque composé sur des protéines. Les réactions chimiques ont été développées sur les trois standards peptidiques et protéiques présentées dans le chapitre I § 3.

2. MODIFICATIONS INDUITES PAR DES RADICAUX LIBRES

2.1 Généralités

2.1.1 Définition

Un radical libre est un atome ou une molécule possédant au moins un électron non apparié occupant une orbitale externe. Un radical libre est noté $R^{\bullet}$. Du fait de la présence de cet électron libre, un radical est très réactif et peut donc réagir avec différentes molécules organiques. Il peut se comporter comme oxydant ou comme réducteur [36].

- Addition d'un élément : $R^{\bullet} + Y \rightarrow [R\text{-}Y^{\bullet}]$
- Mécanismes de transfert d'électron :
  - Perte d'un électron : $R^{\bullet} + Y \rightarrow R^{+} + Y^{\bullet -}$
  - Gain d'un électron : $R^{\bullet} + Y \rightarrow R^{-} + Y^{\bullet +}$

Plus généralement, la réactivité des radicaux libres et donc leurs stabilités sont très variables et sont influencées par leur taille, leurs caractéristiques de solubilité et leurs possibilités de délocalisation de l'électron.

2.1.2 Production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote *in vivo*

Dans des conditions physiologiques normales, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) sont produites en permanence et en faible quantité au sein d'une cellule comme médiateurs tissulaires ou résidus des réactions immunitaires (de défense), mais également comme régulateur des fonctions cellulaires telle que l'apoptose. Elles sont généralement produites suite à des facteurs physiques, une inflammation, une infection ou après exposition à des oxydants environnementaux (figure 28). Concernant les facteurs physiques, les rayonnements sont les principales causes de production de radicaux. En effet, lorsque des tissus sont exposés à des rayonnements, une partie de l'énergie est absorbée par l'eau des cellules [37]. Les radiations induisent la radiolyse des molécules d'eau entrainant la formation des radicaux

$HO^{\bullet}$. En cas d'infection, il y a activation des cellules inflammatoires induisant la synthèse des enzymes NADPH oxydase et xanthine oxydase. Ces enzymes conduisent à la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et de l'oxyde nitrique ($NO^{\bullet}$). Ce mélange de radicaux détruit par oxydation l'ensemble des composants bactériens.

Les radicaux libres présentent alors un grand paradoxe puisqu'ils sont ambivalents, c'est-à-dire à la fois des espèces extrêmement dangereuses susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies tout en étant des espèces indispensables aux fonctionnements cellulaires. Dans des conditions physiologiques normales, la balance radicaux libres/systèmes de défense est en équilibre mais en cas de dysfonctionnement des mécanismes de défense ou de surproduction de radicaux, il y a une accumulation des radicaux libres conduisant à un état cellulaire appelé « stress oxydant ».

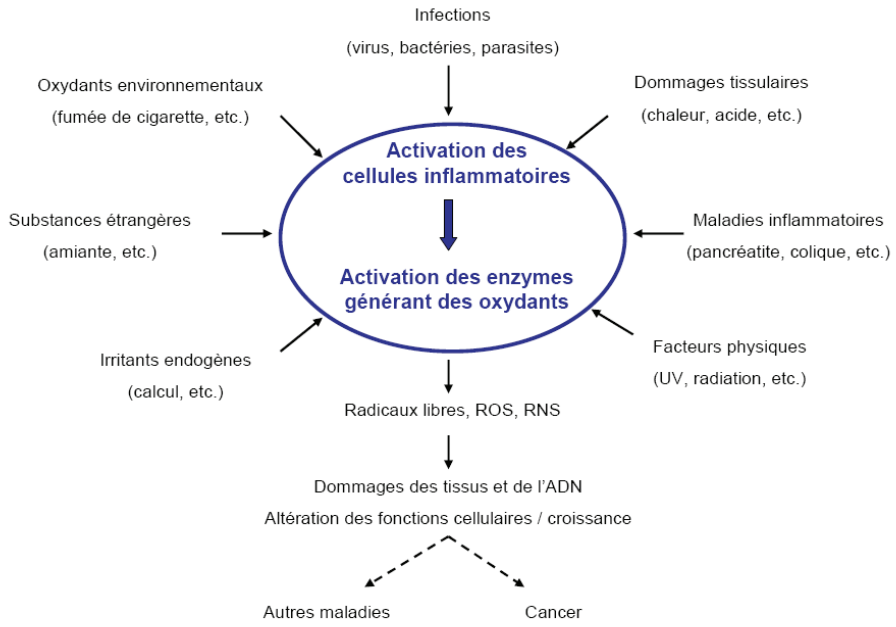


Figure 28 : L'inflammation chronique causée par des agents biologiques, chimiques et physiques est associée à l'augmentation des risques de cancers et autres maladies. Figure issue de l'article de Ohshima *et al* et traduite [38].

2.1.3 Dommages cellulaires causés par les radicaux libres

Généralement, les radicaux libres sont neutralisés par des systèmes de protection. Cependant si leur quantité devient trop importante ou s'il y a une défaillance dans le système de protection, les radicaux libres peuvent devenir toxiques pour l'organisme. Aussi, un stress oxydant important peut gravement endommager les cellules conduisant à un état apoptotique. Les mécanismes d'altération des cellules sont variés et incluent l'altération de l'ADN, des dérégulations du métabolisme énergétique, des modifications des protéines, des glucides et des lipides [39, 40].

L'altération de l'ADN se traduit principalement par l'oxydation des bases, la cassure des brins et des réticulations ADN-protéine [41]. Cependant les processus de réparation de l'ADN tels que la réparation par excision de base ou la réparation de recombinaison homologue permet souvent de protéger la cellule. En revanche, si les modifications sont trop importantes, cela peut affecter la réplication de l'ADN ou la régulation de certains gènes conduisant soit à l'apoptose de la cellule soit à la formation de cellules cancéreuses.

La deuxième cause de dommage cellulaire est la modification des lipides. En effet, les membranes cellulaires sont constituées d'une double couche de phospholipides composés d'une tête hydrophile (groupement phosphate) et de deux queues hydrophobes (acides gras saturés et polyinsaturés). En raison de leur structure, les acides gras poly insaturés sont susceptibles de subir une attaque oxydative appelée peroxydation lipidique. La lipoperoxydation est un enchaînement de réactions radicalaires conduisant à la formation de produits de dégradation tels que les aldéhydes [42, 43]. Ainsi les dommages causés par la peroxydation lipidique entrainent une désorganisation de l'architecture membranaire conduisant à des pertes de fonctionnalité des protéines membranaires mais aussi des modifications des protéines suite aux réactions avec les produits de dégradation des lipides.

Enfin les radicaux libres peuvent réagir directement sur les protéines, par abstraction d'un atome d'hydrogène sur les sites alcool des tyrosines, thiol des cystéines et méthionines et amines des lysines, histidines, tryptophanes, arginines et N-terminal, par des réactions de réticulations inter- et intra-protéines, des scissions de chaines latérales [44]. Mais ils peuvent aussi réagir indirectement avec les produits de dégradation de peroxydation. En raison de leur structure chimique, les protéines sont les cibles privilégiées de l'attaque des ROS et RNS. Les recherches

menées par Davies et al [45] ont montré que les protéines piégeaient entre 50 et 75% des espèces réactives comme le radical $HO^{\bullet}$. L'exposition des protéines aux ROS et RNS altère tous les niveaux de la structure d'une protéine résultant en des changements physiques majeurs comme l'augmentation de l'hydrophobicité de surface des protéines [46] ou biologique avec l'inhibition des activités des protéines. La plupart des modifications post-traductionnelles est non-réparable ce qui contribue aux dommages secondaires d'autres biomolécules comme par exemple l'inactivation des enzymes réparatrices de l'ADN conduisant à une large gamme de pathologies.

2.1.4 Radicaux libres et pathologies

Quand la production d'espèces réactives devient trop importante, les protéines, les lipides, l'ADN et autres macromolécules deviennent les cibles de modifications oxydatives. L'accumulation des formes altérées résulte en une diminution ou une perte des fonctions cellulaires et tissulaires voire la mort de la cellule. Le stress oxydant a été mis en évidence dans différentes pathologies comme les cancers, les maladies pulmonaires, neurodégénératives et dans le vieillissement [47]. Un exemple frappant est le lien entre les maladies neurodégénératives et des espèces réactives [48, 49].

Les maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson sont caractérisées par une perte progressive de populations neuronales cellulaires spécifiques et sont associées à l'agrégation de protéines. Une caractéristique commune à ces maladies est une considérable implication du stress oxydant qui peut être responsable du dysfonctionnement ou de la mort de cellules neuronales. En effet l'oxydation et la nitration des protéines, de l'ADN et des lipides sont des marqueurs de la neurodégénération dans des tissus *post mortem* [49, 50]. Cependant, il est impossible de déterminer s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de la dégénérescence neuronale [48].

Nous avons vu que les dommages induits par les ROS et RNS au niveau des membranes cellulaires impliquent la formation des produits de peroxydation lipidique et notamment du malonaldéhyde (MDA), de l'acroléine (ACR) et du 4-hydroxynonenal (HNE). Ces aldéhydes peuvent être mesurés dans le plasma comme marqueur de stress oxydant. Les activités chimiques de ces aldéhydes incluent des réticulations entre l'ADN et les protéines mais aussi des modifications des acides aminés constituants les protéines par réaction de base de Schiff ou de

Michael [51]. La présence de ces produits de peroxydation a été mise en évidence dans les maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose et dans les complications à long terme du diabète mais aussi dans les maladies pulmonaires chroniques obstructives [43, 52].

2.2 Radical hydroxyle

2.2.1 Réactivité du radical hydroxyle

Le radical hydroxyle est l'espèce la plus réactive parmi les espèces réactives de l'oxygène et est un constituant majeur de la fumée de cigarette. Il réagit rapidement en solution avec les espèces chimiques qui l'entourent notamment les protéines. Il a été montré qu'il pouvait réagir avec la quasi-totalité des acides aminés par oxydation des chaines secondaires [53-57] ou par leurs scissions au niveau des carbones β générant ainsi des radicaux C-centrés [58, 59].

Chimiquement, le radical hydroxyle est généralement obtenu par réaction de Fenton entre le peroxyde d'hydrogène et le Fer(II) suivant la réaction :

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^{-}$$

Dans le cadre de notre étude, le développement de la réaction d'oxydation a été réalisé sur les trois standards présentés dans le chapitre I, à savoir l'angiotensine I, la substance P et l'α-lactalbumine. Ces standards ont été exposés à cinq équivalents de peroxyde d'hydrogène en présence d'un équivalent de Fer (II) pendant 30 minutes. Les analyses ont ensuite été réalisées sur les spectromètres de masse MALDI-TOF-TOF et nanoESI-Qh-FT-ICR couplé à la nanoLC.

2.2.2 Analyse par spectrométrie de masse

a. L'angiotensine I

Le spectre MS de l'angiotensine I exposée au radical hydroxyle obtenu par analyse MALDI-TOF-TOF présente deux adduits aux rapports m/z 1312,68 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -2,0 ppm) et 1328,67 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,2 ppm) correspondant à des différences de masse par rapport au

peptide natif de 16,00 et 31,99 Da respectivement (figure 29). Ainsi, la réaction conduit à deux produits : une mono-oxydation et une di-oxydation. La fragmentation du pic à m/z 1312,68 révèle que trois acides aminés ont été oxydé : la tyrosine et les histidines (figure 30). Concernant la dioxydation, la présence de l'ion b_6^+ doublement oxydé et de l'ion b_5^+ simplement oxydé révèle que les acides aminés tyrosine et histidine ont été modifiés par le radical hydroxyle.

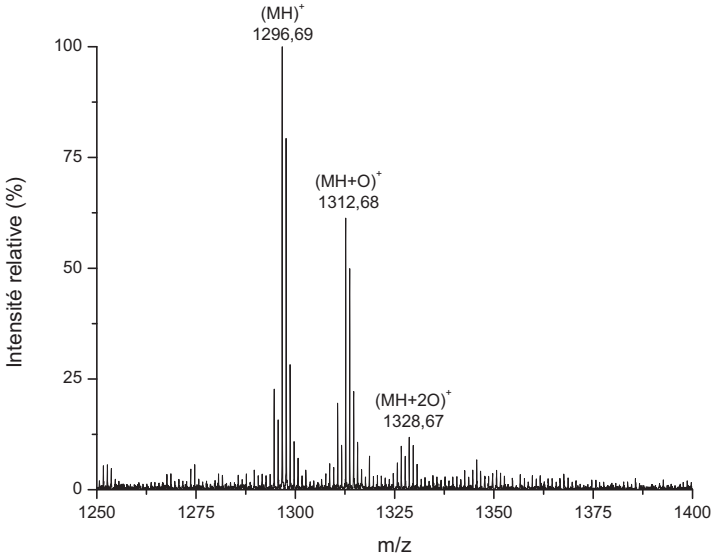


Figure 29 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée au radical HO•. Analyse de 1 pmol.

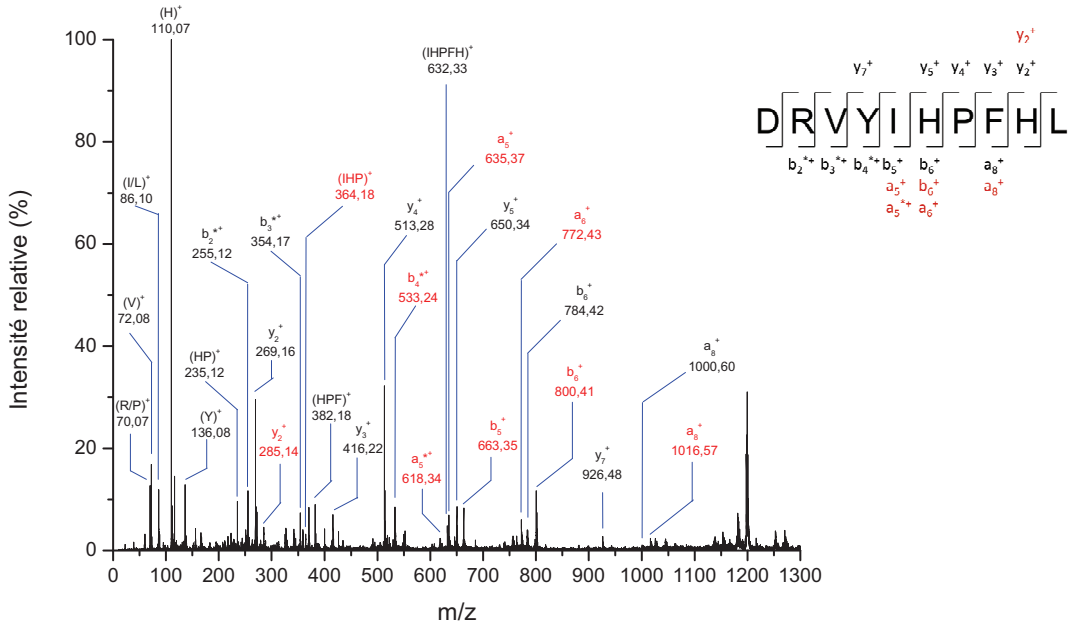


Figure 30 : Spectre MS^2 MALDI-TOF-TOF de l'ion à m/z 1312,68 de l'angiotensine I oxydée ainsi que la représentation de la séquence avec les fragments identifiés.

L'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR confirme la présence des formes mono et di-oxydées de l'angiotensine I grâce aux adduits aux rapports m/z 438,232 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,1 ppm) et 443,566 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 5,9 ppm). Les résultats sont présentés sur le spectre figure 31 et le tableau 4. Concernant la configuration du tableau, la colonne « m_{adduit} » correspond à la différence de masse en dalton entre la masse expérimentale d'un ion modifié et la masse expérimentale du peptide natif. Les rapports $(m/z)_{th}$ ont été calculés à partir de la masse théorique du peptide natif et les masses théoriques des adduits. Enfin la colonne $(\Delta m/m)\times10^6$ en ppm correspond au calcul de l'erreur entre la masse expérimentale de tous les ions et leurs masses théoriques associées.

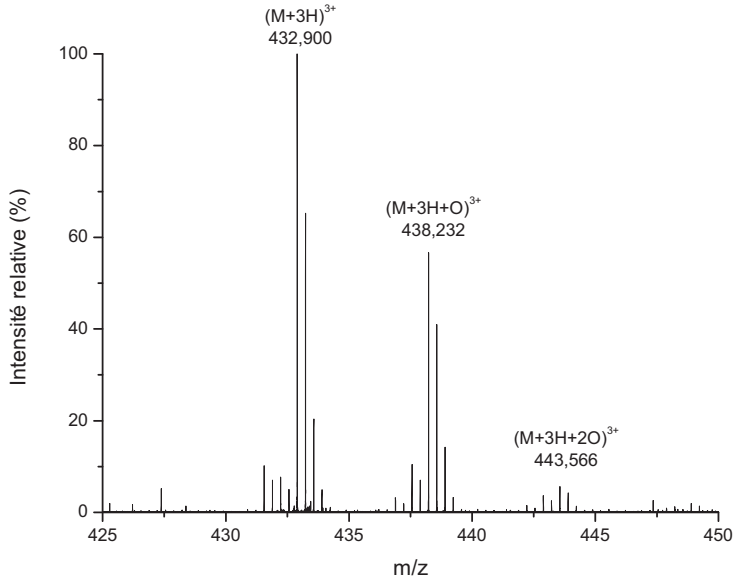


Figure 31 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'angiotensine I oxydée. Injection de 1 pmol.

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
432,900	1295,676	1295,677	0	-1,2	
438,232	1311,673	1311,672	15,997	0,1	O(1)
443,566	1327,675	1327,667	31,999	5,9	O(2)

Tableau 4 : Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de 1 pmol d'angiotensine I oxydée.

b. La substance P

Le spectre MS de la substance P oxydée est plus complexe et beaucoup plus d'adduits sont visibles (figure 32). Les pics aux rapports m/z 1363,73 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 3,3 ppm) et 1379,71 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 10,9 ppm) correspondent respectivement à une mono et di-oxydation du peptide. La fragmentation du pic à m/z 1363,73 présente un pic majoritaire à m/z 1299,72 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 3,0 ppm) correspondant à une différence de masse de 63,99 Da. Celle-ci correspond à la scission de la chaine latérale de la méthionine libérant la molécule $SOHCH_3$. Par ailleurs, tous les ions b sont observés sur le spectre de fragmentation sans modifications. Ce résultat implique que l'oxydation s'est produite sur le résidu méthionine. Pour la di-oxydation, pic à m/z 1379,71, le pic majoritaire est au rapport m/z 1315,73 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -5,5 ppm). Ce pic correspond à la perte de SO_2HCH_3 provenant de la scission de la chaine latérale de la méthionine. Par ailleurs, de nombreux fragments b^+ ainsi que des fragments internes sont identifiés sans modification. Ainsi, nous pouvons conclure que les deux oxydations se sont produites sur le résidu méthionine (*cf* spectres en annexe 3).

Contrairement à l'angiotensine I, la présence sur le spectre MS d'ions ayant des rapports m/z inférieurs au peptide natif montre qu'il y a eu des scissions de chaines secondaires lors de l'oxydation. Ces deux pics sont aux m/z 1315,71 et 1331,71. D'après les spectres de fragmentation, il semble que le pic à m/z 1315,71 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 9,6 ppm) corresponde à l'ion moléculaire dioxydé ayant perdu la molécule SO_2HCH_3.

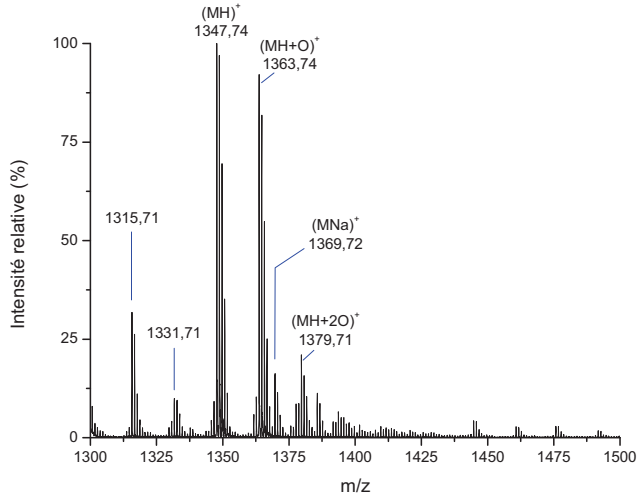


Figure 32 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée au radical $HO^{\bullet}$. Analyse de 1 pmol.

Le spectre obtenu par analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR est présenté sur la figure 33. Les résultats confirment ceux obtenus précédemment puisque nous observons à nouveau les réactions de mono- et di-oxydations. De plus, l'ion dichargé au rapport m/z 658,367 correspond à une perte de 32,009 Da. Enfin, l'ion b_{10}^{2+} est présent sur le spectre sans modifications. Les différences de masse en ppm nous permettent de confirmer les adduits formés (tableau 5).

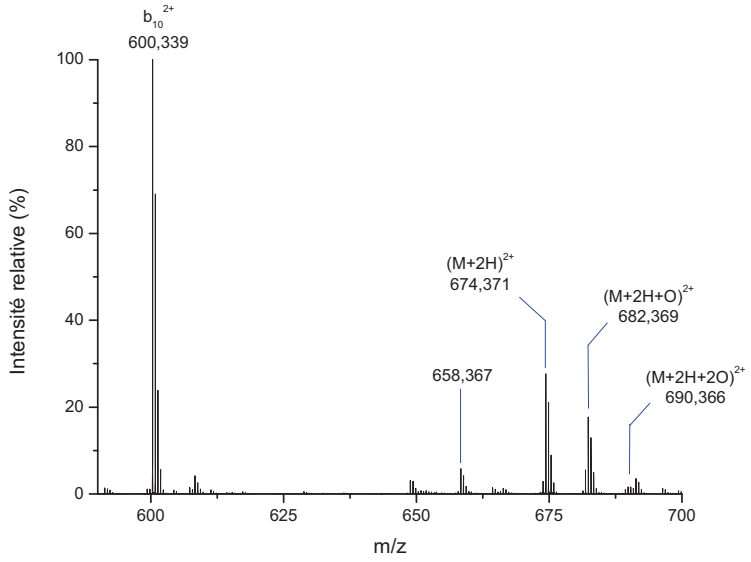


Figure 33 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la SP oxydée. Injection de 1 pmol.

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times 10^6$ (ppm)	Adduit
600,338	1198,661	1198,661	0,001	-0,1	
658,367	1314,718		-32,009		
674,371	1346,727	1346,728	0,000	-0,7	
682,369	1362,722	1362,723	15,995	-0,7	O(1)
690,366	1378,717	1378,718	31,989	-1,0	O(2)

Tableau 5 : Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de 1 pmol de substance P oxydée.

c. L'α-lactalbumine

L'analyse de la protéine et des peptides issus de la digestion trypsique de l'α-LA oxydée a été réalisée en couplage nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. Pour la protéine, une nanocolonne C18 possédant des pores de 300 Å a été utilisée tandis que l'analyse des peptides a été réalisée en utilisant une nanocolonne C18 possédant des pores de 100 Å.

Le spectre déconvolué de la protéine entière présenté figure 34 permet d'observer de multiples oxydations de la protéine avec un maximum d'intensité pour la dioxydation. Une protéine possède un nombre important de sites candidats à l'oxydation ce qui explique les massifs successifs ayant des différences de masse de +15,99 Da à chaque fois. Dans notre cas, six oxydations sont repérées. En revanche, aucune scission de chaine secondaire ne s'est produite lors de la réaction avec 10 équivalents de peroxyde d'hydrogène en présence de Fer (II).

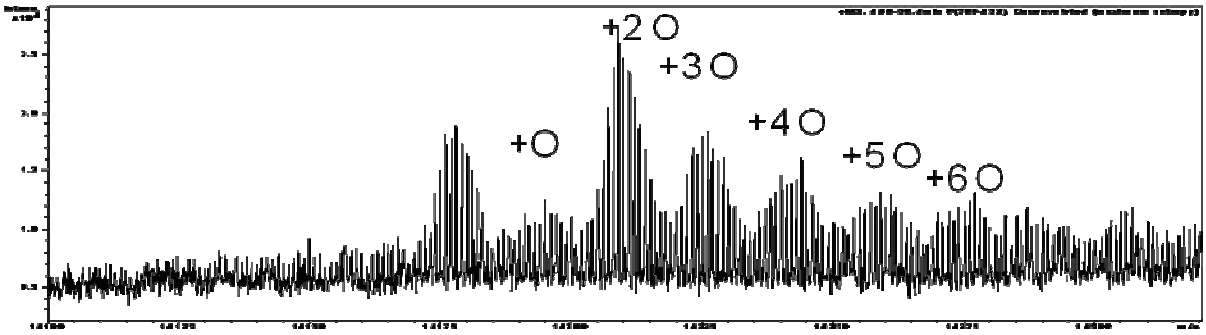


Figure 34 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR déconvolué de l'α-LA oxydée. Injection de 1 pmol.

L'analyse du digest a ensuite été entreprise. De nombreuses modifications concernant les oxydations sont connues et répertoriées dans les banques de données MASCOT. Les interrogations nous ont permis d'identifier et de localiser ces quatre sites d'oxydations (tableau 6). Ainsi, les oxydations du tryptophane 123, des histidines 87 et 126 et de la méthionine 109 ont pu être identifiées.

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Miss cleavage	Score	Peptide	Modifications
411,552	1231,635	1231,635	0,5	0	18	^{118}VGINY<u>W</u>LA<u>H</u>K^{127}	Dioxydation (HW)
422,24	1684,931	1684,930	0,5	1	12	^{114}ILDKVGINY<u>W</u>LAHK^{127}	Oxydation (HW)
567,982	1700,923	1700,925	-2,3	1	25	^{114}ILDKVGINY<u>W</u>LA<u>H</u>K^{127}	Dioxydation (HW)
615,286	1842,835	1842,838	-3,1	1	45	^{98}FLDDDLTDDI<u>M</u>CVKK^{112}	Carbamidomethyl (C); Oxydation (M)
652,531	2606,094	2606,095	-1,2	1	16	^{78}IW<u>C</u>KDDQNP<u>H</u>SSNI<u>C</u>NIS<u>C</u>DK^{98}	3 Carbamidomethyl (C); Oxydation (HW)
766,533	3827,630	3827,638	-8,6	2	44	^{82}DDQNPHSSNICNISCDKFLDDDLTDDI<u>M</u>CVKK^{112}	4 Carbamidomethyl (C); Oxydation (M)

Tableau 6 : Oxydations identifiées par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-lactalbumine exposé au peroxyde d'hydrogène en présence de Fe(II)

E[20] QLTKCEVFRE[30] LKDLKGYGGV[40] SLPEWVCTTF[50] HTSGYDTQAI[60]
VQNNDSTEYG[70] LFQINNKIWC[80] KDDQNPHSSN[90] ICNISCDKFL[100]
DDDLTDDIMC[110] VKKILDKVGI[120] NYWLAHKALC[130] SEKLDQWLCE[140] KL

Figure 35 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA oxydée.

2.3 Les espèces réactives de l'azote (RNS)

Les principales espèces réactives de l'azote sont les radicaux nitrosyle ($NO^{\bullet}$) et nitroxyl ($NO_2^{\bullet}$) ainsi que le peroxynitrite ($ONOO^-$) obtenu par réaction entre les radicaux nitrosyle et superoxyde ($O_2^{\bullet -}$). Ces trois espèces conduisent soit à la nitrosation soit à la nitration des biomolécules. Les oxydes d'azote réagissent principalement avec les tyrosines formant ainsi des résidus 3-nitrotyrosine. Ces résidus sont souvent utilisés comme marqueur de stress oxydatif. Ils ont été mis en évidence à partir d'anticorps anti-nitrotyrosine dans les maladies neurodégénératives telles que Parkinson et Alzheimer, les maladies cardiovasculaire [60]. Ils ont été également observés dans le plasma de fumeur [61, 62].

2.3.1 Réactivité des oxydes d'azote

Dans le cadre de notre étude, les oxydes d'azote ont été obtenus à partir du tétranitrométhane (TNM) d'après le protocole développé par Sokolovsky *et al* [63, 64]. En solution aqueuse, le TNM a la capacité de libérer le radical libre $NO_2^{\bullet}$. Des études récentes ont été développées par spectrométrie de masse afin de localiser les modifications induites sur des protéines par le TNM [65, 66], nous avons entrepris cette démarche sur des spectromètres de masse à haute résolution.

2.3.2 Analyse par spectrométrie de masse

a. L'angiotensine I

Les résultats obtenus pour l'analyse MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I native exposée au TNM sont présentés ci-après. D'après la figure 36, nous pouvons voir que le spectre de masse MALDI-TOF-TOF présente trois pics majoritaires en plus du pic moléculaires aux

rapports m/z 1309,70 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -15,3 ppm) ; 1325,68 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -4,2 ppm) et 1341,68 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -7,8 ppm) correspondant à des différences de masse respectives de +13,02 +29,00 et +45,00 Da. Le pic à +45,00 Da correspond à la réaction de nitration qui a lieu entre le peptide et le radical $NO_2^{\bullet}$ (+ NO_2 – H). Les massifs à $(MH+13)^+$ et $(MH+29)^+$ sont issu de la photodissociation du groupement nitroxyl intervenant lors de l'ionisation MALDI [65]. Par ailleurs, une réaction de dinitration est observée puisqu'un pic à une différence de masse de +89,99 Da est également présent sur le spectre. Il est intéressant de constater la présence de pics à des rapports m/z 1355,68 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -4,5 ppm) et 1370,67 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -6,2 ppm). Ces deux massifs correspondent initialement à l'adduit dinitré s'étant décomposé sous l'impact laser (tableau 7). La fragmentation des ions a été réalisée en utilisant toujours l'argon comme gaz de collision. Tous les spectres de fragmentation révèlent que les modifications ont lieu sur le résidu tyrosine avec pour la dinitration une disubstitution du cycle aromatique (figure 37).

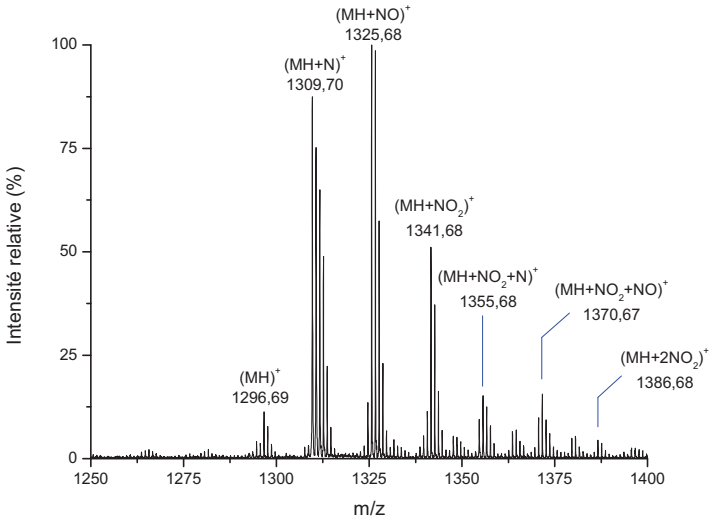
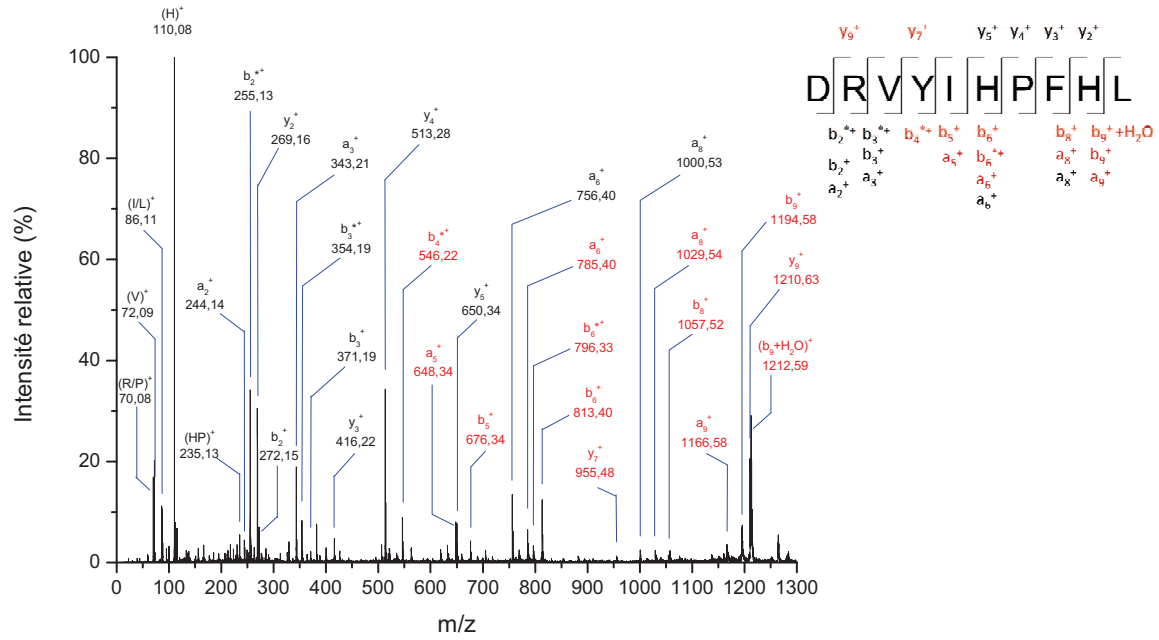


Figure 36 *:* Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 10 eq de TNM. Analyse de 1 pmol.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
1296,69	1296,69	0,00	-0,1	
1309,70	1309,68	13,02	-15,3	N (-H)
1325,68	1325,68	29,00	-4,2	NO (-H)
1341,68	1341,67	45,00	-7,8	NO_2 (-H)
1355,68	1355,67	58,99	-4,5	NO_2+N (-2H)
1370,67	1370,66	73,98	-6,2	NO_2+NO (-2H)
1386,68	1386,66	89,99	-17,9	2 NO_2 (-2H)

Tableau 7 : Modifications identifiées par MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée au TNM.

A



B

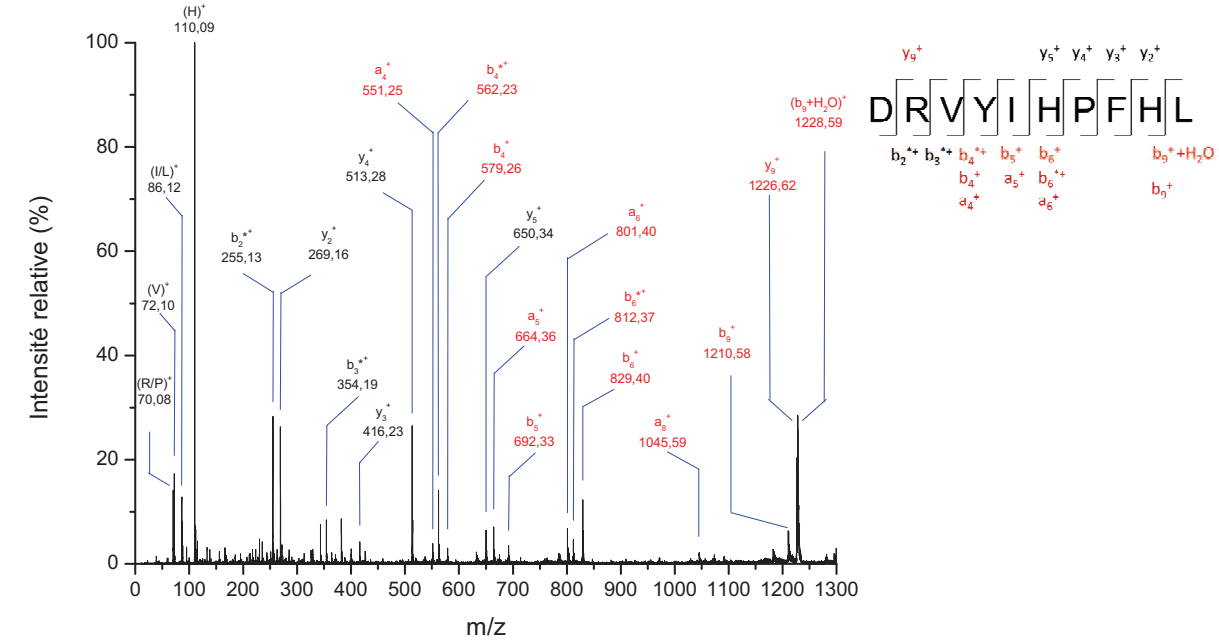


Figure 37 : Spectres MS² MALDI-TOF-TOF des ions à m/z = 1325,68 (A) et m/z = 1341,68 (B) de l'angiotensine I exposée au TNM ainsi que leur recouvrement de séquence avec les fragments identifiés.

L'analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR permet d'identifier l'adduit nitroxyl au rapport m /z 447,895 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -1,5 ppm) mais elle permet de mettre en évidence une nouvelle modification (tableau 8). En effet l'ion à m/z 453,226 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -1,3 ppm) indique qu'il s'agit d'un adduit N(1)O(3). La fragmentation de cet ion met en évidence la présence de trois fragments aux rapports m/z 438,231 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 3,0 ppm); 447,894 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 1,8 ppm) et 453,226 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -1,1 ppm). Ils correspondent respectivement aux adduits $(M+3H+O)^{3+}$, $(M+3H+NO_2)^{3+}$ et $(M+3H+NO_3)^{3+}$. Le fragment $(a_4+O)^+$ à m/z 522,267 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,4 ppm) correspond à une localisation de l'oxydation sur la tyrosine. Ainsi, l'adduit N(1)O(3) correspond à une double substitution du cycle aromatique de la tyrosine par NO_2 et OH en position 2 et 4 (figure 39). Par ailleurs, les adduits N(1) et N(1)O(1) n'ont pas été identifié lors de cette analyse confirmant la photodécomposition de l'adduit nitroxyl lors de l'ionisation MALDI.

m/z	mexp (Da)	mth (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
428,228	1281,661		-14,015		
432,900	1295,676	1295,677	0,000	-1,2	
447,895	1340,661	1340,663	44,985	-1,5	N(1) O(2)
453,226	1356,656	1356,657	60,980	-1,3	N(1) O(3)

Tableau 8 : Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de 1 pmol d'angiotensine 1 exposée au TNM.

b. La substance P

La réaction entre la substance P et le TNM a été réalisée dans les mêmes conditions réactionnelles appliquées à l'angiotensine I. L'analyse réalisée en MALDI-TOF-TOF après une heure de réaction n'a montré la présence d'aucun adduit. Différents paramètres réactionnels ont été modifiés tels que le temps et la température de réaction. Malgré ces changements, aucune réaction n'a été observée. Cela s'explique par le fait que la SP ne possède pas de tyrosine et que le TNM semble réagir uniquement sur ce résidu.

c. L'α-lactalbumine

Comme pour l'analyse de la réaction d'oxydation, l'analyse de l'α-LA nitrée a été effectuée en couplage nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR soit en protéine entière soit sur le digest protéique. Le spectre déconvolué de la protéine entière (figure 38) présente un adduit majoritaire à +44,99 Da correspondant à la réaction de nitration entre la protéine et le TNM. Une dinitration est également observé sur le spectre mais avec une faible intensité. On remarque en revanche des adduits précédant le pic moléculaire correspondant à des scissions de chaines latérales induites par les radicaux.

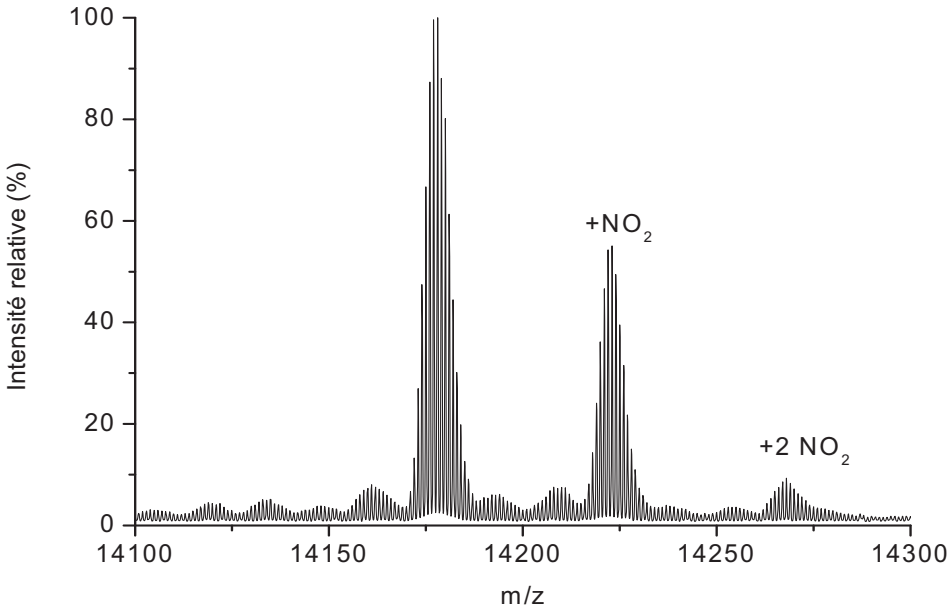


Figure 38 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR déconvolué de l'α-LA nitrée

Après avoir complété les banques de données pour les modifications induites par le tétranitrométhane, l'analyse peptidique a permis de localiser une nitration unique sur la tyrosine 122 (tableau 9). Le recouvrement de séquence obtenu lors de cette digestion est de 100 %. Le peptide (36-77) contient trois tyrosines (Y37, Y55 et Y69). Il s'avère que ces trois tyrosines n'ont pas été modifiées par le TNM. Cela peut être dû à la conformation de la protéine rendant les sites inaccessibles à la nitration.

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Miss cleavage	Score	Peptide	Modifications
415,554	1244,631	1244,630	0,5	0	32	^{118}VGINYWLAHK^{127}	NO_2 (-H)
623,323	1244,632	1244,630	1,4	0	32	^{118}VGINYWLAHK^{127}	NO_2 (-H)
429,488	1713,932	1713,920	1,4	1	29	^{114}ILDKVGINYWLAHK^{127}	NO_2 (-H)

Tableau 9 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'α-LA exposée au TNM.

E^{20} QLTKCEVFRE^{30} LKDLKGYGGV^{40} SLPEWVCTTF^{50} HTSGYDTQAI^{60}
VQNNDSTEYG^{70} LFQINNKIWC^{80} KDDQNPHSSN^{90} ICNISCDKFL^{100}
DDDLTDDIMC^{110} VKKILDKVGI^{120} NYWLAHKALC^{130} SEKLDQWLCE^{140} KL

Figure 39 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA nitrée.

La figure 40 représente les trois voies réactionnelles que nous avons identifiées lors de l'analyse des modifications induites par le TNM. La voie (1) représente l'addition d'un groupement nitroxyl en position 2 du cycle aromatique de la tyrosine. La voie (2) correspond à une disubstitution du cycle en position 2,4 par un groupement hydroxyle et nitroxyl et la voie (3) représente la dinitration de la tyrosine sur les positions 2,4 du cycle aromatique.

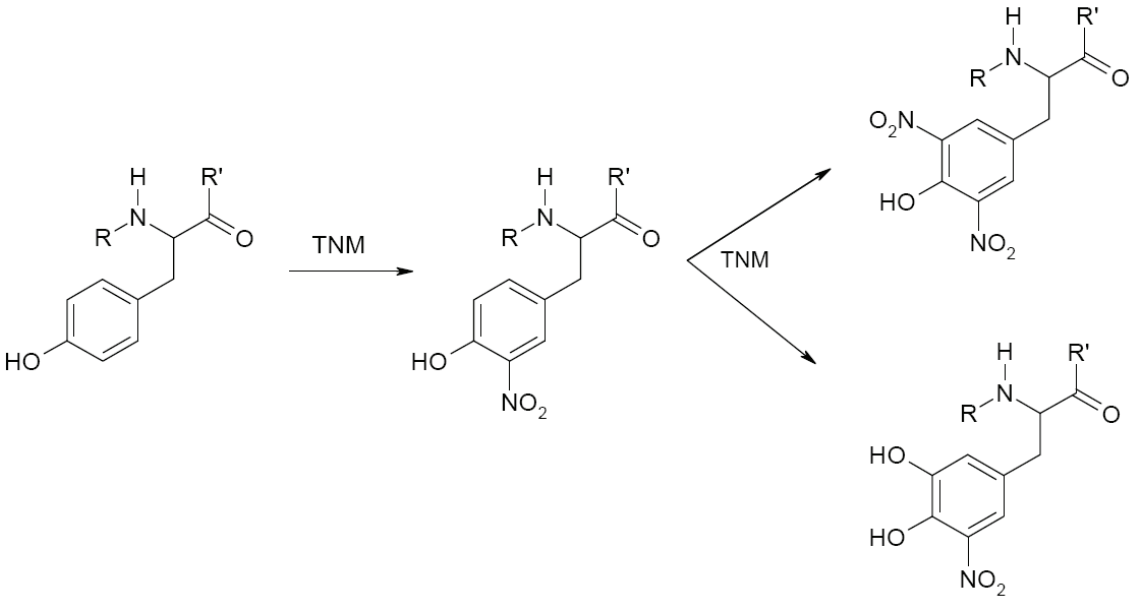


Figure 40 : Réactions entre le résidu tyrosine et le TNM. (1) Nitration du cycle aromatique, (2) Nitration et oxydation du cycle aromatique, (3) Dinitration du cycle aromatique.

En conclusion

Nous avons réalisé les analyses des modifications induites par des radicaux en utilisant la spectrométrie de masse à haute résolution. Nous avons ainsi pu identifier et localiser de nombreux adduits issus de l'oxydation et de la nitration de peptides et protéines standards. Par ailleurs, nous avons montré que ces réactions entrainaient également des scissions de chaines latérales des acides aminés.

3. MODIFICATIONS INDUITES PAR DES ALDEHYDES

Différents aldéhydes sont présents dans la fumée de cigarette à des concentrations relativement importantes. Ces molécules sont extrêmement réactives et peuvent réagir avec les protéines au niveau des fonctions sulfhydriles, amines et imidazoles. Aussi, cinq résidus sont susceptibles d'être affectées par les aldéhydes : la cystéine, la lysine, la fonction N-terminal, l'histidine ainsi que l'arginine (figure 41) [51].

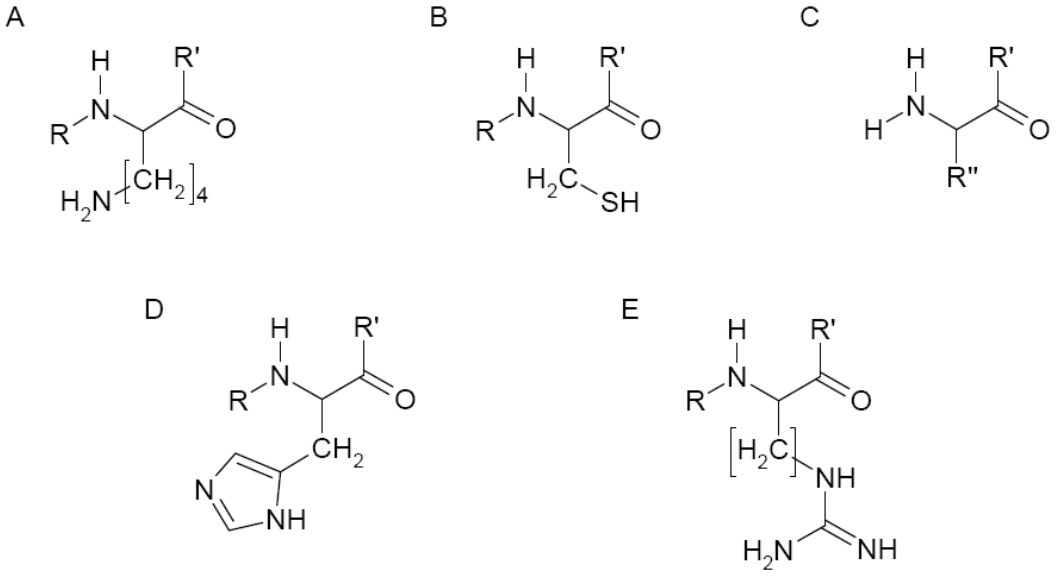


Figure 41 : Acides aminés réagissant avec les aldéhydes. A : Lysine (K), B : Cystéine (C), C : N-terminal (N-ter), D : Histidine (H), E : Arginine (R).

La réaction majoritaire entre une biomolécule et les aldéhydes est la réaction de base et de Schiff. Cette réaction consiste en la formation d'une fonction imine entre une amine primaire et le carbone du groupement carbonyle de l'aldéhyde (figure 42). Pour les aldéhydes conjugués, une addition de type Michael peut avoir lieu [67]. Une addition de Michael est une réaction appartenant à la famille des additions nucléophiles conjuguées. Elle permet la création d'une liaison carbone-carbone (ou carbone-azote / carbone-soufre). Il s'agit de l'addition d'un nucléophile sur un composé carbonylé α,β-insaturés (aldéhydes, cétones) (figure 43).

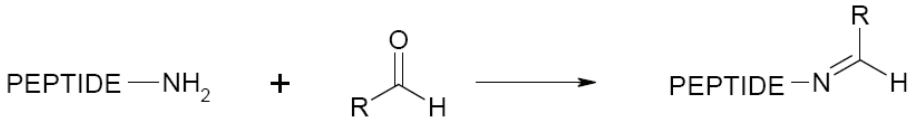


Figure 42 : Réaction de base de Schiff (exemple de réaction à partir d'une amine primaire).

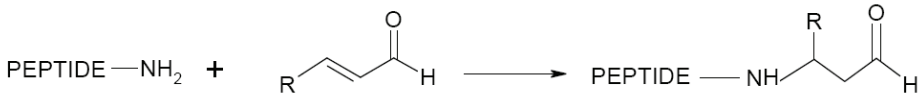


Figure 43 : Addition de Michael (exemple de réaction à partir d'une amine primaire).

Dans le cadre du développement de réactions modèles, nous avons travaillé sur six aldéhydes appartenant à trois familles différentes : les aldéhydes saturés (formaldéhyde et acétaldéhyde), les aldéhydes conjugués (acroléine et crotonaldéhyde) et les dialdéhydes (malonaldéhyde et glyoxal). Les réactions ont été effectuées sur les trois standards protéiques et les analyses réalisées par spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF et nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR.

3.1 Les aldéhydes saturés

3.1.1 Le formaldéhyde

Le formaldéhyde (FA), de formule CH_2O, est un composé organique volatile. Il est formé par différentes sources de combustion dont la fumée de cigarette. C'est un gaz très soluble dans

l'eau et est connu dans ce cas sous l'appellation formol. Il a, par ailleurs, la caractéristique de se polymériser en solution formant ainsi des polymères $[-O-CH_2-]_n$. Le FA est utilisé dans l'industrie des résines, du cuir, du papier, du bois…[68]. De même, il trouve une grande application en pharmacologie pour l'inactivation des toxines et virus dans la fabrication de vaccins [69]. Le FA est également utilisé pour le marquage de protéine et l'étude des interactions protéine-protéine et ADN-protéine [70-72].

La réaction *in-vitro* entre le formaldéhyde et les trois standards peptidiques et protéiques a été entreprise par exposition de 1 équivalent de formaldéhyde pendant une heure dans du sérum physiologique. Pour les deux peptides, l'analyse a été réalisée directement par MALDI-TOF-TOF après dépôt de 1 pmol d'échantillon sur la cible MALDI cocristallisés avec la matrice CHCA. Les résultats obtenus ne présentent aucune modification des peptides. Cela peut s'expliquer par le fait que la fonction imine est relativement instable en milieu acide, aussi, lors du mélange entre l'échantillon et la matrice, la fonction imine s'hydrolyse reformant ainsi le peptide natif. Pour pallier à ce problème, nous avons voulu de stabiliser les adduits formés. La réduction des fonctions imines a donc été réalisée par ajout de cyanoborohydrure de sodium dans l'échantillon. Afin d'éviter une formation trop importante d'adduit sodium, un dessalage des échantillons s'est vu être indispensable avant l'analyse en raison de la concentration importante en sodium. Pour les peptides, un dessalage sur zip tip C18 a été réalisé tandis que pour la protéine, un dessalage sur microcon 3 kDa a été privilégié au zip tip C4 afin de récupérer des quantités nécessaires à la digestion enzymatique.

a. L'angiotensine I

Le spectre MS de l'angiotensine I exposée au formaldéhyde et réduite au $NaBH_3CN$ obtenu en MALDI-TOF-TOF présente 3 massifs isotopiques principaux (figure 44). Le premier massif est l'ion MH+ observé à m/z 1296,69 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,1 ppm). Les deux autres massifs sont à des différences de masse de +14,02 Da et +28,03 Da par rapport au peptide natif correspondant respectivement aux adduits C(1)H(2) et C(2)H(4). Afin de déterminer la localisation de l'adduit C(1)H(2), la fragmentation de l'ion à m/z 1310,70 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -1,5 ppm) a été réalisée (figure 45). De nombreux fragments portant ou non la modification ont pu

être identifiés avec des différences de masses expérimentales par rapport à la masse théoriques comprises entre -40 et +20 ppm. Ainsi, tous les ions b de b_2^+ à b_9^+ ont été identifiés avec la modification C(1)H(2) alors qu'au niveau des ions y^+, aucun ne porte cette modification. A partir de cela, nous pouvons conclure que l'adduit s'est fixé en position N-terminal du peptide.

La présence de l'adduit C(2)H(4) peut s'expliquer de deux façons. Il peut s'agir soit du dimère du formaldéhyde, soit qu'il y a deux adduits C(1)H(2) qui se sont fixés sur le peptide. En effet, l'angiotensine I contient trois sites réactionnels probables : les acides aminés arginine et histidine et la position N- terminal. Afin de répondre à cette question, la fragmentation de l'ion à m/z 1324,72 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -1,9 ppm) a été réalisée. Le recouvrement de séquence est complet entre b_2^+ à b_9^+, l'ion y_9^+ est identifié sans modification ce qui implique qu'il s'agit du dimère du formaldéhyde et que la modification C(2)H(4) a lieu sur la position N-terminal du peptide.

Les travaux de Metz *et al* [69] sur des peptides synthétiques ont montré qu'en présence d'une forte concentration en FA, tous les acides aminés présentés figure 41 pouvait être modifiés. Cependant, dans nos conditions de manipulations, seule la fonction N-terminale est alkylée. Cela prouve que l'alkylation des acides aminés est dose-dépendante.

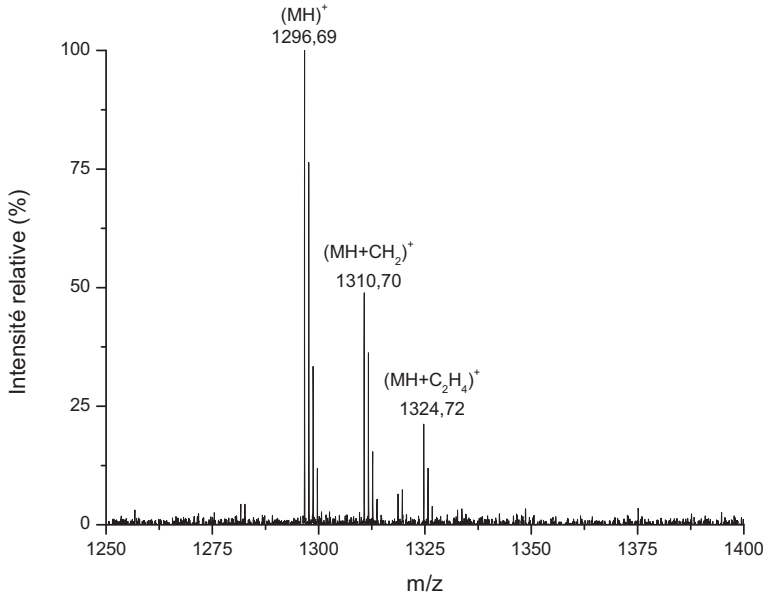


Figure 44 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq de FA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

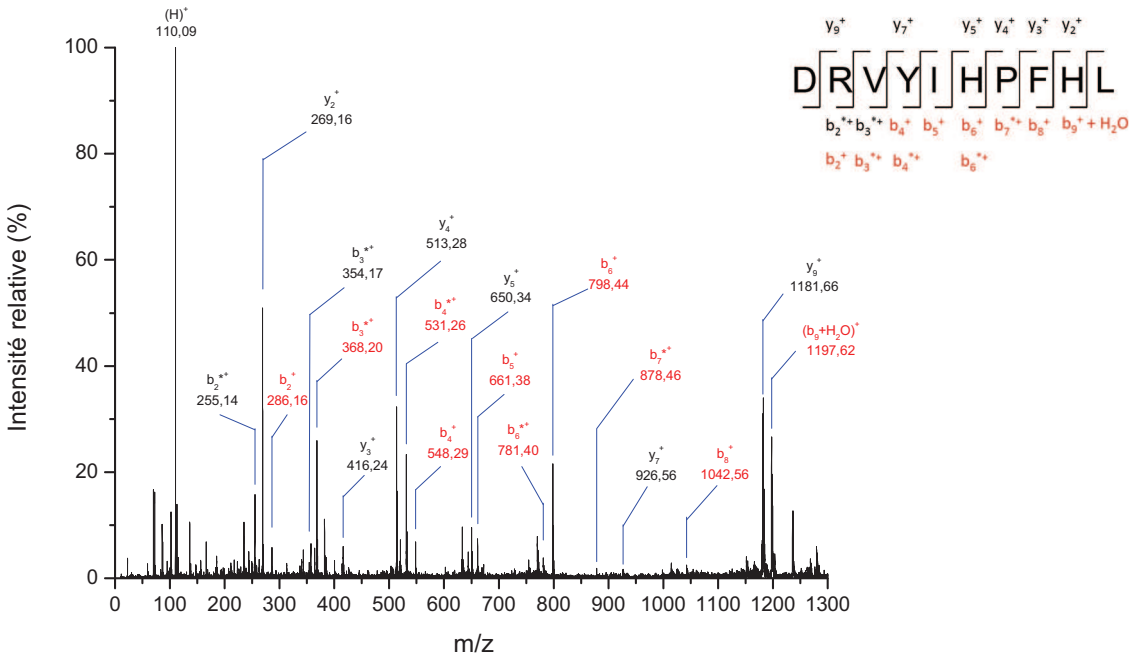


Figure 45 : Analyse MS^2 de l'angiotensine I exposée au formaldéhyde et réduite au $NaBH_3CN$ par MALDI-TOF-TOF. Spectre MS^2 de l'ion à m/z = 1310,70 ainsi que la représentation de la séquence avec les fragments identifiés.

Afin de vérifier la réduction des adduits formés après exposition au formaldéhyde, la réaction de réduction a été réalisée avec l'équivalent deutérié du $NaBH_3CN$, le $NaBD_3CN$. Les mêmes conditions réactionnelles ont été appliquées et après dessalage, l'échantillon a été analysé en MALDI-TOF-TOF. Les tableaux récapitulatifs sont présentés en annexe 2. Le spectre présente deux adduits aux rapports m/z 1311,71 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,3 ppm) et 1325,72 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,5 ppm). La différence de masse entre les adduits de ce spectre et ceux obtenus lors de la réduction au $NaBH_3CN$ est de 1 Da. Cette masse implique l'introduction d'un deutérium lors de la réduction de la fonction imine. Aussi les deux adduits présents correspondent respectivement aux adduits C(1)H(1)D(1) et C(2)H(3)D(1).

L'analyse de l'angiotensine I exposée à 1 équivalent de FA et réduite au $NaBH_3CN$ a ensuite été réalisée en couplage nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. Cette deuxième analyse a pour objectif de confirmer la masse et la localisation des modifications. Le spectre de masse obtenu présente deux adduits en plus de l'ion moléculaire aux différences de masses calculés à +14,016 Da et +28,032 Da correspondant respectivement aux adduits C(1)H(2) et C(2)H(4) (figure 46).

La haute résolution et la précision de mesure obtenues avec ce spectromètre de masse nous donne des erreurs entre les masses théoriques et les masses expérimentales ne dépassant pas 1,2 ppm (tableau 10).

Le spectre de fragmentation de l'adduit C(1)H(2) présente des ions fragments entre b_4^+ et b_9^+ ainsi que les fragments internes $(RVYIH)^+$ et $(RVYIHPF)^+$. Tous les ions b sont identifiés avec la modification mais pas les fragments internes (figure 47). Ainsi, il est vérifié que les modifications induites par 1 équivalent de FA sur l'angiotensine I ont lieu uniquement sur la fonction N-terminale du peptide et non sur les acides aminés histidine et arginine et qu'il s'agit par ailleurs des formes monomère et dimère du formaldéhyde.

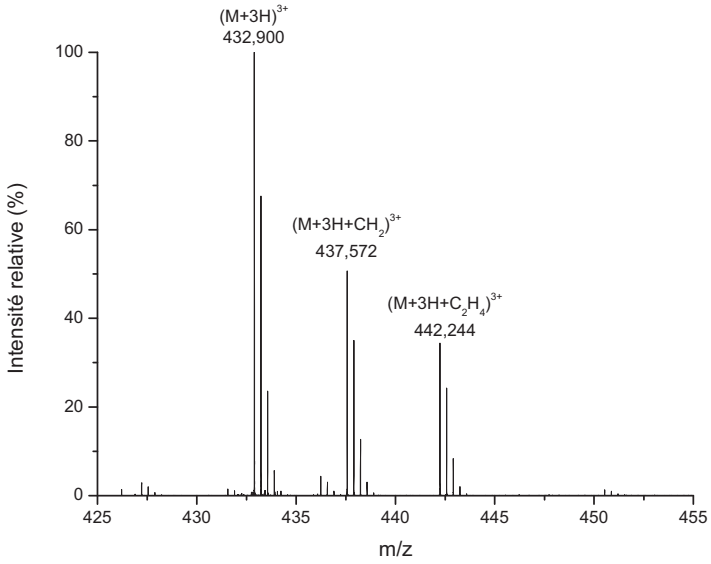


Figure 46 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'angiotensine I exposée au FA et réduite au $NaBH_3CN$. Injection de 1 pmol.

m/z	mexp (Da)	mth (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times 10^6$ (ppm)	Adduit
432,900	1295,676	1295,678	0	-1,2	
437,572	1309,692	1309,693	14,016	-1,2	C(1) H(2)
442,244	1323,708	1323,709	28,032	-0,9	C(2) H(4)

Tableau 10 : Modifications observées par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'angiotensine I exposée au FA et réduite au $NaBH_3CN$.

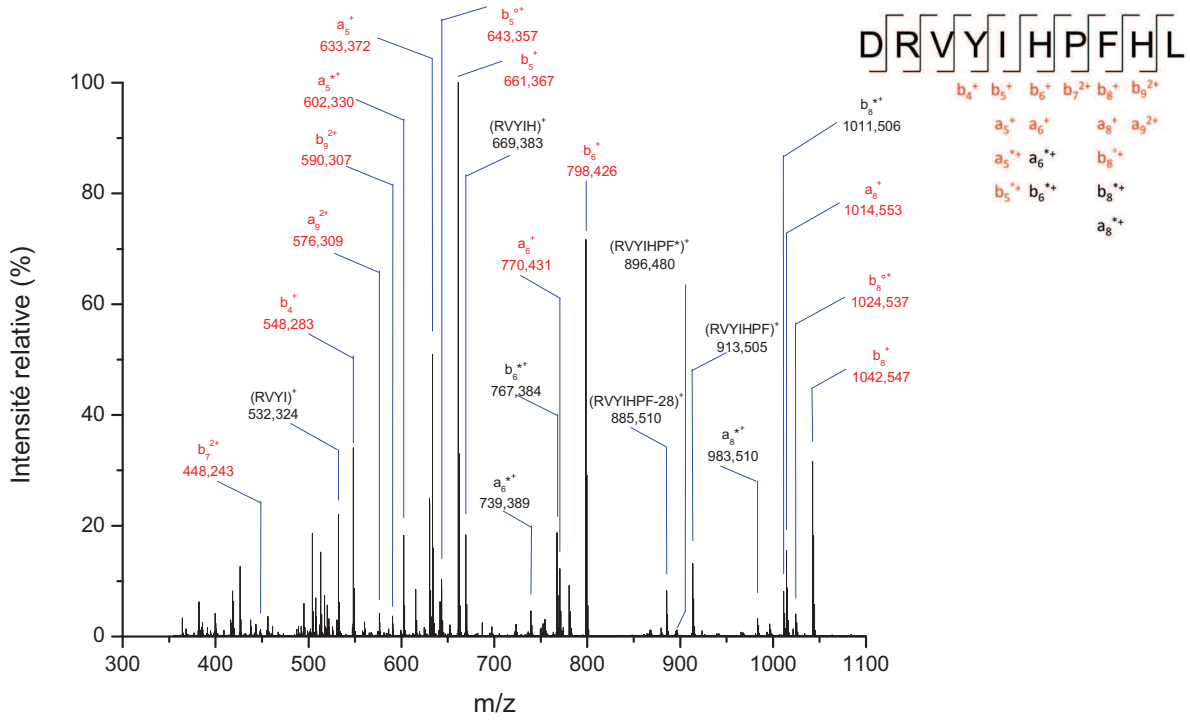


Figure 47 : Spectre MS^2 nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'ion à m/z = 437,572 de l'angiotensine I exposée au FA et réduite au $NaBH_3CN$ ainsi que le recouvrement de séquence avec les ions identifiés.

La réaction principale entre une amine primaire et le formaldéhyde à savoir la formation par base de Schiff de l'adduit C(1)H(2) est présentée sur la figure 48.

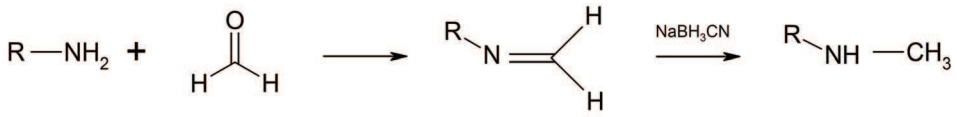


Figure 48 : Réaction entre une amine primaire et le formaldéhyde avec formation d'un adduit C(1)H(2).

b. La substance P

La SP comporte trois fonctions susceptibles d'être modifiées par le FA : la fonction N-terminale et les amines primaires de l'arginine et de la lysine. Afin d'étudier les modifications

induites par le FA, la SP a été traitée selon les mêmes conditions expérimentales utilisées pour l'angiotensine I.

Le spectre de masse MALDI-TOF-TOF montre la présence des deux mêmes adduits que lors de l'analyse de l'angiotensine I à des différences de masses de +14,01 Da et +28,03 Da correspondant respectivement aux adduits C(1)H(2) et C(2)H(4) (figure 49). La fragmentation de ces deux ions a été réalisée en choisissant l'argon comme gaz de collision. Un exemple d'identification de la localisation est présenté grâce au spectre de fragmentation de l'ion à m/z 1375,77 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -2,3 ppm) (figure 50). Sur ce spectre MS^2 tous les ions b^+ sont présents avec la modification C(2)H(4) hormis l'ion b_2^+ identifié uniquement sans modification. On peut ainsi affirmer que la réaction de base de Schiff s'est produite sur l'amine primaire de la lysine préférentiellement au N-terminal et l'amine primaire de l'arginine.

L'analyse MALDI-TOF-TOF de la SP exposée au FA et réduite au $NaBD_3CN$ présente des ions aux rapports m/z 1362,76 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,3 ppm) (+15,02 Da) et 1376,77 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,5 ppm) (+29,04 Da). Ces ions correspondent aux adduits C(1)H(1)D(1) et C(2)H(3)D(1). Cela confirme la réduction de la fonction imine des adduits aldéhydes.

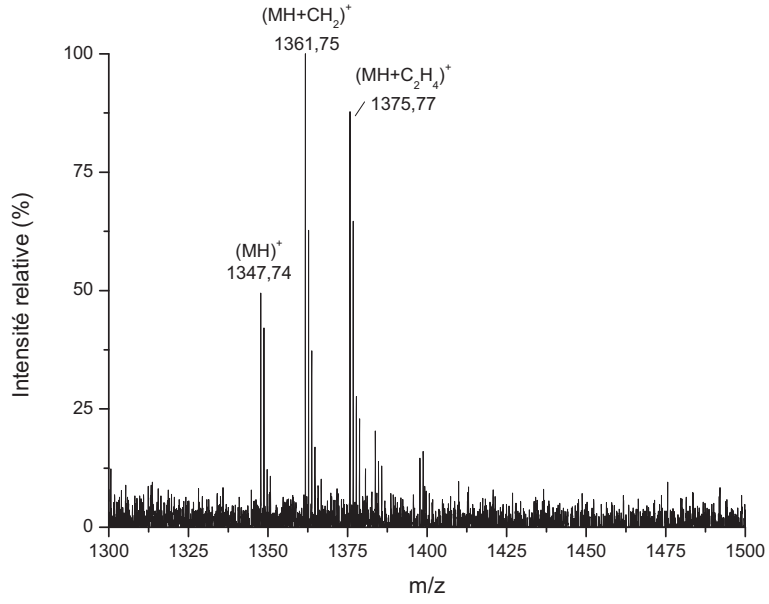


Figure 49 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée à 1 eq de FA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

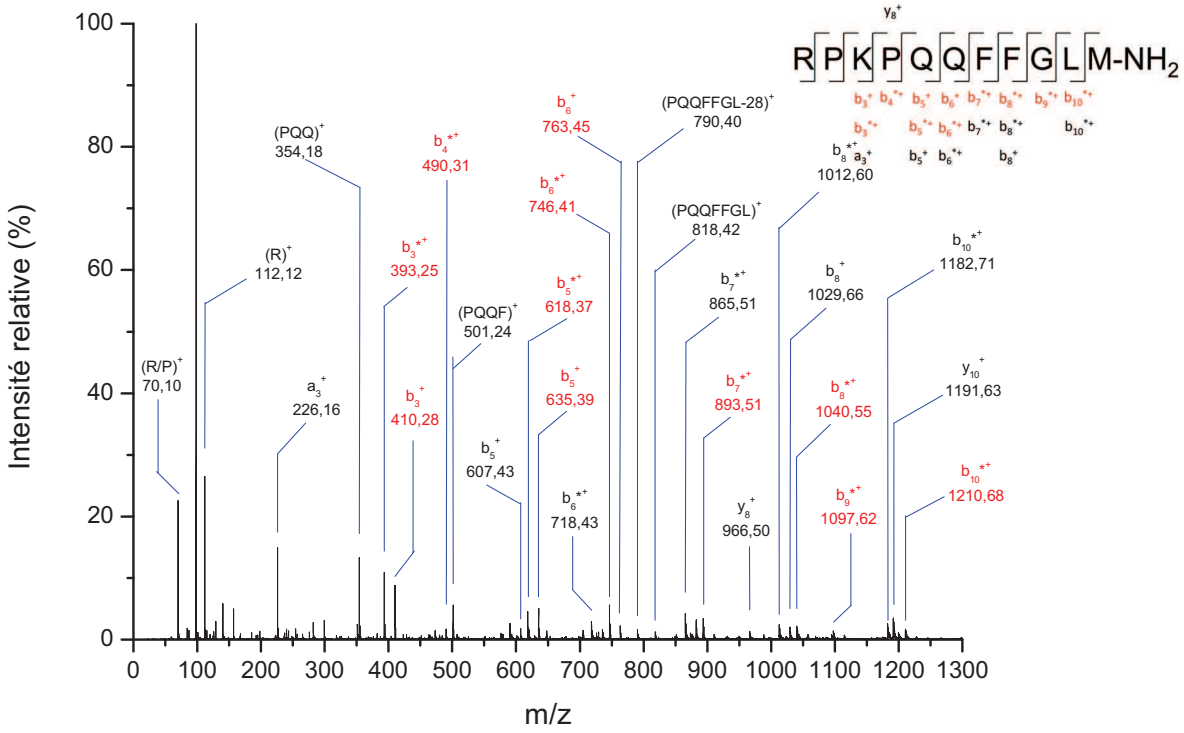


Figure 50 : Spectre MS^2 de l'ion à m/z 1375,75 de la substance P exposée au FA et réduite au $NaBH_3CN$ par MALDI-TOF-TOF.

Le spectre de masse moyenné obtenu avec le FT-ICR présente deux groupes d'ions dichargés : le premier groupe d'ions correspond à l'ion b_{10}^{2+} à m/z 600,338 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,8 ppm) et ses adduits formaldéhyde C(1)H(2) et C(2)H(4) aux rapports m/z 607,356 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -15,7 ppm) et 614,353 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -1,4 ppm) respectivement. Le deuxième groupe d'ions correspond à l'ion moléculaire dichargé à m/z 674,371 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,0 ppm) et ses adduits aux rapports m/z 681,379 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -1,1 ppm) et 688,387 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,8 ppm) (figure 51 et tableau 11). Les spectres de fragmentation de tous ces adduits ont été étudiés mais ils ne nous permettent pas de localiser précisément la modification. Ainsi, dans la suite de cette étude, les identifications des modifications se feront préférentiellement à partir de l'analyse MALDI-TOF-TOF.

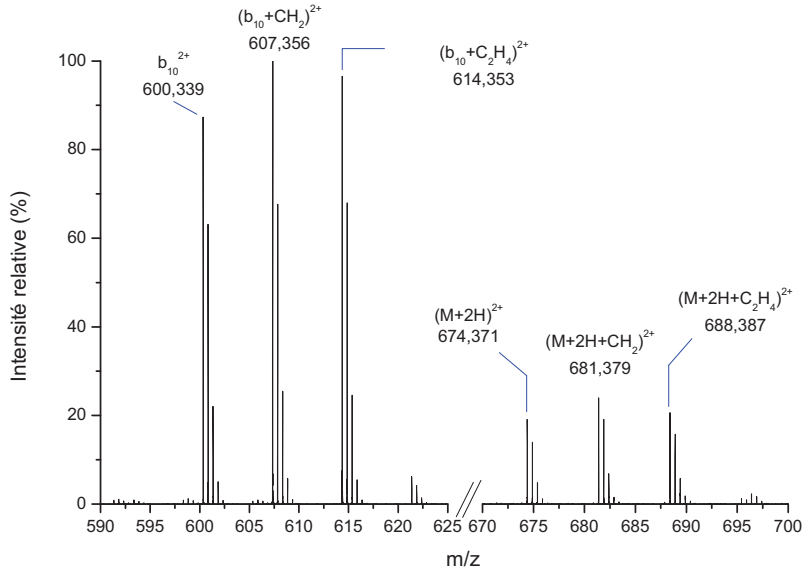


Figure 51 : Spectre MS nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la SP exposée à 1 eq de FA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

m/z	mexp (Da)	mth (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times 10^6$ (ppm)	Adduit
600,338	1198,660	1198,661	0,000	-0,8	
607,356	1212,696	1212,677	14,036	15,7	C(1) H(2)
614,353	1226,691	1226,692	28,031	-1,4	C(2) H(4)
674,371	1346,727	1346,728	0,000	-0,7	
681,379	1360,742	1360,744	14,015	-1,1	C(1) H(2)
688,387	1374,758	1374,759	28,031	-0,8	C(2) H(4)

Tableau 11 : Modifications observées sur le spectre de masse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la substance P exposée à 1 eq de FA et réduite au $NaBH_3CN$.

c. L'α-lactalbumine

L'α-lactalbumine possède 17 sites candidats pour une réaction avec les aldéhydes : 12 lysines, 1 arginine, 3 histidines et sa fonction N-terminal. Ses 8 cystéines ne sont pas concernées par les modifications car elles sont déjà liées sous forme de quatre ponts disulfures.

L'étude de l'α-LA exposée à 1 équivalent de formaldéhyde et réduite au $NaBH_3CN$ en milieu acide a été réalisée après les étapes de réduction, d'alkylation et de digestion enzymatique à la trypsine. Les premières analyses ont été effectuées avec le spectromètre de masse MALDI-TOF-TOF en mode réflectron positif. L'interrogation des banques de données via MASCOT

sous le mode 'peptide mass fingerprint' nous a permis de contrôler le recouvrement de séquence de la protéine et d'identifier certaines modifications. Cependant la faible intensité des peptides modifiés n'a pas permis d'obtenir des spectres de fragmentation MS^2 nous permettant de localiser avec exactitude les adduits FA formés. Aussi, l'analyse par nanoESI-Qh-FT-ICR avec un couplage en nano chromatographie liquide de 3h s'est révélé être une technique de choix pour la localisation des modifications. Les interrogations de banques de données ont été réalisées avec MASCOT sous le mode 'MSMS ion search'. La banque de données spécifique à l'α-LA a été complétée grâce aux modifications identifiées sur les peptides standards. Aussi pour le formaldéhyde, les adduits C(1)H(2) et C(2)H(4) aux différences de masses respectives de 14,016 Da et 28,031 Da ont été ajoutés.

Pour le digest d'α-LA, la réaction avec 1 équivalent de formaldéhyde a entrainé la formation de trois adduits (tableau 12). Il s'agit des adduits C(1)H(2), C(2)H(4) et C(3)H(6) correspondant aux monomère, dimère et trimère du formaldéhyde. Les spectres de fragmentation obtenus assurent la localisation sur la lysine 24 du peptide 20-29. Aucune modification n'a été observée sur les acides aminés histidine et arginine ni sur la fonction N-terminale de la protéine.

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Miss cleavage	Score	Peptide	Modifications
441,896	1322,667	1322,665	1,6	1	11	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); FA C(1)H(2)
446,568	1336,681	1336,681	0,4	1	9	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); FA C(2)H(4)
451,239	1350,695	1350,697	1,0	1		^{20}EQLTKCEVFR^{30}	Carbamidomethyl (C); FA C(3)H(6)

Tableau 12 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposée au FA

E^{20} QLTKCEVFRE^{30} LKDLKGYGGV^{40} SLPEWVCTTF^{50} HTSGYDTQAI^{60}
VQNNDSTEYG^{70} LFQINNKIWC^{80} KDDQNPHSSN^{90} ICNISCDKFL^{100}
DDDLTDDIMC^{110} VKKILDKVGI^{120} NYWLAHKALC^{130} SEKLDQWLCE^{140} KL

Figure 52 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée au FA et réduite au $NaBH_3CN$.

En conclusion

L'étude de l'impact du FA sur trois standards peptidiques et protéiques nous a permis d'identifier et de localiser précisément les modifications induites. Nous avons ainsi pu voir qu'il y avait dimérisation du FA en solution en raison de la présence des adduits C(2)H(4). Par ailleurs, la réaction entre l'angiotensine I et le FA entraine la modification de la fonction N-terminale du peptide tandis que pour la substance P et l'α-lactalbumine, seules les lysines sont modifiées. Ces résultats montrent une plus grande réactivité de la lysine par rapport à la fonction N-terminale. Cela peut s'expliquer par le caractère plus nucléophile de la lysine.

3.1.2 L'acétaldéhyde

Nous avons ensuite porté notre étude sur l'impact de l'acétaldéhyde sur des protéines standards. L'acétaldéhyde (AA) de formule CH_3CHO est reconnu comme carcinogène de catégorie III et peut entrainer des tumeurs au niveau des voies respiratoires après administration par inhalation. Il est très présent dans l'environnement en tant que produit de combustion et constituant naturel de nombreux aliments. L'AA est hautement réactif et des études ont montré qu'il pouvait former des adduits avec l'ADN par réaction de base de Schiff ainsi que des réticulations de l'ADN [73-75].

Les principales études réalisées sur l'acétaldéhyde concernent l'alcoolisme. En effet, après consommation, l'alcool (soit l'éthanol) est converti en acétaldéhyde via l'enzyme ADH (alcohol dehydrogenase). Aussi l'accumulation d'AA dû à une consommation excessive d'alcool augmente les interactions avec les biomolécules et notamment les protéines. Les recherches menées *in vitro* par Birt et al [76] ont permis la localisation par spectrométrie de masse et RMN d'un adduit acétaldéhyde sur la position N-terminale de l'hémoglobine. Mais il s'avère que les réactions de base de Schiff se font préférentiellement sur les résidus lysines des protéines. Il a d'ailleurs été montré que les adduits protéine-acétaldéhyde entrainait une diminution voire une perte d'activité des protéines lysine-dépendante [77, 78]. L'AA s'est donc vu être un marqueur de choix de l'exposition à l'alcool et une étude en immunologie de patients alcooliques a révélé la présence d'adduit acétaldéhyde au niveau du cerveau [79]. L'AA est également un produit issu de la combustion du tabac. En effet, l'AA est présent dans la fumée de cigarette à une

concentration de 920 µg/cigarette, cependant la majorité des études réalisées sur l'impact de la fumée de cigarette mettent en évidence un caractère pro-inflammatoire mais ne permettent pas de conclure s'il s'agit effectivement de l'AA ou des autres aldéhydes comme l'acroléine.

L'enjeu ici est de déterminer et de localiser les modifications induites par 1 équivalent d'acétaldéhyde. Les analyses ont été entreprises sur les deux peptides standards puis sur la protéine. Comme précédemment, elles ont été réalisées conjointement sur les deux spectromètres de masse. Par ailleurs, seules les études réalisées sur les échantillons réduits au cyanoborohydrure de sodium seront présentées. Enfin les spectres de fragmentation obtenus seront rapportés en annexe 3.

a. L'angiotensine I

Le spectre MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I après réaction avec l'acétaldéhyde et réduction au $NaBH_3CN$ montre la formation de deux adduits aux rapports m/z 1310,71 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -4,4 ppm) et 1324,72 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,4 ppm) (figure 52). Il s'agit des adduits C(1)H(2) et C(2)H(4). L'adduit C(2)H(4) correspond à la réaction de base de Schiff entre le peptide et l'AA. La présence du premier adduit implique une réaction de rétroaldolisation dans le milieu réactionnel conduisant à la formation de formaldéhyde. La réduction au $NaBD_3CN$ a conduit à l'identification des adduits C(1)H(1)D(1) et C(2)H(3)D(1) confirmant ainsi la réaction de base de Schiff avec l'acétaldéhyde et son produit de rétroaldolisation.

Les deux adduits C(1)H(2) et C(2)H(4) ont également été identifiés lors de l'analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR, ils sont respectivement aux rapports m/z 437,572 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -1,2 ppm) et 442,244 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,9 ppm) (figure 53). Les différences de masses théoriques par rapport aux masses expérimentales sont de 1 ppm assurant ainsi l'identification des adduits (tableau 13).

Afin de localiser les adduits formés, l'étude des spectres de fragmentation sur les deux spectromètres de masse a été réalisée. La fragmentation obtenue par MALDI-TOF-TOF présente tous les ions b de b_2^+ à b_9^+ avec une différence de 14,02 Da pour l'adduit C(1)H(2) et de 28,03 Da pour l'adduit C(2)H(4). La fragmentation par FT-ICR des peptides modifiés présente des fragments entre $(a/b)_4^+$ et $(a/b)_8^+$. Tous ces ions ont été identifiés avec et sans adduit avec des

différences de masse entre la masse théorique et la masse expérimentale ne dépassant pas 1 ppm. Grâce à la présence des fragments internes $(RVYIH)^+$ et $(RVYIHPF)^+$ identifiés uniquement sans modification, la localisation des deux adduits formés est confirmée en position N-terminal du peptide.

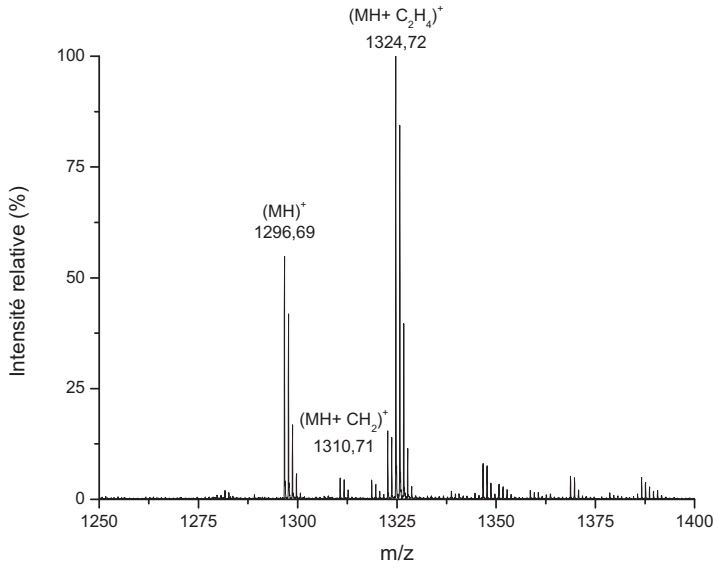


Figure 53 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol

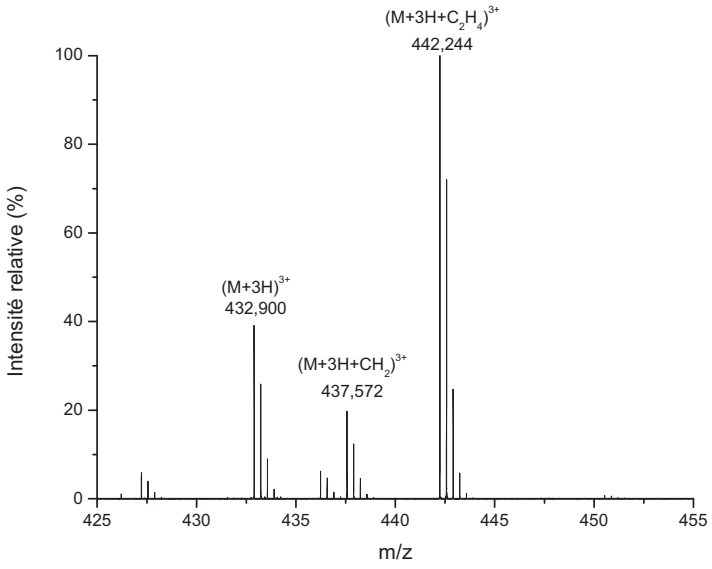


Figure 54 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'angiotensine I exposée à 1 eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$. Injection de 1 pmol.

m/z	mexp (Da)	mth (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
432,900	1295,676	1295,678	0	-1,2	
442,2435	1323,707	1323,709	28,031	-1,3	C(2) H(4)
451,5873	1351,738	1351,740	56,063	-1,2	C(4) H(8)

Tableau 13 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour l'angiotensine I exposée à1 eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$.

La réaction principale entre une amine primaire et l'acétaldéhyde à savoir la formation par base de Schiff de l'adduit C(2)H(4) est présentée sur la figure 55.

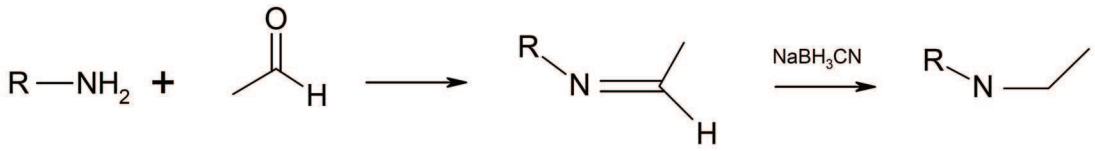


Figure 55 : Réaction entre une amine primaire et l'acétaldéhyde avec formation d'un adduit C(2)H(4).

b. La substance P

La réaction entre l'AA et la SP semble plus complexe que celle étudiée avec l'angiotensine I. Ici, le pic majoritaire obtenu lors de l'analyse MALDI-TOF-TOF est au rapport m/z 1375,77 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -1,6 ppm) correspondant à l'adduit de base de Schiff C(2)H(4) (figure 56). La réaction de rétroaldolisation ne s'est pas produite dans ce cas puisque aucun pic n'est identifié avec une différence de masse de 14,02 Da par rapport au peptide natif. Néanmoins, nous pouvons constater la présence d'adduits supplémentaires à des rapports m/z plus importants comme le pic au rapport m/z 1403,79 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 3,1 ppm) correspondant à un adduit C(4)H(8). Deux autres pics ont également été attribués à des modifications : les pics aux rapports m/z 1391,77 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -2,4 ppm) et 1419,79 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,1 ppm) correspondent respectivement aux adduits C(2)H(4)O(1) et C(4)H(8)O(1). Plusieurs questions se posent alors. Concernant l'adduit C(4)H(8), s'agit-il du dimère de l'AA, ou de deux adduits C(2)H(4) fixés sur la lysine et la fonction N-terminal ? Et qu'en est-il de la nature des deux

autres adduits ? Afin de répondre à ces questions nous avons étudié les spectres de fragmentations de ces trois ions.

Concernant l'adduit C(4)H(8), la présence sur le spectre MS^2 des ions b de b_3^+ à b_9^+ avec un incrément de masse de + 56,06 Da et de l'ion b_2^+ sans incrément nous a permis de conclure que l'adduit était localisé sur le résidu lysine de la SP. Pour les deux autres adduits, il s'est avéré qu'il s'agissait des adduits sous forme monomère et dimère de l'AA qui ont réagi sur la forme oxydée du peptide.

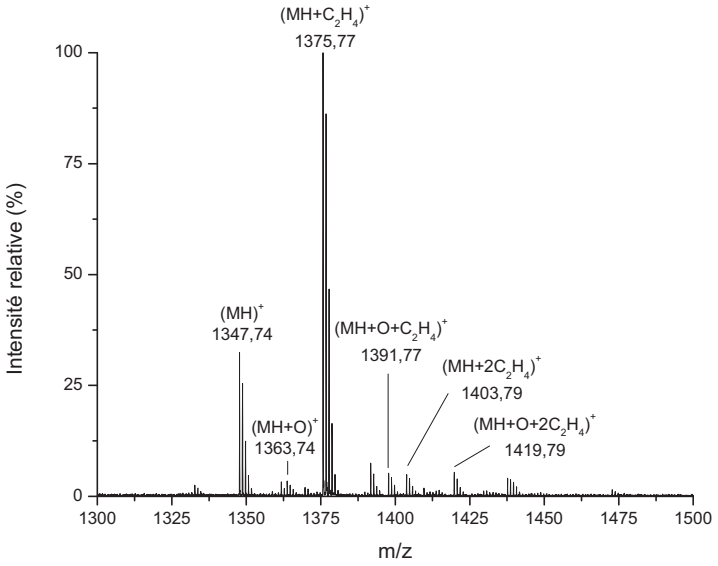


Figure 56 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la SP exposée à 1 eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol

L'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR confirme la présence des adduits C(2)H(4) et C(4)H(8) mais révèle également la présence d'un adduit supplémentaire à une différence de masse de 84,093 Da correspondant au trimère de l'AA C(6)H(12) (figure 57). Les pics majoritaires de ce spectre correspondent à la forme réduite de la SP, c'est-à-dire le peptide ayant perdu le résidu méthionine. Les adduits sont principalement identifiés sur cette forme puisque seul l'adduit C(2)H(4) n'est présent dans le cas de la SP native (tableau 14).

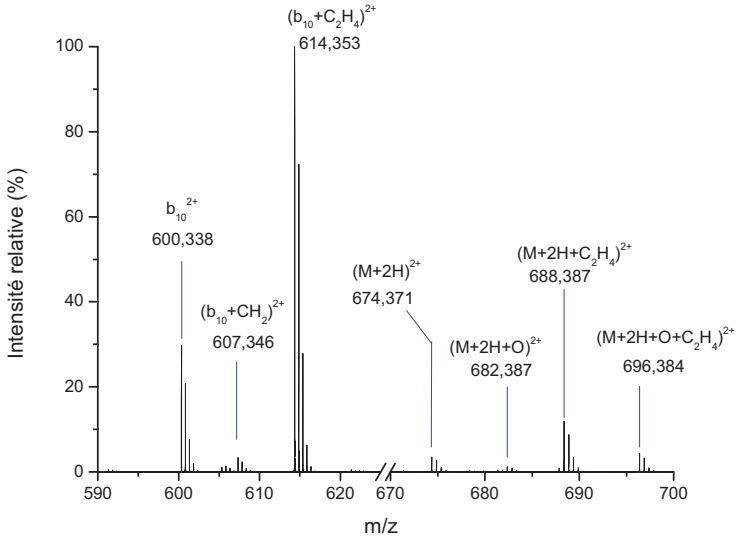


Figure 57 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la substance P exposée à 1 eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$. Injection de 1 pmol.

m/z	mexp (Da)	mth (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
600,3383	1198,661	1198,661	0	-0,1	
607,3463	1212,677	1212,677	14,016	0,2	C(1) H(2)
614,3533	1226,691	1226,692	28,03	-1,2	C(2) H(4)
674,3714	1346,727	1346,728	0	-0,7	
682,369	1362,722	1362,723	15,995	-0,5	O(1)
688,3871	1374,759	1374,759	28,031	-0,7	C(2) H(4)
696,3843	1390,753	1390,754	44,026	-1,0	O(1) + C(2) H(4)

Tableau 14 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour la SP exposée à 1 eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$.

c. L'α-lactalbumine

Suite aux résultats obtenus avec les analyses MALDI-TOF-TOF et nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR des deux peptides, les adduits acétaldéhyde C(2)H(4) et C(4)H(8) ont été ajoutés à la banque de données. Huit modifications ont été identifiées sur les lysines 24, 81, 117, 133 et 141. En raison du nombre de sites réactionnels potentiels, les adduits C(2)H(4) correspondant au monomère de l'AA sont majoritaires même si deux modifications C(4)H(8) ont été identifiées (tableau 15).

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Miss cleavage	Score	Peptide	Modifications
616,824	1231,633	1231,627	5,5	1	20	^{134}LDQWLCEKL^{142}	Carbamidomethyl (C); AA C(2)H(4)
669,349	1336,683	1336,681	2,1	1	50	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C);AA C(2)H(4)
683,363	1364,711	1364,712	-1,4	1	6	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); AA C(4)H(8)
566,663	1696,967	1696,966	0,9	1	53	^{114}ILDKVGINYWLAHK^{127}	AA C(2)H(4)
603,295	1806,862	1806,864	-2,7	1	22	^{128}ALCSEKLDQWLCEK^{133}	2 Carbamidomethyl (C); AA C(2)H(4)
640,99	1919,949	1919,949	0,1	2	67	^{128}ALCSEKLDQWLCEKL^{134}	2 Carbamidomethyl (C); AA C(2)H(4)
650,335	1947,982	1947,980	2,2	2	42	^{128}ALCSEKLDQWLCEKL^{134}	2 Carbamidomethyl (C); AA C(4)H(8)
655,538	2618,123	2618,131	-8,3	1	42	^{78}IWCKDDQNPHSSNICNISCDK^{98}	3 Carbamidomethyl (C);AA C(2)H(4)

Tableau 15 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposée à 1 eq d'AA et réduite au $NaBH_3CN$.

E^{20} QLTKCEVFRE^{30} LKDLKGYGGV^{40} SLPEWVCTTF^{50} HTSGYDTQAI^{60}
VQNNDSTEYG^{70} LFQINNKIWC^{80} KDDQNPHSSN^{90} ICNISCDKFL^{100}
DDDLTDDIMC^{110} VKKILDKVGI^{120} NYWLAHKALC^{130} SEKLDQWLCE^{140} KL

Figure 58 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée à l'AA et réduite au $NaBH_3CN$.

Bootorabi et al. [77] ont développé l'analyse en protéine entière par FT-ICR (4,7 T) de l'anhydrase carbonique II exposée à l'AA et réduite au cyanoborohydrure de sodium. Ils ont montré la présence d'adduits multiples à des incréments de masse successifs de 28 Da. Cependant ils n'ont pas effectué de fragmentation ni d'analyse du digest ne concluant pas s'ils observent des localisations multiples de modifications ou des multimères de l'AA. Dans le cas de notre étude, l'analyse du digest nous permet non seulement d'identifier les adduits formés mais aussi de les localiser avec précision.

3.2 Les aldéhydes conjugués

Les aldéhydes conjugués tels que l'acroléine (ACR) et le crotonaldéhyde (CA) sont des espèces extrêmement réactives caractérisés par leur structure carbonyle α,β-insaturée. Ils proviennent de la combustion de matériels organiques comme les gaz d'échappement de

véhicules, les vapeurs d'huiles de cuisson, les émissions industrielles mais aussi la fumée de cigarette. Ils sont également produits *in vivo* par peroxydation des lipides.

Les aldéhydes conjugués sont connus pour jouer un rôle central dans les maladies induisant un stress oxydatif cellulaire tels que le diabète, les maladies d'Alzheimer et Parkinson, la formation de cancers ou encore l'athérosclérose [80, 81]. En général, la fonction sulfhydrile du résidu cystéine est le groupement nucléophile le plus réactif dans une protéine, ce qui en fait une cible préférentielle pour les aldéhydes [51 , 82]. Il s'avère cependant que les réactions peuvent également avoir lieu sur les résidus lysine, arginine, histidine et N-terminal d'une protéine [80] soit par addition de Michael soit par réaction de base de Schiff. De nombreuses études ont été réalisées sur les modifications induites par ces deux aldéhydes α,β-insaturés. Ainsi, il a été montré qu'en plus de carbonyler les protéines [51, 82-85], ils provoquaient des réticulations de l'ADN inter- et intramoléculaires ainsi que des réticulations de protéines [86]. Par ailleurs, il a été montré que la carbonylation entrainait l'inactivation partielle ou totale de protéines [87 , 88].

3.2.1 L'acroléine

L'acroléine (CH2=CHCHO) est le plus simple des aldéhydes α,β-insaturé. La délocalisation de ses électrons π lui confère une grande réactivité avec les molécules biologiques (figure 59). Il est très toxique, irritant et est considéré comme un polluant environnemental. Il est un composant majeur de la fumée de cigarette avec une concentration de l'ordre de 431 µg/cigarette [89].

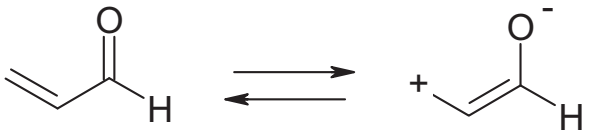


Figure 59 : Formule semi-développée de l'acroléine

a. L'angiotensine I

L'acroléine peut réagir sur des protéines et peptides soit par addition de Michael soit par base de Schiff. L'analyse par MALDI-TOF-TOF de la réaction entre l'angiotensine I et 1 équivalent d'ACR suivi d'une réduction au cyanoborohydrure de sodium révèle la présence de ces deux adduits (figure 60).

Le pic observé à une différence de masse de 42,05 Da correspond à l'adduit de base de Schiff doublement réduit soit C(3)H(6). Cet adduit est très minoritaire par rapport au pic à m/z 1354,7 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -4,0 ppm). Ce dernier est à une différence de masse de 58,05 Da par rapport à l'angiotensine native. Il correspond à l'adduit de Michael C(3)H(6)O(1) dont la fonction aldéhyde a été réduite en alcool. La réduction complète de ces deux adduits a été vérifiée lors de la réduction avec le $NaBD_3CN$. En effet, l'adduit de base de Schiff a été identifié au rapport m/z 1340,72 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 5,9 ppm) correspondant à la formule C(3)H(4)D(2). Quant à l'adduit de Michael, il a été identifié au rapport m/z 1355,73 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,7 ppm) confirmant ainsi la réduction de la fonction aldéhyde. La formule de l'adduit de Michael est alors C(3)H(5)D(1)O(1). Les deux autres pics présents sur le spectre de l'échantillon réduit au $NaBH_3CN$ sont aux rapports m/z 1376,72 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 18,2 ppm) et 1412,77 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 1,9 ppm). Le premier correspond à deux adduits de base de Schiff et le deuxième à deux adduits de Michael. A partir des spectres de fragmentations obtenus sur les deux spectromètres de masse, tous les adduits ont été localisés sur la fonction N-terminale du peptide et non sur les deux histidines présentent dans la séquence de l'angiotensine I. Les travaux de Beretta et al. [84] ont montré que deux adduits de Michael pouvaient se fixer sur la même amine primaire par réactions successives mais pour les adduits de base de Schiff, il semblerait qu'il s'agisse d'une réaction d'aldolisation conduisant à la formation de dimères.

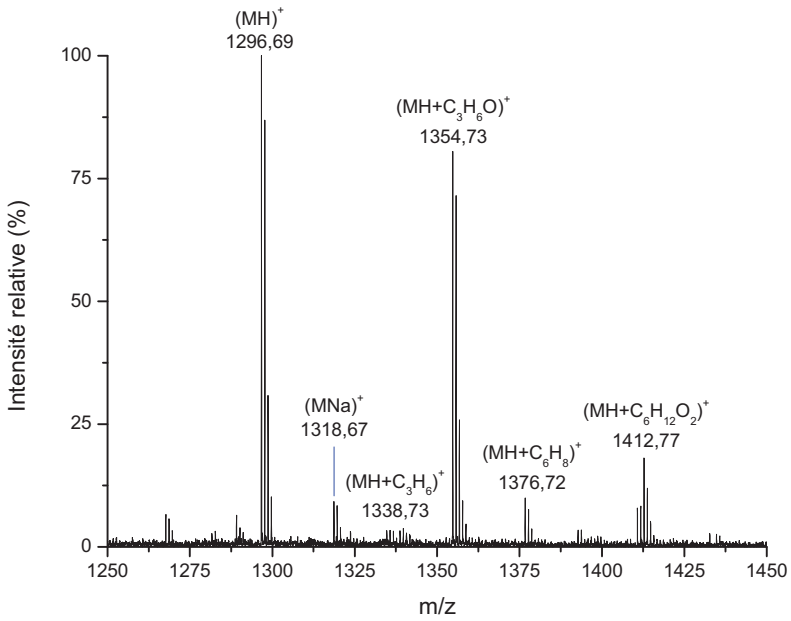


Figure 60 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq d'ACR et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

Les deux réactions principales que nous avons observées entre une amine primaire et l'acroléine à savoir la formation par base de Schiff de l'adduit C(3)H(6) et la formation par addition de Michael de l'adduit C(3)H(6)O(1) sont présentées sur la figure 61.

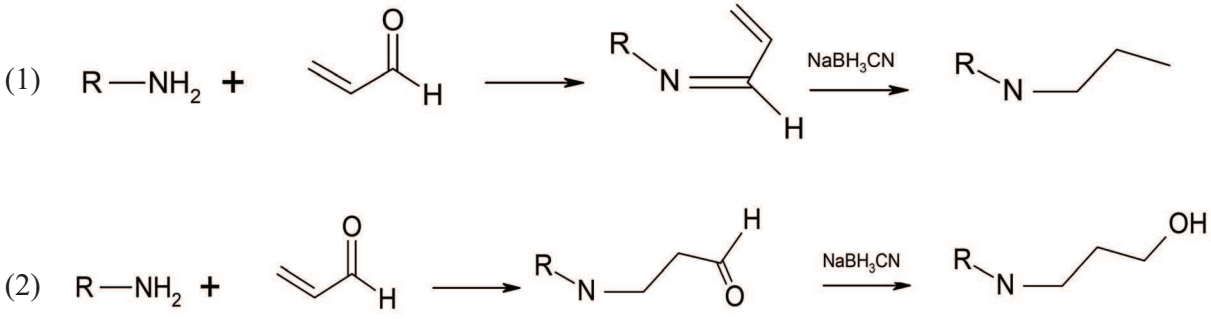


Figure 61 : Réaction entre une amine primaire et l'acroléine. (1) Formation d'une base de Schiff (adduit C(3)H(6)) ; (2) Addition de Michael (adduit C(3)H(6)O(1)).

b. La substance P

Les adduits obtenus lors de la réaction entre la SP et l'acroléine sont plus nombreux et plus intenses que pour l'angiotensine I (figure 62). Le pic majoritaire sur le spectre MALDI-TOF-TOF, après celui de la SP native, est l'adduit de base de Schiff ayant les deux doubles liaisons réduites. Le deuxième pic majoritaire est à une différence de masse de +58,02 Da correspondant à la formule C(3)H(6)O(1). Deux structures sont alors possibles : il peut s'agir de l'adduit de Michael avec la double liaison carbone-carbone réduite ou de l'adduit de base de Schiff ayant réagi sur la forme oxydée du peptide. L'interprétation du spectre de fragmentation permet de conclure sans ambigüité qu'il s'agit de l'adduit de Michael localisé sur la lysine. Dans le cas de la SP, il est intéressant de constater la présence des adduits à m/z 1361,75 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,8 ppm) et 1375,73 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 7,1 ppm) correspondant respectivement aux formules brutes C(1)H(2) et C(2)H(4). Ces deux adduits sont issus de la réaction de rétroaldolisation de l'ACR survenant dans le milieu réactionnel qui conduit à la formation de formaldéhyde et d'acétaldéhyde. On note également la présence du di-adduit de Michael C(6)H(10)O(2) tous deux fixés sur la lysine de la SP.

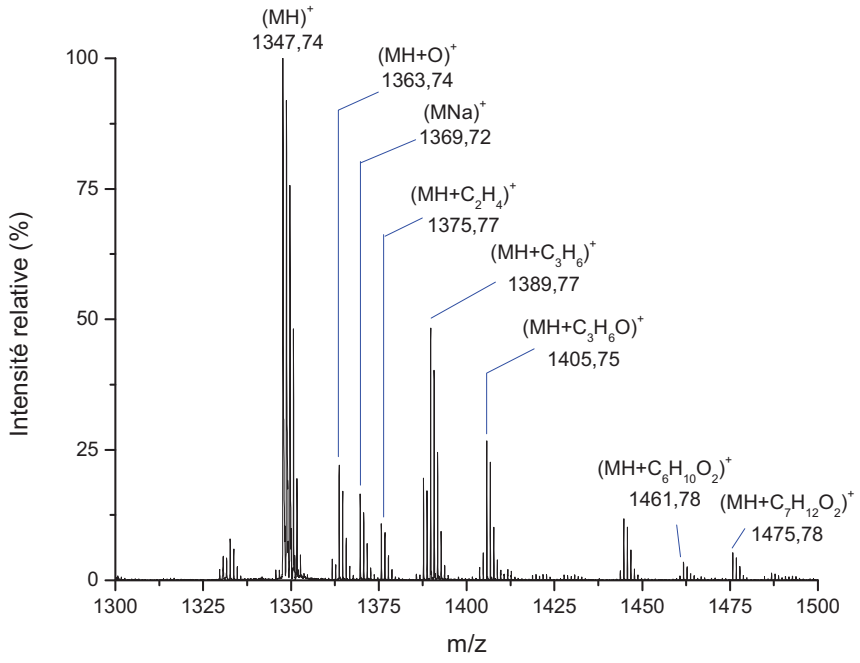


Figure 62 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la SP exposée à 1 eq d'ACR et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

c. L'α-lactalbumine

L'analyse des modifications induites par l'ACR sur les peptides standards nous a permis d'identifier les adduits de bases de Schiff, les adduits de Michael ainsi que les adduits de base de Schiff AA et FA issus de la réaction de rétroaldolisation de l'ACR. Ces identifications nous ont permis de compléter la banque de données MASCOT afin de réaliser les interrogations pour le digest de l'α-LA exposé à un équivalent d'ACR. Quatre adduits ont ainsi pu être identifiés (tableau 16). Il s'agit de trois bases de Schiff : C(1)H(2), C(2)H(4), C(3)H(6) et d'un adduit de Michael C(3)H(6)O(1). La fragmentation MS^2 de ces trois ions a montré que les quatre adduits étaient localisés sur la lysine 24.

Les études de Cai et al [90] ont montré que les additions de Michael se faisaient majoritairement sur les groupes sulfhydrile des résidus cystéine et que la réactivité était décroissante pour la fonction N-terminale puis les résidus histidine et lysine. Dans notre cas, nous avons montré qu'en l'absence de résidu cystéine libre (car toutes liées par des ponts disulfures) la réaction de Michael se faisait sur la lysine 24 et non sur les résidus histidines et la fonction N-terminale. Par ailleurs, Uchida et al [81] ont montré la formation d'un adduit N^{ε}-(3-méthylpyridinium)lysine (FDP-lysine) dans des tissus par l'utilisation d'un anticorps anti-FDP-lysine. Par réaction avec seulement un équivalent d'acroléine, cet adduit n'a pas été détecté.

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	$(\Delta m/m)\times 10^6$ (ppm)	Miss cleavage	Score	Peptide	Modifications
684,353	1366,691	1366,692	-0,5	1	53	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); ACR C(3)H(6)O(1)
676,357	1350,700	1350,697	-2,55	1		^{20}EQLTKCEVFR^{30}	Carbamidomethyl (C); ACR C(3)H(6)
441,896	1322,666	1322,665	0,6	1	21	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); FA C(1)H(2)
446,568	1336,681	1336,681	0,2	1	13	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); AA C(2)H(4)

Tableau 16 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposée à 1 eq d'ACR et réduite au $NaBH_3CN$.

E^{20} QLTKCEVFRE^{30} LKDLKGYGGV^{40} SLPEWVCTTF^{50} HTSGYDTQAI^{60}
VQNNDSTEYG^{70} LFQINNKIWC^{80} KDDQNPHSSN^{90} ICNISCDKFL^{100}
DDDLTDDIMC^{110} VKKILDKVGI^{120} NYWLAHKALC^{130} SEKLDQWLCE^{140} KL

Figure 63 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée à 1 eq d'ACR et réduite au $NaBH_3CN$.

3.2.2 Le crotonaldéhyde

Le crotonaldéhyde (CA) (figure 64), comme l'acroléine, est un aldéhyde α,β-insaturé produit par combustion de matières organiques et est également un polluant environnemental. Présent dans la fumée de cigarette à une concentration moindre que l'ACR (comprise entre 1,3 et 33,3 µg/cigarette) [91], il présente une haute toxicité pour les voies respiratoires, les yeux ou encore la peau [92]. Par sa capacité à modifier les biomolécules de manière covalente, il est considéré comme responsable du stress oxydatif pouvant conduire à l'apoptose.

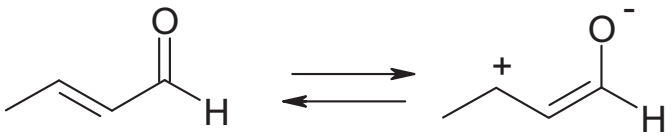


Figure 64 : Formule semi-développée du crotonaldéhyde.

a. L'angiotensine I

Comme pour l'acroléine, le crotonaldéhyde peut réagir sur les biomolécules par base de Schiff et par addition de Michael. Les analyses réalisées sur l'angiotensine I après exposition à un équivalent de CA et réduction au cyanoborohydrure de sodium ont montré la présence de ces deux adduits sur les spectres MS MALDI-TOF-TOF et nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. Le spectre MALDI-TOF-TOF révèle que l'adduit de base de Schiff C(4)H(8) au rapport m/z 1352,73 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 13,0 ppm) est dans ce cas majoritaire par rapport à l'adduit de Michael C(4)H(8)O(1) au m/z 1368,74 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 2,1 ppm) (figure 65). Il faut noter par ailleurs que pour l'adduit de base de Schiff, la fonction imine ainsi que la double liaison Carbone-Carbone ont été réduites. De même, la fonction aldéhyde de l'adduit de Michael a été réduite en alcool. Ces réductions ont été confirmées lors de l'analyse de l'échantillon réduit au $NaBD_3CN$. En effet, les ions ont été identifiés aux rapports m/z 1354,75 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 11 ppm) et 1369,74 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -19,4 ppm) correspondant aux adduits C(4)H(6)D(2) et C(4)H(7)D(1)O(1). L'interprétation des spectres MS^2 présentés en annexe 3 localise les modifications sur la fonction N-terminale du peptide. L'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR permet d'identifier un adduit supplémentaire correspondant au di-adduit de Michael C(8)H(16)O(2) (tableau 17).

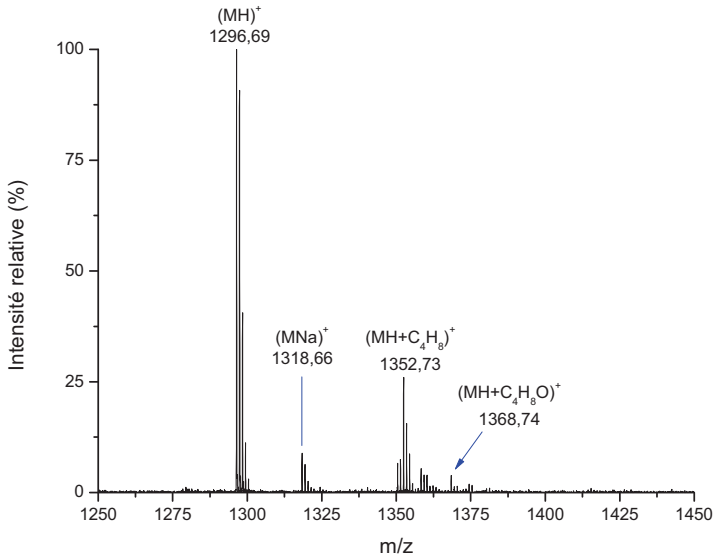


Figure 65 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq de CA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
432,900	1295,676	1295,677	0	-1,2	
451,587	1351,737	1351,740	56,061	-2,3	C(4) H(8)
456,909	1367,703	1367,699	72,027	3,1	C(4) H(8) O(1)
480,938	1439,790	1439,793	144,114	-1,6	C(8) H(16) O(2)

Tableau 17 : Modifications identifiées par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour l'angiotensine I exposée à 1 eq de CA et réduite au NaBH3CN.

Les deux réactions principales que nous avons observées entre une amine primaire et le crotonaldéhyde à savoir la formation par base de Schiff de l'adduit C(4)H(8) et la formation par addition de Michael de l'adduit C(4)H(8)O(1) sont présentées sur la figure 66.

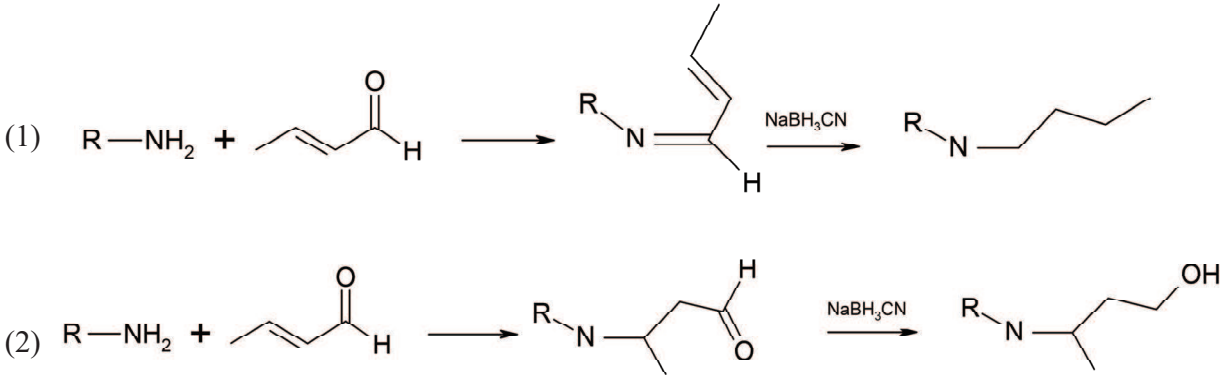


Figure 66 : Réaction entre une amine primaire et le crotonaldéhyde. (1) Formation d'une base de Schiff (adduit C(4)H(8)) ; (2) Addition de Michael (adduit C(4)H(8)O(1)).

b. La substance P

En plus des adduits de base de Schiff à m/z 1403,78 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 11,8 ppm) (majoritaire) et de Michael à m/z 1419,77 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -10,5 ppm), les adduits C(1)H(2) et C(2)H(4) ont pu être identifiés (figure 67). Leur faible intensité sur le spectre induit une mauvaise résolution du massif isotopique conduisant à une erreur de 30 ppm. Cependant, la présence de ces deux ions implique une réaction de rétroaldolisation du CA en solution.

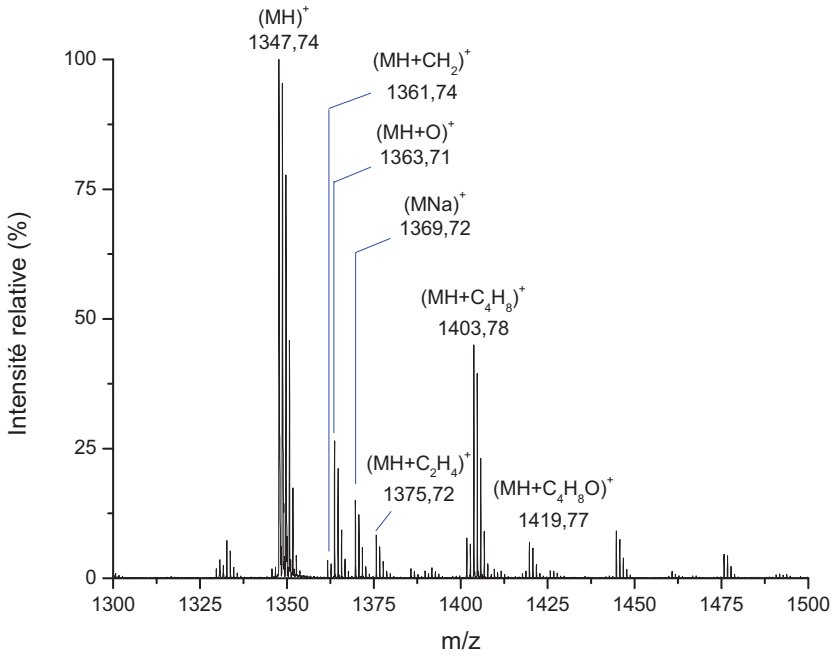


Figure 67 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la SP exposée à 1 eq de CA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

c. L'α-lactalbumine

L'analyse des modifications induites par un équivalent de CA sur l'α-LA n'a conduit à aucune identification d'adduit de Michael. En revanche, trois bases de Schiff ont été identifiées et localisées. Une sur la lysine 24 et deux sur la lysine 141. La deuxième modification de la

lysine 141 (tableau 18 ligne 3) identifiée via MASCOT laisse néanmoins une interrogation. En effet, la trypsine a la caractéristique de couper les peptides après les acides aminés basiques, soit après les arginines et les lysines. Cependant, une fois modifiée par un adduit, la lysine perd ce caractère basique ce qui empêche la coupure peptidique. D'ailleurs, il a été montré précédemment que chaque modification de lysines conduisait systématiquement à un clivage manqué. Le peptide en question a la séquence suivante : ^{128}ALCSEKLDQWLCEK^{133}. On peut constater qu'il possède une autre lysine (K133). L'interprétation du spectre de fragmentation ne permet pas de conclure quelle lysine est modifiée, mais la présence du clivage manqué laisse fortement penser que c'est la lysine 133 qui a été modifié. Comme pour l'ACR, une réaction de rétroaldolisation se produit dans le milieu réactionnel conduisant à la formation de nombreux adduits C(1)H(2) et C(2)H(4). On note finalement que dans le cas de la réaction entre l'α-LA et le CA, de nouvelles lysines ont été modifiées telles que K81, K117 et K133.

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Miss cleavage	Score	Peptide	Modifications
630,839	1259,662	1259,658	4,0	1	18	^{134}LDQWLCEKL^{142}	Carbamidomethyl (C); CA C(4)H(8)
455,912	1364,713	1364,712	0,7	1	23	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); CA C(4)H(8)
612,641	1834,899	1834,896	4,1	1	16	^{128}ALCSEKLDQWLCEK^{141}	2 Carbamidomethyl (C); CA C(4)H(8)
662,341	1322,667	1322,665	2,0	1	40	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); FA C(1)H(2)
446,568	1336,681	1336,681	-0,3	1	25	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); AA C(2)H(4)
566,662	1696,964	1696,966	-2,3	1	50	^{114}ILDKVGINYWLAHK^{127}	AA C(2)H(4)
652,035	2604,109	2604,116	-6,6	1	33	^{78}IWCKDDQNPHSSNICNISCDK^{98}	3 Carbamidomethyl (C); FA C(1)H(2)
636,319	1905,935	1905,933	2,6	2	11	^{128}ALCSEKLDQWLCEKL^{134}	2 Carbamidomethyl (C); FA C(1)H(2)

Tableau 18 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposée à 1 eq de CA.

E^{20} QLTKCEVFRE^{30} LKDLKGYGGV^{40} SLPEWVCTTF^{50} HTSGYDTQAI^{60}
VQNNDSTEYG^{70} LFQINNKIWC^{80} KDDQNPHSSN^{90} ICNISCDKFL^{100}
DDDLTDDIMC^{110} VKKILDKVGI^{120} NYWLAHKALC^{130} SEKLDQWLCE^{140} KL

Figure 68 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée à 1 eq de CA et réduite au $NaBH_3CN$.

3.3 Les dialdéhydes

3.3.1 Le malonaldéhyde

Le malonaldéhyde (MDA) est le plus abondant des aldéhydes issus de la peroxydation lipidique. Ses précurseurs sont principalement l'acide arachidonique (20 : 4) et l'acide docosahexaénoïque (22 : 6) [43]. Dans certains tissus, le MDA peut également être formé par des processus enzymatiques comme par exemple par la thromboxane synthetase à partir des prostaglandines (PGH2, PGH3, et PGG2). Par ailleurs, le MDA peut également être généré en faible quantité par combustion du tabac.

Le MDA n'est pas considéré comme étant un composé hautement réactif dans des conditions physiologique. En effet, en solution aqueuse à pH 7,4, le MDA se trouve essentiellement sous forme d'énol stabilisé par un système de liaisons π conjuguées (figure 69). Cette délocalisation permet alors à la molécule de réagir soit par base de Schiff soit par addition de Michael de type 1,4 comme les autres aldéhydes α,β-insaturés tels que l'acroléine ou le crotonaldéhyde. De nombreuses études ont été réalisées sur la réactivité du MDA sur les biomolécules. Comme les autres aldéhydes, il peut réagir avec l'ADN, les lipides ou les protéines induisant ainsi des adduits, des réticulations et des dimérisations [93, 94]. Il peut également diminuer voire inhiber les activités enzymatiques [95]. D'un point de vue clinique, la réaction entre le MDA et les protéines est mis en évidence dans l'athérosclérose.



Figure 69 : Formule semi-développée du MDA

Dans le cadre de notre étude sur l'impact des aldéhydes sur des protéines, nous avons entrepris l'analyse par spectrométrie de masse des modifications induites par le malonaldéhyde sur les trois standards peptidique et protéique.

a. L'angiotensine I

L'analyse par MALDI-OF-TOF de la réaction entre l'angiotensine I et le MDA a mis en évidence l'adduit de base de Schiff C(3)H(6)O(1) au rapport m/z 1354,72 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -2,9) (figure 70). La masse de cet adduit implique à la fois la réduction de la fonction imine mais aussi de la fonction aldéhyde. Cela a pu être confirmé lors de la réduction au $NaBD_3CN$ puisque l'adduit de base de Schiff a été identifié au rapport m/z 1356,73 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 4,7 ppm). Cet adduit est à une différence de masse de 2,01 Da par rapport à la base de Schiff réduite au $NaBH_3CN$. Cela correspond alors à la formule C(3)H(4)D(2)O(1). La fragmentation de l'ion possédant l'adduit de base de Schiff et réduit au $NaBH_3CN$ (m/z 1354,72) a permis de localiser la modification sur la fonction N-terminale du peptide. Par ailleurs le spectre MS permet d'identifier l'adduit C(2)H(4) au rapport m/z 1324,72 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,9 ppm).

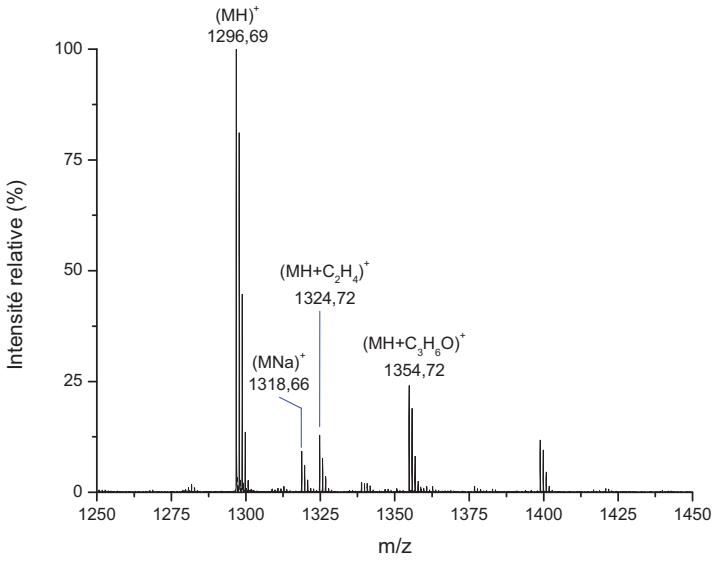


Figure 70 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq de MDA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

L'analyse en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR permet d'obtenir de plus amples informations quant à la réaction. En effet, sur le spectre sont identifiés l'adduit de base de Schiff au rapport m/z 452,247 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -1,1 ppm) mais aussi l'adduit de Michael C(3)H(6)O(2) au rapport m/z 456,909 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -3,4 ppm) (tableau 19). D'après les intensités, l'adduit de base de

Schiff est largement majoritaire par rapport à l'adduit de Michael ($6{,}00^E6$ contre $5{,}00^E4$). Cela peut s'expliquer par la délocalisation du système α,β insaturé défavorisant une addition de Michael (tableau 19).

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
432,900	1295,676	1295,677	0	-1,2	
452,247	1353,718	1353,719	58,042	-1,1	C(3) H(6) O(1)
456,909	1367,703	1367,699	72,027	3,4	C(3) H(4) O(2)

Tableau 19 : Modifications identifiées par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour l'angiotensine I exposée à 1 eq de MDA et réduite au $NaBH_3CN$.

La réaction principale que nous avons observée entre une amine primaire et le MDA est la réaction de base de Schiff. Cette réaction qui entraine la formation de l'adduit C(3)H(6)O(1) est présentée sur la figure 71.

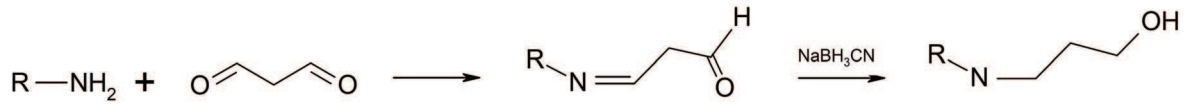


Figure 71 : Réaction entre une amine primaire et le MDA. Formation de l'adduit C(3)H(6)O(1) par réaction de base de Schiff.

b. La substance P

Comme pour l'angiotensine I, l'analyse par MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée au MDA a permis d'identifier uniquement l'adduit de base de Schiff C(3)H(6)O(1) au rapport m/z 1405,76 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 13,8 ppm) mais pas l'adduit de Michael (figure 72). Sur ce spectre, nous observons également la présence de l'adduit C(2)H(4) obtenu par réaction de rétroaldolisation du MDA. La fragmentation de l'adduit de base de Schiff a conduit à la localisation de la modification sur le résidu lysine de la SP.

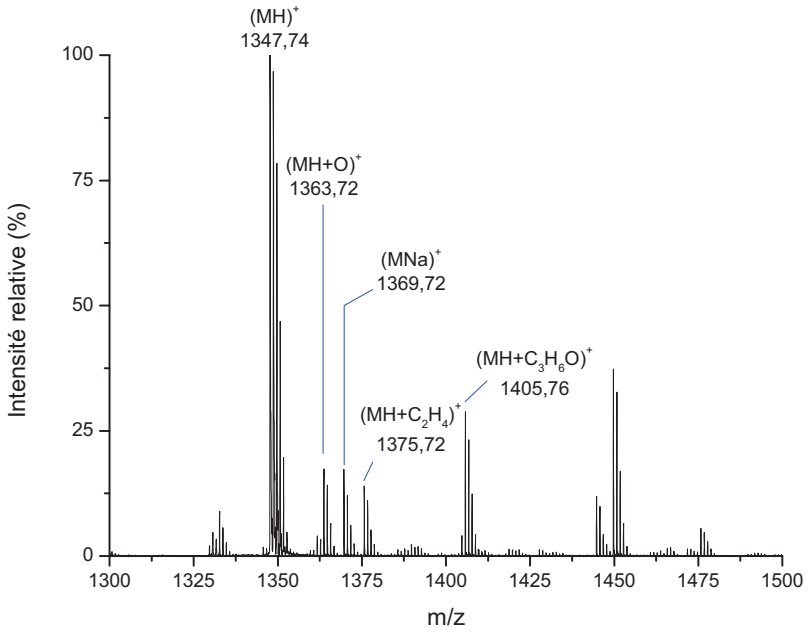


Figure 72 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la SP exposée à 1 eq de MDA et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

c. L'α-lactalbumine

L'analyse des modifications induites par le MDA sur les peptides nous a permis de mettre en évidence le fait que la réaction de base de Schiff était largement majoritaire par rapport à l'addition de Michael. Néanmoins, afin de compléter au mieux les banques de données, nous avons introduit les deux modifications possibles : l'adduit de base de Schiff de composition C(3)H(6)O(1) et l'adduit de Michael de composition C(3)H(4)O(2). L'analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest d'α-LA exposée au MDA a conduit à l'identification de huit adduits (tableau 20). Deux d'entre eux correspondent aux bases de Schiff formées sur les lysines 117 et 133. Un troisième adduit localisé sur la lysine 24 correspond au dimère du MDA C(6)H(12)O(2). Les cinq autres adduits sont issus de la réaction de rétroaldolisation du MDA en solution impliquant la formation de bases de Schiff C(1)H(2) et C(2)H(4). Ces adduits sont localisés sur les lysines 24, 117, 133 et 141. Enfin, il est intéressant de noter qu'aucune addition de Michael n'a été identifiée lors de cette analyse. Ce résultat confirme une plus grande réactivité du MDA à pH physiologique par base de Schiff sur les protéines.

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Miss cleavage	Score	Peptide	Modifications
475,918	1424,732	1424,733	-1,2	1	10	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); MDA C(6)H(12)O(2)
613,300	1836,878	1836,875	-1,5	1		^{128}ALCSEKLDQWLCEK^{141}	2 Carbamidomethyl (C); MDA C(3)H(6)O(1)
576,666	1726,976	1726,977	-0,6	1	16	^{114}ILDKVGINYWLAHK^{127}	MDA C(3)H(6)O(1)
609,815	1217,616	1217,611	4,5	1	38	^{134}LDQWLCEKL^{142}	Carbamidomethyl (C); FA C(1)H(2)
662,341	1322,667	1322,665	1,8	1	47	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); FA C(1)H(2)
446,568	1336,681	1336,681	0	1	20	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); FA C(1)H(2)
566,662	1696,965	1696,966	-1,3	1	20	^{114}ILDKVGINYWLAHK^{127}	AA C(2)H(4)
636,318	1905,933	1905,933	0,6	2	21	^{128}ALCSEKLDQWLCEKL^{134}	2 Carbamidomethyl (C); FA C(1)H(2)

Tableau 20 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposée à 1 eq de MDA.

E^{20} QLTKCEVFRE^{30} LKDLKGYGGV^{40} SLPEWVCTTF^{50} HTSGYDTQAI^{60}
VQNNDSTEYG^{70} LFQINNKIWC^{80} KDDQNPHSSN^{90} ICNISCDKFL^{100}
DDDLTDDIMC^{110} VKKILDKVGI^{120} NYWLAHKALC^{130} SEKLDQWLCE^{140} KL

Figure 73 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée à 1 eq de MDA et réduite au $NaBH_3CN$.

3.3.2 Le glyoxal

Le glyoxal (GO) est principalement formé par dégradation oxydative du glucose mais il peut également être formé après irradiation UV des acides gras poly insaturés, par oxydation de l'acide linolénique ou encore par auto-oxydation de l'acide arachidonique [43]. Comme le MDA, le GO est également un produit issu de la combustion du tabac.

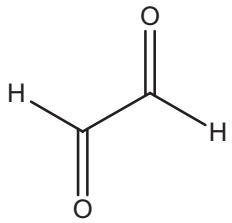


Figure 74 : Formule semi-développée du glyoxal.

De part sa structure (figure 74), le GO ne peut régir avec les biomolécules que par base de Schiff, cependant ces deux fonctions aldéhydes favorisent les réactions de réticulations et de dimérisation inter lysine (GOLD) [96-98]. Même si la réaction se fait majoritairement sur l'acide aminé lysine, l'histidine est également sujette aux modifications par la GO. Cotham *et al* [99] ont ainsi montré que la réaction entre l'histidine et le GO conduisait à la formation d'adduits N^{ε}-(carboxymethyl)arginine, dihydroxyimidazolidines et hydroimidazolones.

La dernière série d'expériences concernant les aldéhydes a donc été réalisée par réaction entre un équivalent de glyoxal et les différents standards peptidiques et protéiques. Ces derniers ont ensuite été réduits au cyanoborohydrure de sodium en milieu acide. Les résultats obtenus sont présentés ci-après.

a. L'angiotensine I

Le spectre MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée au GO présente un adduit unique au rapport m/z 1340,71 ($(\Delta m/m)\times 10^6$ = 1,3 ppm) (figure 75). Il correspond à l'adduit de base de Schiff C(2)H(4)O(1). Cet adduit implique la réduction de la fonction imine de base de Schiff ainsi que la fonction aldéhyde du GO.

L'analyse du spectre MS de l'échantillon réduit au $NaBD_3CN$ montre la présence d'un ion au rapport m/z 1342,72 ($(\Delta m/m)\times 10^6$ = 3,1 ppm). La différence de masse de 2,01 Da par rapport à l'ion de l'échantillon réduit au $NaBH_3CN$ confirme la réduction des deux fonctions. La formule de l'adduit est alors C(2)H(2)D(2)O(1).

Les renseignements obtenus sur le spectre de fragmentation pour l'échantillon réduit au $NaBH_3CN$ permettent de localiser l'adduit sur la fonction N-terminale du peptide.

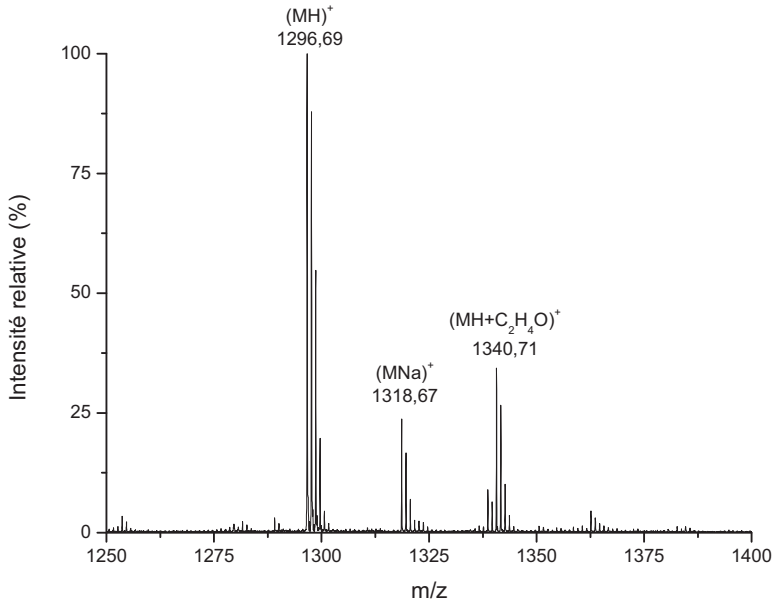


Figure 75 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq de GO et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

La réaction principale que nous avons observée entre une amine primaire et le GO est la formation d'une base de Schiff. Cette réaction qui entraine la formation de l'adduit C(2)H(4)O(1) est présentée sur la figure 76.

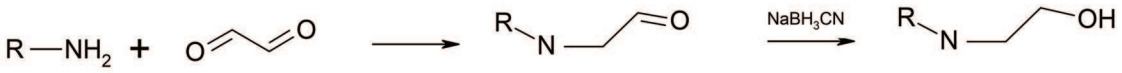


Figure 76 : Réaction entre une amine primaire et le glyoxal. Formation de l'adduit C(2)H(4)O(1) par réaction de base de Schiff.

L'analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR réalisée sur cet échantillon nous donne des informations supplémentaires sur la réaction qui a eu lieu (tableau 21). En effet, alors que l'analyse MALDI-TOF-TOF permettait d'identifier un adduit unique à une différence de masse de 44,02 Da, l'analyse effectuée en couplage nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR met en évidence la présence de quatre adduits.

Les deux premiers pics aux rapports m/z 437,572 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,9 ppm) et 442,244 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,2 ppm) correspondent respectivement aux adduits C(1)H(2) et C(2)H(4). Ces deux adduits montrent de nouveau qu'une réaction de rétroaldolisation a eu lieu dans le milieu réactionnel. Le pic au rapport m/z 447,575 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -1,0 ppm) est associé au peptide ayant formé une base de Schiff avec le GO. Le dernier pic identifié est au rapport m/z 452,235 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -1,1 ppm). La différence de masse calculée entre le peptide natif et cet ion est de 58,006 Da. Elle coïncide avec la formule C(2)H(2)O(2). En se basant sur la littérature [99], nous avons pu identifier cet adduit comme étant le N^{ε}-(carboxymethyl)arginine (CMA) (figure 77). Il s'agit de la réaction entre le résidu arginine et le GO. D'après le spectre de fragmentation, la réaction s'est produite sur la première histidine du coté N-terminal (H6).

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	adduit
432,900	1295,676	1295,676	0	0	
437,572	1309,692	1309,692	14,016	-0,3	C(1) H(2)
442,244	1323,709	1323,707	28,033	-1,0	C(2) H(4)
447,575	1339,702	1339,702	44,027	-0,2	C(2) H(4) O(1)
452,235	1353,682	1353,681	58,006	-0,1	C(2) H(2) O(2)

Tableau 21 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour l'angiotensine I exposée à 1 eq de GO et réduite au $NaBH_3CN$

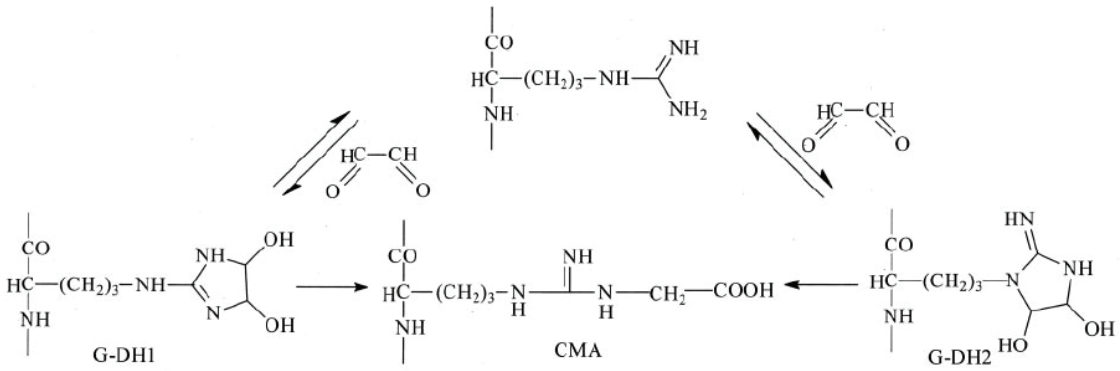


Figure 77 : Mécanisme réactionnel entre le glyoxal et le résidu arginine [99]

b. La substance P

La substance P étant présente sous sa forme native (m/z 1347,74 avec $((\Delta m/m)\times 10^6 = 0,0$ ppm) et oxydée (m/z 1363,74 avec $(\Delta m/m)\times 10^6 = -4,3$ ppm), nous observons une nouvelle fois deux adduits sur le spectre de masse MALDI-TOF-TOF (figure 78).

Le premier adduit est au rapport m/z 1391,76 ($(\Delta m/m)\times 10^6 = 4,4$ ppm), il correspond à l'adduit de base de Schiff C(2)H(4)O(1) formé sur le peptide natif. La fragmentation de cet ion permet de localiser la modification sur le résidu lysine. Le deuxième pic identifié est au rapport m/z 1407,76 ($(\Delta m/m)\times 10^6 = -2,1$ ppm). Il correspond à un adduit de formule C(2)H(4)O(2). L'interprétation du spectre MS^2 permet de confirmer la réaction de base de Schiff sur le peptide oxydé puisque les fragments obtenus localisent l'oxydation sur la méthionine tandis que l'adduit de base de Schiff C(2)H(4)O(1) est localisé sur la lysine.

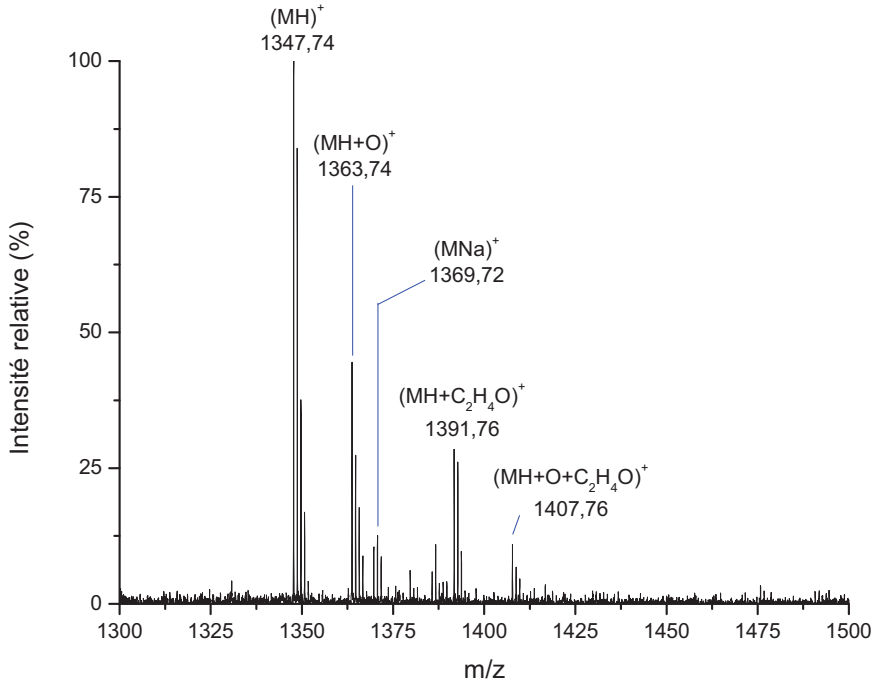


Figure 78 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée à 1 eq de GO et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

c. L'α-lactalbumine

La réaction entre le glyoxal et les deux peptides standards a permis de mettre en évidence que la formation de quatre adduits était possible : les adduits C(1)H(2) et C(2)H(4) provenant de la réaction de rétroaldolisation du GO dans le milieu réactionnel, l'adduit C(2)H(4)O(1) provenant de la réaction de base de Schiff sur la lysine ou la fonction N-terminale, et l'adduit C(2)H(4)O(2) provenant de la réaction entre un résidu histidine et le GO. Nous avons ainsi réalisé les interrogations des banques de données pour le digest d'α-LA exposé au GO en incluant ces quatre modifications.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 22. Trois modifications ont pu être identifiées. Les deux premiers adduits identifiés correspondent à ceux issus de la réaction de rétroaldolisation du GO : C(1)H(2) et C(2)H(4), tous deux sont localisés sur la lysine 24 de l'α-LA. Le troisième adduit identifié est une base de Schiff C(2)H(4)O(1) située également sur la lysine 24 de la protéine.

m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Miss cleavage	Score	Peptide	Modifications
662,339	1322,664	1322,665	-1,3	1	43	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); FA C(1)H(2)
441,896	1322,665	1322,665	-0,5	1	3	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); FA C(1)H(2)
669,329	1336,644	1336,681	2,7	1	43	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); AA C(2)H(4)
677,344	1352,674	1352,676	-1,6	1	65	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); GO C(2)H(4)O(1)

Tableau 22 : Modifications observées en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposé à 1 eq de GO et réduit au $NaBH_3CN$

E^{20} QLTKCEVFRE^{30} LKDLKGYGGV^{40} SLPEWVCTTF^{50} HTSGYDTQAI^{60}
VQNNDSTEYG^{70} LFQINNKIWC^{80} KDDQNPHSSN^{90} ICNISCDKFL^{100}
DDDLTDDIMC^{110} VKKILDKVGI^{120} NYWLAHKALC^{130} SEKLDQWLCE^{140} KL

Figure 79 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée à 1 eq de CA et réduite au $NaBH_3CN$.

Ainsi,

Nous avons réalisé les analyses par spectrométrie de masse haute résolution des modifications induites par six aldéhydes tous présents dans la fumée de cigarette. Nous avons ainsi pu identifier, localiser et comprendre le mécanisme réactionnel de nombreux adduits issus des différents composés étudiés.

4. CONCLUSION

Ce chapitre avait pour objectif de développer des modèles de réactions *in-vitro* sur trois peptides et protéines standards. Les composés modèles ont été choisis d'une part par leur présence dans la phase gazeuse de la fumée de cigarette et d'autre part par leur forte réactivité avec des biomolécules. L'enjeu était d'identifier et de localiser les modifications induites par ces composés en utilisant la spectrométrie de masse haute résolution.

Les modèles de réactions basés sur les espèces radicalaires hydroxyle et nitroxyl ont permis de mettre en évidence les adduits formés ainsi que le site réactionnel. Ainsi pour l'angiotensine I, il a été démontré que des mono-oxydations se produisaient sur les résidus tyrosine et histidine du peptide. Concernant la substance P, seule la méthionine est un site potentiel à l'oxydation et une di-oxydation du soufre a pu être mise en évidence. Les expériences d'oxydation réalisées sur l'α-lactalbumine ont permis d'identifier quatre sites oxydés à savoir les histidines 87 et 126, la méthionine 108 et le tryptophane 123.

La réaction de nitration se produit exclusivement sur le résidu tyrosine aussi aucune modification n'est possible sur le peptide substance P. Les résultats obtenus avec l'angiotensine I ont révélé des réactions de mono- et di-nitration du cycle aromatique sur les positions 2 et 4. La présence d'un adduit N(1)O(3) a été expliquée par une réaction d'oxydation en plus d'une réaction de nitration. L'analyse du digest protéique de l' α-lactalbumine a montré une unique nitration sur la tyrosine 122. Par ailleurs, l'analyse en protéine entière a révélé la présence de scissions des chaines latérales des acides aminés. Le mécanisme de nitration de biomolécules est connu et maintes fois référencé dans la littérature [64, 65, 100, 101], néanmoins, notre approche

a permis d'une part d'identifier des modifications avec des erreurs ne dépassant pas 2 ppm et d'autre part de localiser avec exactitude les modifications générées sur nos modèles.

Les analyses des réactions développées avec des aldéhydes commerciaux ont montré une grande complexité. En effet, pour chaque aldéhyde nous avons constaté que la réaction de base de Schiff était majoritaire cependant il s'est avéré que des réactions de dimérisation et de rétroaldolisation se produisaient dans le milieu réactionnel entrainant ainsi la formation de multiples adduits. La réduction des échantillons au cyanoborohydrure de sodium deutérié a permis de confirmer la formule des adduits formés par chaque aldéhyde. Elle a permis également de confirmer la réduction des doubles liaisons Carbone-Carbone pour les adduits de base de Schiff formés par l'acroléine et le crotonaldéhyde ; la réduction de la fonction aldéhyde pour les adduits de base de Schiff formés par le malonaldéhyde et le glyoxal et pour les adduits de Michael formés par l'acroléine et le crotonaldéhyde. Enfin, toutes ces expériences nous ont permis de réaliser un inventaire des modifications induites par chaque aldéhyde.

L'avantage majeur d'avoir réalisé les analyses sur les deux spectromètres de masses MALDI-TOF-TOF et nanoESI-Qh-FT-ICR couplé à la nanoLC est la confrontation des résultats. Cela nous a permis de confirmer les compositions chimiques des adduits formés et notamment en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR puisque les écarts de masse entre la masse théorique et la masse expérimentale ne dépassent pas 2 ppm. Mais cela nous a également permis d'obtenir des informations supplémentaires sur la localisation des adduits grâce à l'étude des spectres de fragmentation obtenus avec les deux spectromètres de masse.

CHAPITRE III : APPLICATION A L'ANALYSE DES MODIFICATIONS INDUITES PAR LA FUMEE DE CIGARETTE

Dans cette troisième partie vont être présentées et discutées les analyses réalisées avec la fumée de cigarette et plus particulièrement la phase gazeuse de la fumée de cigarette. Pour cela nous avons travaillé sur les trois standards peptidiques et protéiques présentés précédemment. Nous verrons d'une part comment les modèles de réactions développées dans le chapitre II nous ont permis d'identifier des adduits sans ambiguïté et d'autre part les avantages à travailler avec les techniques de spectrométrie de masse haute résolution.

1. LA FUMEE DE CIGARETTE

La fumée de cigarette est un aérosol complexe composé de plusieurs milliers de substances chimiques réparties entre la phase particulaire et la phase gazeuse. La méthode standard pour séparer ses deux phases est de faire passer la fumée de cigarette à travers un filtre en fibre de verre appelé filtre de Cambridge. Ce filtre a la capacité de retenir plus de 99% des particules dont le diamètre est supérieur à 0,1 µm [35]. La phase particulaire appelée aussi goudron, contient principalement des composés hydrophiles et non volatils incluant l'eau, les alcaloïdes (nicotine), les nitrosamines, les hydrocarbures aromatiques [102] mais aussi des radicaux libres tels que les semiquinones [103]. La phase gazeuse renferme de forte concentrations de gaz inorganique mais aussi d'alcanes, d'alcools, d'aldéhydes saturés et insaturés issus de la combustion du tabac. De plus, c'est une source de radicaux libres organiques oxygénés [104].

L'immense complexité de la fumée de cigarette résulte de différents processus thermolytique qui interviennent lorsque le tabac est chauffé. Dans la suite de cette partie seront présentés les principaux composés issus de la phase gazeuse de la fumée de cigarette et conséquences liées à leur pathogénicité.

1.1 Composition de la phase gazeuse

1.1.1 Les espèces radicalaires

La fumée de cigarette contient une grande quantité de radicaux libres. Ils ont été détectés pour la première fois en 1958 par Lyons *et al* en utilisant la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) [105]. Mais c'est seulement en 1983 que les premiers radicaux libres ont été caractérisés par l'équipe du professeur William A Pryor [106]. Les radicaux libres (RL) de la fumée de cigarette peuvent être classifiés en deux catégories :

- Les RL primaires qui sont formés lors de la combustion du tabac et du processus du fumage ;

- Les RL secondaires qui ne sont pas initialement présents dans la fumée mais qui sont générés après réactions avec d'autres constituants de la fumée de cigarette.

L'un des RL les plus abondants de la phase gazeuse de la fumée de cigarette et formé lors de la combustion du tabac est le radical nitrosyle ($NO^{\bullet}$). Bien qu'il soit peu réactif, il se combine lentement avec des molécules d'oxygène de l'air pour former le radical nitroxyl ($NO_2^{\bullet}$). Ce dernier, très réactif et toxique, réagit rapidement avec d'autres constituants de la fumée de cigarette comme l'isopropène et le butadiène formant ainsi des radicaux C-centrés [104, 106]. Les RL C-centrés sont des espèces extrêmement instables et réagissent généralement avec les molécules d'oxygène pour former des peroxyles et peroxydes. Néanmoins Bartalis *et al* ont pu mettre en évidence des radicaux C-centrés de type $C_nH_{2n-1}O$ et $C_nH_{2n}NO$ [107] incitant ainsi à une réexamination du mécanisme de formation des radicaux C-centrés. Ces identifications ont pu être réalisées grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution couplée à la chromatographie liquide (HPLC-ESI-LTQ-FTICR).

Les espèces réactives de l'oxygène font essentiellement partie de la seconde catégorie des RL. En effet, il a été montré que les radicaux superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et hydroxyle ($HO^{\bullet}$) étaient formés à partir de l'extrait aqueux de la phase particulaire [108, 109]. Le mécanisme fait intervenir l'hydroquinone, molécule présente dans la phase particulaire de la fumée de cigarette.

L'oxydation de l'hydroquinone (QH_2) par une molécule de dioxygène en solution aqueuse génère la semiquinone ($Q^{-\bullet}$) et le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) selon la réaction (1) :

$$QH_2 + O_2 \rightarrow Q^{-\bullet} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \qquad (1)$$

Une dismutation spontanée du radical anion superoxyde, ou catalytique via la SOD (superoxyde dismutase) génère du peroxyde d'hydrogène (réaction 2). En présence de métaux de transition, notamment ceux contenus dans la fumée de cigarette tels que le Fer (II), le peroxyde d'hydrogène conduit à la formation du radical hydroxyle par une réaction de type Fenton [110] (réaction 3).

$$O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 \qquad (2)$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + HO^- + Fe^{3+} \qquad (3)$$

Ainsi, les RNS et ROS présentes dans la fumée de cigarette lui confèrent des propriétés extrêmement réactives vis-à-vis des biomolécules (lipides, protéines…). Par ailleurs, lorsque des RL réagissent avec des non-radicaux, de nouveaux radicaux peuvent être formés résultant en une réaction en chaine de RL. Cela met en exergue l'extrême complexité des processus de chimie radicalaire issus de la fumée de cigarette.

1.1.2 Les espèces carbonylées

La phase gazeuse de la fumée de cigarette comporte d'importantes concentrations en composés carbonylés tels que les aldéhydes. Ils sont formés lors de la combustion du tabac. Leur étude est complexe puisqu'ils sont extrêmement volatils, réactifs et solubles dans l'eau. Aussi, Fujioka *et al* ont développé une méthode par GC-MS après dérivation des aldéhydes afin de les quantifier [89]. Les aldéhydes qu'ils ont étudiés sont répertoriés dans le tableau 23. Les résultats que nous présentons ci-après correspondent au fumage d'une cigarette classique.

Aldéhydes	Formaldéhyde	Acétaldéhyde	Propanal	Acroléine	Malonaldéhyde	Glyoxal	Méthylglyoxal	Diacétyle
Concentration (µg/cigarette)	116 ± 5,00	2040 ± 16,0	167 ± 1,00	431 ± 13,0	28,8 ± 0,60	1,93 ± 0,01	13,4 ± 0,10	433 ±11,0

Tableau 23 : Concentration des composés carbonylés identifiés dans la phase gazeuse de la fumée de cigarette pour du tabac 2R1F [89].

Les aldéhydes majoritaires contenus dans la fumée de cigarette sont donc l'acétaldéhyde, le formaldéhyde et l'acroléine avec une concentration maximale pour l'acétaldéhyde de 2 040 µg/cigarette. Néanmoins, ce travail ne référence pas le crotonaldéhyde qui a pourtant une concentration de 33 µg/cigarette [91]. Cette concentration ne peut pas être négligée si l'on considère la très forte réactivité de cet aldéhyde.

D'autres aldéhydes sont présents dans la phase gazeuse de la fumée de cigarette comme le propionaldéhyde, le benzaldéhyde ou le butyraldéhyde. Mais la phase gazeuse de la fumée de cigarette est également composée d'une grande quantité de cétones et d'acides carboxyliques dont la structure a pu être identifiée par l'utilisation de GC-GC-TOF [111].

Toutes ces espèces carbonylées ont un caractère électrophile qui confère à la fumée de cigarette une très forte réactivité avec des biomolécules.

1.1.3 Autres composants majoritaires

Cette partie n'a pas pour objectif de référencer tous les composants de la phase gazeuse de la fumée de cigarette mais de présenter les plus abondants et réactifs. Ainsi, nous pouvons citer la présence d'alcènes [91]. Bien qu'ils soient moins réactifs que les aldéhydes vis-à-vis des biomolécules, ces espèces réagissent avec les autres constituants de la fumée de cigarette et notamment le radical nitroxyl pour former de nouvelles espèces radicalaires [104].

La phase gazeuse de la fumée de cigarette contient également des gaz inorganiques à des fortes concentrations [112]. Les principaux sont répertoriés dans le tableau 24.

Gaz	CO_2	CO	$NO^{\bullet}$	HCN	COS
Concentration (mg/cigarette)	42,0	11,0	0,31	0,105	0,020

Tableau 24 : Concentration des principaux gaz présents dans la phase gazeuse de la fumée de cigarette d'après les résultats de Parrish *et al* [112]. Valeurs moyennées pour 5 cigarettes.

En raison de sa structure, le monoxyde d'azote est le gaz qui va provoquer le plus de dommages aux niveaux des biomolécules (Cf Chapitre III § 2.1.1). Le cyanure d'hydrogène

(HCN), présent à une moindre concentration peut également réagir au niveau des groupements carbonyles des protéines. Les autres gaz présentés (monoxyde de carbone (CO), dioxyde de carbone (CO_2) et oxysulfure de carbone (COS)) sont connus pour être extrêmement toxiques et irritants pour les voies respiratoires.

1.2 Fumée de cigarette et protéomique

Les composés chimiques que nous avons présentés dans le §2.1 de ce chapitre sont hautement réactifs envers les biomolécules et notamment les protéines. De nombreuses études en protéomique ont été réalisées afin de comprendre d'une part l'impact de la fumée de cigarette sur les protéines et d'autre part d'identifier des marqueurs potentiels du tabagisme.

Le radical nitroxyl est un oxydant fort capable d'engendrer des modifications au niveau des protéines. Des études réalisées sur des plasmas de fumeurs ont révélé la formation d'un résidu 3-nitrotyrosine. Ce résidu issu de la réaction entre l'acide aminé tyrosine et le radical nitroxyl a pu être détecté par différentes techniques analytiques comme par chromatographie liquide à détecteur UV [113] ou encore par des techniques d'immunodétection tel que le western blot [114]. Selon les résultats obtenus par Panda *et al* [115], la phase gazeuse de la fumée de cigarette engendre très peu d'oxydation de protéines. Des mesures par spectrophotométrie des groupements thiols ont montré que la phase gazeuse engendrait peu d'oxydations contrairement à la phase particulaire de la fumée de cigarette. En revanche, l'exposition à la phase gazeuse est la principale cause de la formation de groupements carbonyles. Leur présence a pu être mise en évidence dans différents fluides corporels comme le plasma [61] ou la salive [116]. Panda *et al* ont prouvé que la formation des groupements carbonyles n'était pas issue d'un mécanisme radicalaire [115]. Ces résultats indiquent que ce sont les aldéhydes présents dans la phase gazeuse qui réagissent avec les résidus nucléophiles des protéines. Par analogie avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote (RNS), les aldéhydes sont généralement nommés « espèces réactives carbonylées » *i.e.* RCS (Reactive Carbonyl Species). Des études sur l'impact des RCS de la fumée de cigarette sur des protéines ont été réalisées par

spectrométrie de masse [117]. Ces résultats seront discutés dans la deuxième partie de ce chapitre.

Toutes ces modifications ne sont pas sans conséquence. Ces auteurs expliquent que ces modifications peuvent diminuer voire inhiber les activités des enzymes. *In vivo*, cela peut provoquer des dysfonctionnements cellulaires conduisant à l'apoptose ou à des mécanismes de carcinogénèse. Mais, les ROS, les RNS et les RCS activent également de nombreuses voies de signalisation qui modulent les réponses cellulaires, comme l'inflammation. Cela résulte en la formation d'espèces réactives endogènes conduisant à un stress oxydatif secondaire. Par exemple, les RL réagissent sur les lipides conduisant à la formation de produits de lipoperoxydation [43]. Ces produits sont principalement des aldéhydes α,β-insaturés comme l'acroléine, le malonaldéhyde ou le glyoxal. Or ces espèces peuvent réagir dans un second temps avec les protéines. Cet exemple montre à quel point les dommages oxydatifs liés à l'exposition à la fumée de cigarette sont complexes car ils peuvent être générés de manière directe ou indirecte.

Aussi, il est important de connaître quelles sont les modifications induites directement par la phase gazeuse de la fumée de cigarette sur des protéines isolées. C'est dans ce contexte que nous avons entrepris l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution de trois peptides et protéines standards exposés à la fumée de cigarette.

2. ANALYSE DES ADDUITS ENGENDRES PAR LA FUMEE DE CIGARETTE

2.1 Fumage

Plusieurs techniques de fumage sont référencées dans la littérature. Les plus couramment utilisées sont les machines à fumer commerciales ou les machines dites « faites maison ». Ces dernières sont généralement constituées d'un bulleur associé à une trompe à vide. Dans le cas de notre étude, les expériences de fumage ont été réalisées avec une machine à fumer monocanal LM1 (Borgwaldt kc) (figure 80) à laquelle un bulleur a été adapté (figure 81). Cette machine est constituée d'une seringue fonctionnant à l'air comprimé. Avant chaque utilisation, trois

paramètres doivent être obligatoirement contrôlés afin de s'assurer de la répétabilité des expériences de fumage :

- fuite d'air dans le système,
- volume d'une bouffée (35,0 ± 0,1 mL),
- vitesse de l'air traversant le système (20 ± 1 m/s).

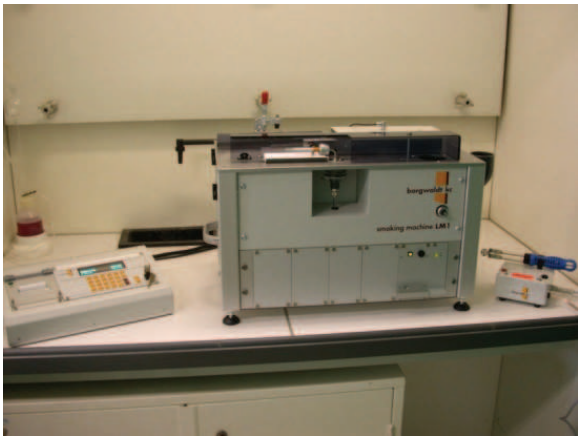


Figure 80 : Machine à fumer LM1 (Borwaldt, kc)

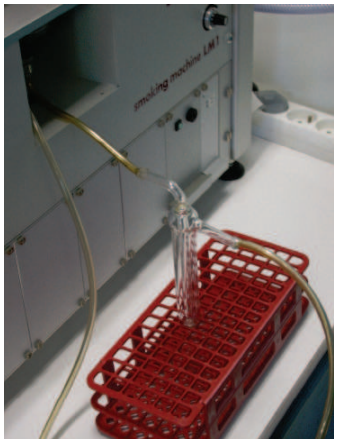


Figure 81 : Adaptation d'un bulleur

Les paramètres de fumage sont d'une bouffée d'un volume de 35 mL et d'une durée de 2 secondes toutes les 58 secondes ce qui correspond à environ 6 bouffées par cigarette. Ces paramètres correspondent à ceux utilisés pour les tests de cigarette et sont censés refléter au mieux la réalité même s'il est évident qu'un fumeur ne fume pas de manière identique tout au long de sa cigarette. Afin de ne récupérer que la phase gazeuse de la fumée de cigarette, un filtre de Cambridge est placé entre la cigarette et le bulleur, ce filtre ayant la capacité de retenir plus de 99% des particules dont le diamètre est supérieur à 0,1 µm. Enfin, une solution contenant la protéine est introduite dans le bulleur afin de réaliser une exposition directe.

Après le fumage, le solution protéique est réduite au cyanoborhydrure de sodium puis est directement analysée par spectrométrie de masse. Deux conditions de fumage ont été réalisées : l'exposition à une bouffée de cigarette et l'exposition à la fumée d'une cigarette entière. Le

fumage d'une cigarette avec la machine à fumer LM1 correspond à environ six bouffées. Dans le cas d'une exposition à une bouffée, la troisième a été sélectionnée.

2.2 Analyse des adduits engendrés par la fumée d'une bouffée de cigarette

2.2.1 L'angiotensine I

a. Analyse MALDI-TOF-TOF

L'analyse de l'angiotensine I exposée à une bouffée de cigarette et réduite au cyanoborohydrure de sodium ainsi qu'avec son équivalent deutérié à été réalisée dans un premier temps sur le spectromètre de masse MALDI-TOF-TOF. Les résultats obtenus sont présentés sur le spectre figure 83 et les tableaux 25 et 26.

A partir de la figure 83, nous pouvons constater que le spectre de masse comporte de nombreux adduits d'intensités relativement faibles. Le pic majoritaire (1) correspond à l'angiotensine I native au rapport m/z 1296,69 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,1 ppm). Le pic (2) est au rapport m/z 1310,69 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 8,0 ppm) ce qui correspond à une différence de masse de 14,01 Da par rapport à l'angiotensine I native. Celle-ci laisse supposer qu'il s'agit de l'adduit C(1)H(2) issu de la réaction de base de Schiff entre le formaldéhyde et l'angiotensine I. La réduction au $NaBD_3CN$ permet de confirmer cette réaction puisque le pic est identifié au rapport m/z 1311,70 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 2,3 ppm) montrant ainsi la réduction de la fonction imine. Le pic (3) se trouve au rapport m/z 1324,71 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 6,0 ppm) dans le cas de la réduction au $NaBH_3CN$ et au rapport m/z 1325,72 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 1,4 ppm) dans le cas de la réduction au $NaBD_3CN$. Cela nous permet de conclure qu'il s'agit de l'adduit C(2)H(4) issu de la réaction entre l'acétaldéhyde et l'angiotensine I.

En appliquant le même raisonnement pour les autres pics, l'identification de quatre adduits aldéhydes supplémentaires a pu être mise en évidence. Aussi, les pics (4), (5) et (9) sont attribués respectivement aux adduits acroléine C(3)H(6), glyoxal C(2)H(4)O(1) et crotonaldéhyde C(4)H(8)O(1). Deux possibilités s'exposent pour le pic (7). Ce pic se trouve au

rapport m/z 1354,73, soit une différence de masse observée entre ce pic et l'angiotensine I de 58,04 Da. Il peut donc s'agir de la base de Schiff formée à partir du MDA ou de l'adduit formé par addition de Michael à partir de l'ACR. Nous avons vu précédemment que ces deux adduits ont des formules chimiques différentes avant la réduction au $NaBH_3CN$. En effet, le MDA forme une base de Schiff de formule C(3)H(2)O(1) avec deux insaturations, tandis que l'addition de Michael de l'ACR conduit à un adduit C(3)H(4)O(1) avec une insaturation. Après la réduction au $NaBH_3CN$, ces deux adduits sont identiques et ont une formule chimique unique correspondant à C(3)H(6)O(1). Cependant, en raison du nombre d'insaturation dans la formule des adduits, la réduction au $NaBD_3CN$ permet de les différencier. Ainsi, la base de Schiff formée par le MDA entraine la formation de l'adduit C(3)H(4)D(2)O(1) avec une masse de 60,05 Da tandis que l'adduit formé par l'addition de Michael de l'ACR entraine la formation d'un adduit C(3)H(5)D(1)O(1) avec une masse de 59,05 Da. Dans le cas de l'analyse de l'échantillon d'angiotensine I exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de cigarette et réduite au $NaBD_3CN$, l'ion est observé au rapport m/z 1355,73 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 1,0 ppm), soit une différence de 59,05 Da. Nous pouvons donc conclure qu'il ne peut s'agir que de l'adduit de Michael issu de la réaction entre le peptide et l'acroléine. Deux autres pics, présents sur le spectre de masse, ont attiré notre attention. Il s'agit des pics 6 et 8. Concernant le pic 6, il se trouve au rapport m/z 1349,71 correspondant à une différence de masse de 53,02 Da. Afin de déterminer la formule de cet adduit, nous avons utilisé le logiciel Molecular Weight (Bruker Daltonics). La littérature ainsi que le calcul d'erreur en ppm ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 4,7 ppm) nous ont permis d'affirmer qu'il s'agissait d'un adduit C(3)H(3)N(1) provenant de l'addition de Michael de l'acrylonitrile (figure 82). Ce composé est en effet présent dans la fumée de cigarette à une concentration de 10 µg/cigarette [118]. Enfin, le pic 8 se trouve à une différence de masse de 61,92 Da par rapport à l'ion moléculaire. Un tel défaut de masse laisse supposer qu'il ne peut s'agir que d'un composé inorganique. Or la fumée de cigarette contient des métaux tels que le cadmium, l'arsenic, le plomb, le zinc mais également du cuivre [119]. En considérant qu'un adduit Cu(1)H(-1) se soit formé, l'erreur calculée est de 3,6 ppm. Ainsi, l'hypothèse d'un adduit cuivre est confirmée.

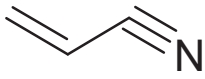


Figure 82 : Formule semi-développée de l'acrylonitrile.

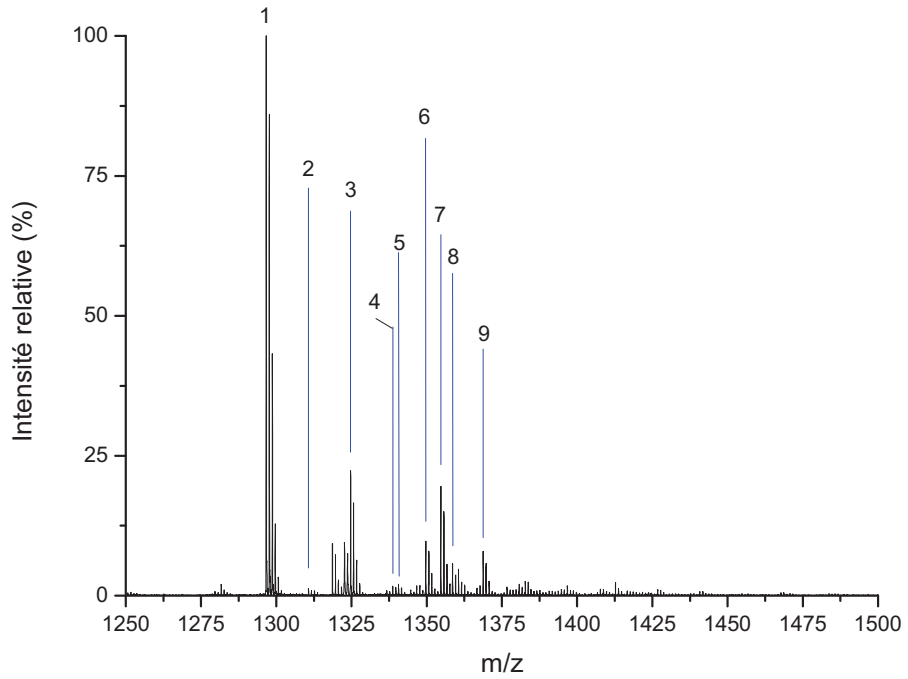


Figure 83 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

pics	$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit	Précurseur
1	1296,68	1296,69	0,00	0,1		
2	1310,69	1310,70	14,01	4,6	C(1) H(2)	FA
3	1324,71	1324,72	28,03	1,7	C(2) H(4)	AA
4	1338,72	1338,73	42,04	6,5	C(3) H(6)	ACR (Schiff)
5	1340,71	1340,71	44,03	-1,0	C(2) H(4) O(1)	GO (Schiff)
6	1349,71	1349,71	53,02	4,7	C(3) H(3) N(1)	Acrylonitrile
7	1354,73	1354,73	58,04	1,2	C(3) H(6) O(1)	ACR (Michael)
8	1358,60	1358,61	61,92	3,6	Cu(1) H(-1)	Cuivre
9	1368,74	1368,74	72,06	1,1	C(4) H(8) O(1)	CA (Michael)

Tableau 25 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée cigarette et réduite au $NaBH_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit	Précurseur
1296,69	1296,69	0,00	-0,1		
1311,70	1311,71	15,02	2,3	C(1) H(1) D(1)	FA
1325,72	1325,72	29,04	1,4	C(2) H(3) D(1)	AA
1340,72	1340,74	44,04	17,2	C(3) H(4) D(2)	ACR Schiff
1349,70	1349,71	53,01	9,9	C(3) H(3) N(1)	Acrylonitrile
1355,73	1355,73	59,05	1,0	C(3) H(3)D (2) O(1)	ACR Michael
1369,74	1369,75	73,06	3,5	C(4) H(7)D (1) O(1)	CA

Tableau 26 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée cigarette et réduite au $NaBD_3CN$.

Dans le but de localiser les modifications, la fragmentation des différents ions présents sur le spectre MS a été réalisée. L'interprétation des spectres de fragmentation a révélé la localisation sur la position N-terminale du peptide de tous les adduits issus de réaction avec les aldéhydes, ce qui est en adéquation avec les réactions modèles. Le spectre MS^2 de l'ion au rapport m/z 1349,71 ($(\Delta m/m)\times 10^6$ = 4,7 ppm) comporte les fragments $(a_3+53)^+$ et $(RVY+53)^+$. Cela laisse supposer que la modification acrylonitrile est localisée sur le résidu arginine.

b. Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR

Afin de confirmer ces premiers résultats, l'analyse de l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au cyanoborohydrure de sodium a été réalisée par nanoESI-Qh-FT-ICR précédé d'un couplage en ligne nanoLC.

Le spectre de masse obtenu (figure 84) présente un pic majoritaire, (1), au rapport m/z 432,900 ($(\Delta m/m)\times 10^6$ = -1,2 ppm). Ce pic correspond à l'ion moléculaire trichargé $(M+3H)^{3+}$. Les autres pics présents sur le spectre de masse, numérotés de 2 à 6 et répertoriés dans le tableau 8, correspondent aux mêmes adduits identifiés précédemment en MALDI-TOF-TOF. Ainsi, cette analyse nous a permis de confirmer les réactions entre cinq aldéhydes présents dans la fumée de cigarette, à savoir : le FA, l'AA, l'ACR, le CA et le GO, et le peptide. En revanche, la modification induite par l'acrylonitrile observée en MALDI-TOF-TOF n'a pas été mise en évidence au cours de cette analyse. Il en est de même pour la réaction de base de Schiff entre l'acroléine et l'angiotensine I. Cependant un ion trichargé supplémentaire a été observé au rapport m/z 476,266. Le précurseur de cet adduit n'a pas été identifié mais la haute précision en masse de l'analyseur FT-ICR a permis d'attribuer une formule chimique. Ainsi, il pourrait s'agir d'un adduit C(7)H(14)O(2). Le calcul de la masse théorique en considérant cette formule donne une erreur de -1,4 ppm. Cela nous permet de certifier la composition de l'adduit formé. Par ailleurs le spectre de fragmentation de cet ion localise la modification sur la fonction N-terminale du peptide. Ce résultat confirme qu'il s'agit d'un adduit unique.

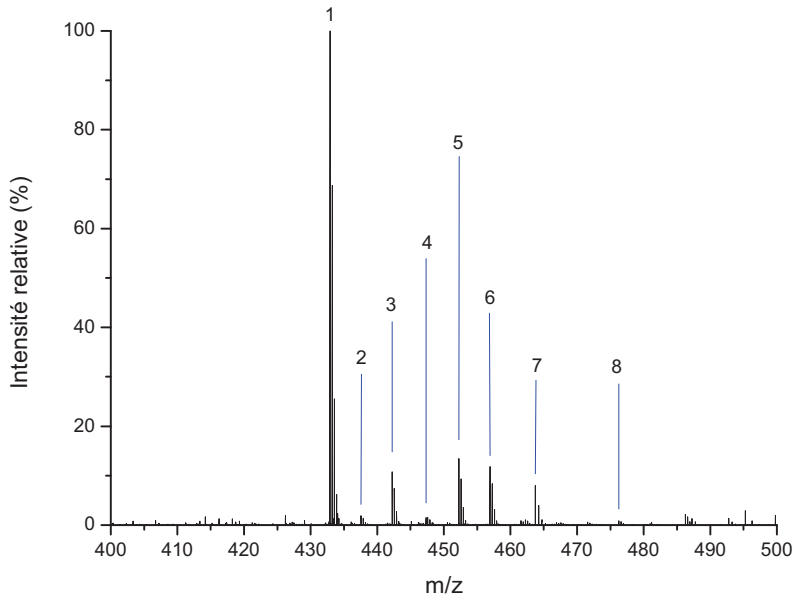


Figure 84 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$.

Pics	m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit	Précurseur
1	432,9	1295,676	1295,677	0	-1,2		
2	437,572	1309,691	1309,693	14,015	-1,4	C(1) H(2)	FA
3	442,244	1323,708	1323,709	28,032	-0,9	C(2) H(4)	AA
4	447,575	1339,701	1339,704	44,025	-2,1	C(2) H(4)O(1)	GO
5	452,247	1353,717	1353,719	58,041	-2	C(3) H(6) O(1)	ACR (Michael)
6	456,919	1367,733	1367,735	72,057	-1,3	C(4) H(8) O(1)	CA (Michael)
7	463,748	925,48				?	
8	476,266	1425,775	1425,777	130,099	-1,4	C(7) H(14) O(2)	Non identifié

Tableau 27 : Adduits identifiés par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$.

Les résultats obtenus avec les deux spectromètres de masse montrent la présence des adduits C(1)H(2) et C(2)H(4). Lors des développements des réactions modèles avec les différents aldéhydes, nous avons observé que ces deux adduits pouvaient être issu de la réaction de rétroaldolisation des différents aldéhydes conjugués. Ainsi ces modifications peuvent intervenir soit après réaction avec le FA et l'AA directement soit avec les sous produits des autres aldéhydes. Enfin, il est important de noter qu'après exposition a une seule bouffée de cigarette, nous avons d'ores et déjà identifié et localisé cinq adduits provenant de réactions avec des aldéhydes.

2.2.2 La substance P

a. Analyse MALDI-TOF-TOF

La SP a également été exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$ ainsi qu'au $NaBD_3CN$. Les résultats de l'analyse MALDI-TOF-TOF de l'échantillon réduit au $NaBH_3CN$ seront discutés, comme précédemment, à partir du spectre présenté figure 85 et des tableaux 28 et 29.

Selon le spectre de masse figure 85, de nombreux adduits sont présents à des intensités relativement importantes. Comme pour l'angiotensine I, le pic majoritaire au rapport m/z 1347,74 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,1 ppm), (2), correspond à la forme native de la SP. La comparaison des spectres de l'échantillon réduit au $NaBH_3CN$ et celui réduit au $NaBD_3CN$ nous a permis d'identifier cinq adduits. Tous sont issus de la réaction entre la SP et les aldéhydes présents dans la fumée de cigarette. Ces aldéhydes sont l'AA, l'ACR et le CA. Dans le cas de cette analyse, l'adduit GO n'a pas été identifié. En revanche, le dimère de l'acroléine correspondant à l'adduit C(6)H(12) est présent sur le spectre au rapport m/z 1431,78 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 34,0 ppm). La fragmentation des différents pics a été réalisée en utilisant les mêmes paramètres que lors des analyses des réactions modèles. L'interprétation des spectres a permis de localiser tous les adduits sur le résidu lysine de la SP.

Mais la réaction entre le peptide et la phase gazeuse de la fumée de cigarette est bien plus complexe que les réactions modèles. Comme le montre le spectre de masse, d'autres ions à des rapports m/z plus élevés sont présents. Les masses calculées des adduits ont permis de supposer des formules de composés. La précision en masse de l'analyseur TOF étant moins élevée que celle du FT, les formules supposées d'adduits donne des différences de masse en ppm comprises entre 5 et 29 ppm. Cela ne permet pas de conclure effectivement quant à la structure chimique exacte. Cependant les spectres de fragmentation permettent de localiser ces adduits sur le résidu lysine de la substance P. Cela nous assure qu'il s'agit d'un adduit unique et que la structure du précurseur contient un groupement carbonyle.

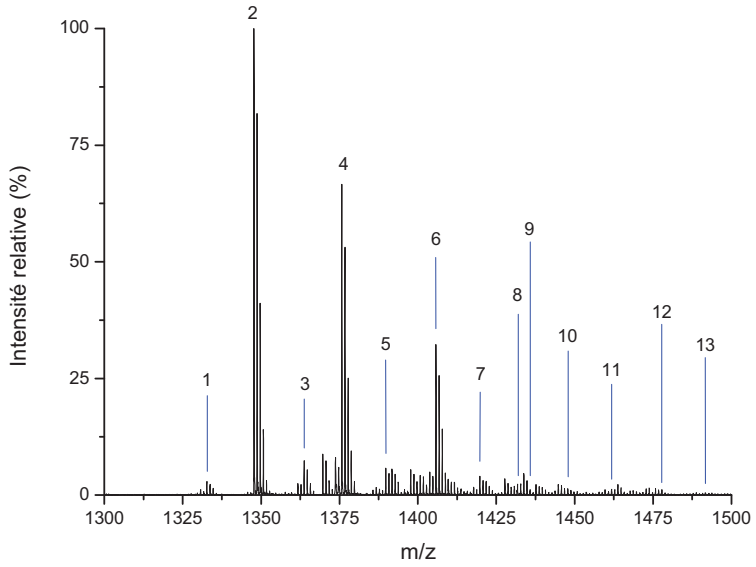


Figure 85 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la SP exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$.

Pics	$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit	Précurseur
1	1332,72	1332,71	-15,02	-5,3		
2	1347,74	1347,74	0,00	-0,1		
3	1363,73	1363,73	16,00	-0,4	O(1)	SPox
4	1375,76	1375,77	28,03	1,4	C(2) H(4)	AA
5	1389,76	1389,78	42,02	18,6	C(3) H(6)	ACR (Schiff)
6	1405,77	1405,78	58,04	2,0	C(3) H(6) O(1)	ACR (Michael)
7	1419,79	1419,76	72,05	-22,3	C(4) H(8) O(1)	CA (Michael)
8	1431,78	1431,83	84,05	34,0	C(6) H(12)	Dimère ACR (Schiff)
9	1435,79	1435,75	88,06	-29,1	C(4) H(8) O(2)	Non identifié
10	1447,82	1447,82	100,08	5,5	C(6) H(12) O(1)	Non identifié
11	1461,81	1461,80	114,07	-3,0	C(6) H(10) O(2)	ACR
12	1477,82	1477,83	130,08	10,3	C(7) H(14) O(2)	Non identifié
13	1491,84	1491,81	144,10	8,0	C(8) H(16) O(2)	CA

Tableau 28 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour la SP exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit	Précurseur
1347,74	1347,74	0,00	0,0		
1362,75	1362,76	15,01	6,6	C(1) H(1) D(1)	FA
1363,73	1363,73	15,99	2,5	O(1)	
1376,77	1376,77	29,03	5,4	C(2) H(3) D(1)	AA
1391,78	1391,79	44,04	10,9	C(3) H(4) D(2)	ACR (Schiff)
1406,78	1406,78	59,04	4,4	C(3) H(3) D(2) O(1)	ACR (Michael)
1420,79	1420,76	73,06	-20,2	C(4) H(5) D(2) O(1)	CA
1449,81	1449,80	102,09	-9,8	C(6) H(10) D(2) O(1)	Non identifié

Tableau 29 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour la SP exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBD_3CN$.

b. Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR

Comme cela a été observé tout au long du chapitre II, le spectre obtenu par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR présente deux groupes d'ions doublement chargés (figure 86). En effet, lors de l'ionisation par électrospray, la liaison peptidique entre la leucine et la méthionine se rompt formant ainsi l'ion b_{10}^{2+} au rapport m/z 600,339 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = 0,5 ppm). Cet ion est à chaque fois majoritaire par rapport à l'ion $(M+2H)^{2+}$ à m/z 674,371 ($(\Delta m/m)\times10^6$ = -0,7 ppm).

Si l'on considère l'ion b_{10}^{2+} (pic 1), quatre adduits ont pu être identifiés (pics 2, 3, 4 et 5). Ils sont tous issus de réaction de base de Schiff provenant de quatre aldéhydes différents. Ces aldéhydes sont le FA, l'AA, l'ACR et le CA (tableau 30). Les erreurs entre la masse théorique et la masse expérimentale ne dépassent pas 0,5 ppm. Cela nous assure la formule exacte des adduits générés après exposition à une bouffée de cigarette. Dans le cas de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR, il est important de noter que le CA a été identifié suivant l'adduit C(4)H(8) induit par réaction de base de Schiff alors que l'analyse MALDI-TOF-TOF avait révélé la présence de l'adduit C(4)H(8)O(1) issu d'une addition de Michael entre la SP et le crotonaldéhyde.

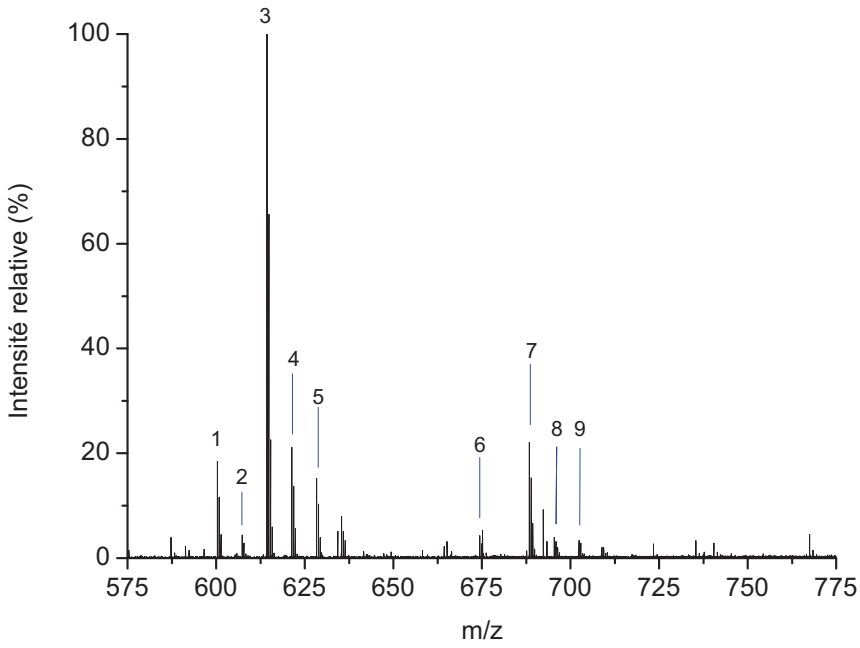


Figure 86 : Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la SP exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$.

Pics	m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit	Précurseur
1	600,339	1198,662	1198,661	0,002	0,5		
2	607,347	1212,677	1212,677	14,017	0,5	C(1) H(2)	FA
3	614,354	1226,693	1226,692	28,033	0,3	C(2) H(4)	AA
4	621,362	1240,709	1240,708	42,048	0,4	C(3) H(6)	ACR
5	628,370	1254,724	1254,724	56,064	0,0	C(4) H(8)	CA
6	674,371	1346,727	1346,728	-0,001	-0,7		
7	688,388	1374,759	1374,759	28,031	-0,1	C(2) H(4)	AA
8	695,395	1388,775	1388,775	42,047	-0,1	C(3) H(6)	ACR
9	702,403	1402,791	1402,791	56,063	0,0	C(4) H(8)	CA

Tableau 30 : Adduits identifiés par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour la SP exposée à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$

Les résultats obtenus avec les deux spectromètres permettent de confirmer l'importante réactivité des aldéhydes contenus dans la phase gazeuse de la fumée de cigarette avec le peptide. En effet, les adduits présents sur les spectres proviennent exclusivement des aldéhydes. Par ailleurs c'est l'adduit C(2)H(4), provenant soit de l'acétaldéhyde soit des produits de rétroaldolisation des aldéhydes conjugués, qui domine les spectres de masse.

Ainsi,

Les deux peptides standards, l'angiotensine I et la substance P, ont été exposés à la phase gazeuse d'une bouffée de cigarette. Les analyses réalisées par spectrométrie de masse haute résolution nous ont permis de mettre en évidence de nombreux adduits d'intensités non négligeables. Cela permet de conclure dans un premier temps quant à la forte réactivité entre les produits formés par une bouffée de cigarette et les biomolécules.

Grâce aux réactions modèles développées dans le chapitre II, ainsi que les réductions avec le cyanoborohydrure de sodium et son équivalent deutérié, les adduits majoritaires des différents spectres ont pu être identifiés. Ainsi, nous avons montré que cinq aldéhydes, présentés dans le chapitre II, ont réagi avec les peptides. Il s'agit principalement des réactions de base de Schiff sauf le crotonaldéhyde ou l'addition de Michael est la réaction majoritaire. Concernant

l'angiotensine I, les adduits se sont formés sur la fonction N-terminale du peptide tandis que c'est l'amine secondaire du résidu lysine qui est le centre réactionnel pour la SP.

2.3 Analyse des adduits engendrés par la fumée d'une cigarette

L'analyse des modifications induites par une bouffée de cigarette nous a permis de comprendre quelles étaient les premières réactions qui se produisaient. La suite de cette étude s'est dirigée vers la compréhension des modifications induites par la fumée d'une cigarette entière. Le fumage d'une cigarette réalisé suivant les paramètres décrits §3.1 correspond à environ six bouffées. Cette expérience a été effectuée sur les peptides angiotensine I et substance P ainsi que sur la protéine α-lactalbumine.

2.3.1 L'angiotensine I

Le spectre obtenu après analyse MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$ est présenté sur la figure 87. Il présente de très nombreux adduits montrant ainsi la complexité de la réaction entre la fumée de cigarette et un peptide. Par comparaison avec les analyses réalisées pour une bouffée de cigarette ainsi que réduites au $NaBD_3CN$, les premiers pics du spectre peuvent être rapidement identifiés (tableau 31). Aussi les pics 3, 4, 5 et 8 correspondent respectivement aux adduits FA, AA, ACR et CA. Concernant le pic 7, il est au rapport m/z 1354,73 ($(\Delta m/m)\times 10^6$ = 0,2 ppm) correspondant à un adduit de 58,04 Da. La réduction au $NaBD_3CN$ présente cet ion au rapport m/z 1355,73 ($(\Delta m/m)\times 10^6$ = 3,8 ppm), soit un adduit de 59,04 Da (tableau 32). Cela nous permet de conclure qu'il s'agit de l'adduit de Michael de l'ACR.

La prédominance sur le spectre des adduits provenant d'aldéhydes démontre la très forte réactivité des aldéhydes envers une biomolécule. Cela est d'autant plus vrai que deux adduits correspondant aux dimères de l'acroléine et du crotonaldéhyde ont pu être identifié (pics 11 et

13). Les autres adduits sont intéressants si l'on considère leur rapport m/z. En effet, ils sont tous à des différences de masse successives de 14,01 Da. Cela peut s'expliquer de deux manières. Tout d'abord, il peut s'agir de réactions d'aldolisation entre les aldéhydes au sein du milieu réactionnel générant ainsi des adduits de plus hautes masses. La deuxième possibilité est la réaction entre le peptide et d'autres aldéhydes ou acides carboxyliques présents dans la fumée de cigarette. Grâce à la réduction au $NaBD_3CN$, nous avons pu attribuer des formules brutes pour chacun des composés (tableau 32). De plus, la différence de masse systématique de 2,01 Da entre l'adduit réduit au H^- et celui réduit au D^- permet d'affirmer que la structure du composé contient deux insaturations. L'interprétation des spectres de fragmentation des différents ions a révélé la localisation sur la position N-terminale de l'angiotensine I. Il en est de même pour les adduits de plus haute masse ce qui implique la formation d'un adduit unique sur la position N-terminale du peptide. Enfin comme lors de l'exposition à une bouffée de cigarette, l'ion correspondant à l'addition de Michael de l'acrylonitrile (pic 6) est présent sur le spectre avec une importante intensité.

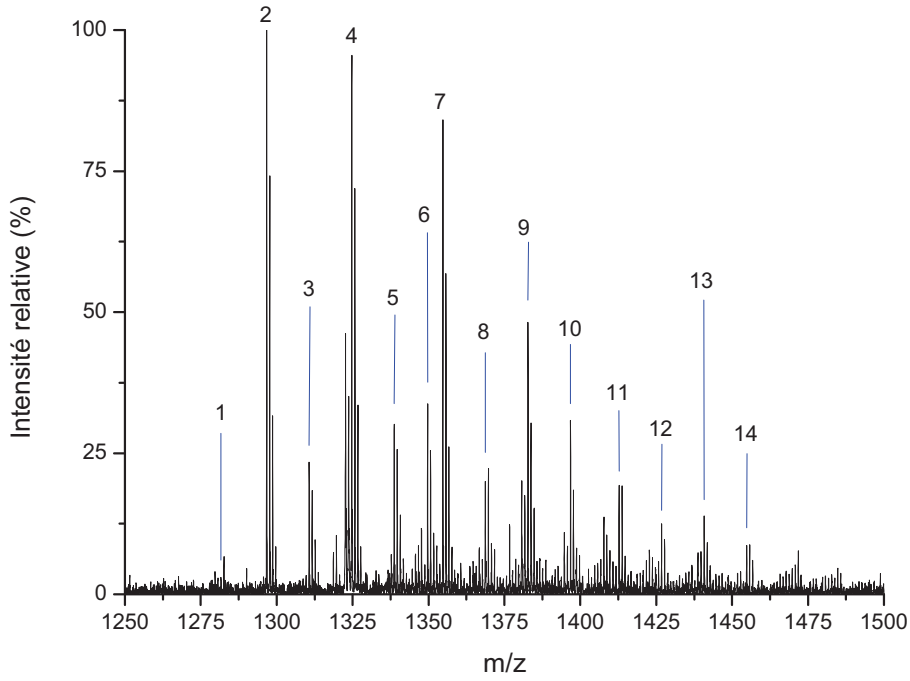


Figure 87 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$

pics	$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit	Précurseur
1	1281,68	1281,66	-15,01	-13,2		
2	1296,68	1296,69	0,00	0,1		
3	1310,70	1310,70	14,02	-1,8	C(1) H(2)	FA
4	1324,72	1324,72	28,03	-0,8	C(2) H(4)	AA
5	1338,71	1338,73	42,02	17,1	C(3) H(6)	ACR (Schiff)
6	1349,72	1349,71	53,03	-2,7	C(3) H(3) N(1)	Acrylonitrile
7	1354,73	1354,73	58,04	0,2	C(3) H(6) O(1)	ACR (Michael)
8	1368,74	1368,74	72,06	0,7	C(4) H(8) O(1)	CA (Michael)
9	1382,75	1382,72	86,07	-23,9	C(5) H(10) O(1)	Non identifié
10	1396,76	1396,74	100,08	-17,7	C(6) H(12) O(1)	Non identifié
11	1412,77	1412,77	116,08	0,0	C(6) H(12) O(2)	dimère ACR (Michael)
12	1426,78	1426,78	130,10	0,5	C(7) H(14) O(2)	Non identifié
13	1440,80	1440,80	144,11	1,3	C(8) H(16) O(2)	CA
14	1454,81	1454,82	158,13	3,4	C(9) H(18) O(2)	Non identifié

Tableau 31 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit	Précurseur
1296,69	1296,69	0,00	-0,1		
1311,71	1311,71	15,02	-0,7	C(1) H(1) D(1)	FA
1325,72	1325,72	29,03	5,6	C(2) H(3) D(1)	AA
1340,74	1340,74	44,05	5,2	C(3) H(4) D(2)	ACR (Schiff)
1349,71	1349,71	53,02	2,0	C(3) H(3) N(1)	Acrylonitrile
1355,73	1355,73	59,04	3,8	C(3) H(3) D(2) O(1)	ACR (Michael)
1369,75	1369,75	73,06	0,9	C(4) H(5) D(2) O(1)	CA
1384,76	1384,77	88,08	6,9	C(5) H(8) D(2) O(1)	Non identifié
1398,76	1398,75	102,10	-4,3	C(6) H(10) D(2) O(1)	Non identifié
1414,78	1414,78	118,09	4,4	C(6) H(10) D(2) O(2)	ACR
1428,79	1428,80	132,11	3,5	C(7) H(12) D(2) O(2)	Non identifié
1442,79	1442,81	146,10	16,4	C(8) H(14) D(2) O(2)	CA

Tableau 32 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBD_3CN$.

b. Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR

Le spectre de masse obtenu par analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR (figure 88) présente beaucoup moins de pics que lors de l'analyse MALDI-TOF-TOF. Cependant le pic correspondant à l'ion moléculaire, (3), n'est présent qu'à une très faible intensité. Cela implique que la quasi-totalité du peptide a réagi avec les composés de la fumée de cigarette.

Les adduits que nous avons identifiés sont répertoriés dans le tableau 33. La très haute résolution de l'analyseur de masse FT-ICR permet une parfaite séparation des pics. Cela nous a permis d'identifier les différents adduits issus de réaction entre l'angiotensine I et quatre aldéhydes présents dans la fumée de cigarette. Ces précurseurs réactionnels sont le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'acroléine et le crotonaldéhyde. Cette analyse nous a également permis de mettre en évidence la présence de pics trichargés ayant des masses inférieures à l'angiotensine I. Ces ions (1 et 2) sont issus de réactions de scissions de chaine principale ou latérale du peptide. Grâce à la précision de mesure de cet instrument, des formules des composés perdus lors de l'exposition à la fumée de cigarette ont pu être attribuées. Ainsi, le pic (2) semble correspondre à l'ion moléculaire moins une molécule d'ammoniac. L'erreur calculée est de -1,1 ppm ce qui nous permet de confirmer que l'ion au rapport m/z 427,224 correspond à $(MH_3\text{-}NH_3)^{3+}$. La différence de masse calculée entre le peptide natif et l'ion (1) est de -35,037 Da. Si nous considérons que l'angiotensine I a perdu une molécule d'eau et une molécule d'ammoniac, la masse théorique du peptide est alors de 1260,640 Da. Cette hypothèse de formule implique une erreur de -0,7 ppm. Ainsi, il semble très probable que l'angiotensine I ait effectivement perdu une molécule d'eau et une molécule d'ammoniac lors de l'exposition à la fumée de cigarette.

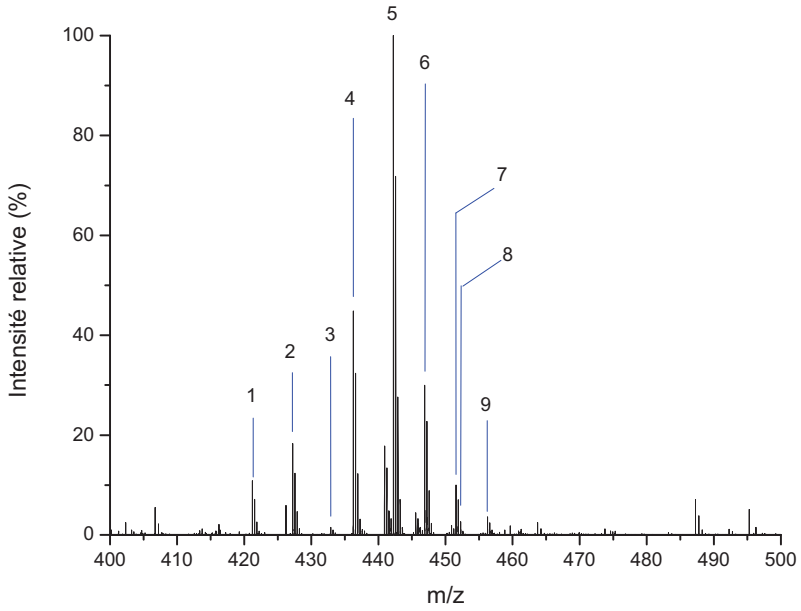


Figure 88 : Spectre nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la SP exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$.

Pics	m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Modifications	Précurseurs
1	421,221	1260,639	1260,639	-35,037	-0,7	N(-1) H(-5) O(-1)	
2	427,224	1278,649	1278,651	-17,027	-1,1	N(-1) H(-3)	
3	432,900	1295,676	1295,677	0,000	1,2		
4	437,577	1309,708	1309,693	14,032	-11,0	C(1) H(2)	FA
5	442,244	1323,707	1323,709	28,031	1,3	C(2) H(4)	AA
6	446,915	1337,722	1337,724	42,046	1,5	C(3) H(6)	ACR
7	451,587	1351,738	1351,738	56,062	1,5	C(4) H(8)	CA
8	452,256	1353,745	1353,719	58,069	-18,6	C(3) H(6) O(1)	ACR
9	456,916	1367,723	1367,735	72,047	8,5	C(4) H(8) O(1)	CA

Tableau 33 : Adduits identifiés en nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette.

Ainsi,

Les analyses de l'angiotensine I exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette réalisées sur les deux spectromètres de masse montrent que les ions modifiés ayant le maximum d'intensité sur les spectres MS sont issus de la réaction avec deux aldéhydes : l'acétaldéhyde et l'acroléine. Or, l'AA et l'ACR sont les aldéhydes les plus abondants de la fumée de cigarette avec des concentrations respectives de 2040 et 431 µg/cigarette. Les résultats d'analyse sont donc en parfaite adéquation avec les concentrations des composants de la fumée de cigarette.

2.3.2 La substance P

Le spectre MS MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$ est présenté figure 89. Ce spectre possède un grand nombre de pics dont les intensités sont très variables. Le chevauchement observé des massifs isotopiques rend leur identification difficile. Néanmoins, nous avons pu identifier dix ions, numérotés sur le spectre MS de 1 à 10. Les résultats d'identification obtenus après réduction au $NaBH_3CN$ sont présentés dans le tableau 34 et ceux obtenus après réduction au $NaBD_3CN$ sont présentés dans le tableau 35.

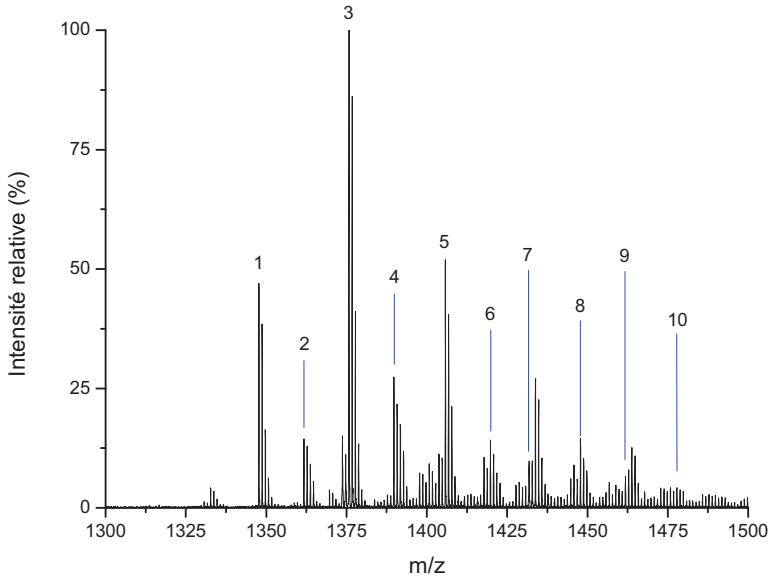


Figure 89 : Spectre MS MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$.

pics	$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit	Précurseur
1	1347,74	1347,74	0,00	-0,1		
2	1361,75	1361,75	14,02	0,4	C(1) H(2)	FA
3	1375,76	1375,77	28,03	2,2	C(2) H(4)	AA
4	1389,76	1389,78	42,02	19,4	C(3) H(6)	ACR (Schiff)
5	1405,77	1405,78	58,03	5,0	C(3) H(6) O(1)	ACR (Michael)
6	1419,79	1419,76	72,06	-24,3	C(4) H(8) O(1)	CA (Michael)
7	1431,78	1431,83	84,04	34,3	C(6) H(12)	Dimère ACR (Schiff)
8	1447,80	1447,82	100,07	15,6	C(6) H(12) O(1)	Non identifié
9	1461,80	1461,80	114,07	1,6	C(6) H(10) O(2)	ACR
10	1477,82	1477,83	130,09	8,8	C(7) H(14) O(2)	Non identifié

Tableau 34 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour la substance P exposée à la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit	Précurseur
1347,74	1347,74	0,00	-0,1		
1362,76	1362,76	15,02	1,3	C(1)H(1)D(1)	FA
1363,75	1363,73	16,01	-11,7	O(1)	
1376,77	1376,77	29,03	3,8	C(2)H(3)D(1)	AA
1391,78	1391,79	43,03	9,6	C(3)H(4)D(2)	ACR Schiff
1406,78	1406,78	59,05	1,1	C(3)H(3)D(2)O(1)	ACR Michael
1420,79	1420,80	73,06	4,4	C(4)H(5)D(2)O(1)	CA
1449,81	1449,80	102,09	-7,9	C(6)H(10)D(2)O(1)	Non identifié

Tableau 35 : Adduits identifiés par MALDI-TOF-TOF pour la substance P exposée à la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBD_3CN$.

Nous pouvons constater que le spectre de masse est une fois encore dominé par les adduits aldéhydes. Les adduits formés majoritairement correspondent aux réactions entre la substance P et l'acétaldéhyde (pic 3) ainsi qu'entre la substance P et l'acroléine (pics 4 et 5). Ces résultats concordent avec ceux obtenus lors de l'analyse de l'angiotensine I ou les adduits AA et ACR étaient également majoritaires. Nous pouvons donc conclure que l'intensité des ions formés est relative à la concentration des aldéhydes présents dans le milieu. En raison du chevauchement des massifs isotopiques, certains pics monoisotopiques sont mal résolus ce qui entraine des erreurs supérieures à 20 ppm. Cependant, grâce à l'analyse de l'échantillon réduit au $NaBD_3CN$, l'identification des adduits est confirmée.

b. Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR

Le spectre obtenu après analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR est relativement complexe. Cela est dû non seulement à la multitude d'adduits générés après exposition de la SP à la phase gazeuse de la fumée de cigarette, mais aussi à la présence du peptide sous les formes b_{10}^{2+} et $(M+2H)^{2+}$. Mais par analogie avec les expériences réalisées précédemment et grâce à la haute précision en masse du spectromètre FT-ICR, l'interprétation du spectre a pu être réalisée.

La très haute résolution de l'analyseur FT-ICR ainsi que le couplage nanoLC permettent une séparation optimale des différents massifs isotopiques. En raison de la dissociation de la SP lors de l'ionisation par nanoESI, nous pouvons constater que chaque adduit est identifié deux fois sur le spectre de masse (tableau 36). Ainsi, les pics numérotés de 1 à 11 correspondent aux adduits formés sur l'ion b_{10}^{2+} tandis que les pics numérotés de 12 à 21 correspondent à ceux formés sur l'ion moléculaire dichargé. La réactivité des quatre aldéhydes, à savoir le FA, l'AA, l'ACR et le CA, a également été mise en évidence lors de cette analyse. Par ailleurs, les erreurs calculées sont toutes comprises entre 0 et |2,2| ppm confirmant ainsi l'identification des adduits formés et donc les précurseurs. Cette précision de mesure durant cette analyse nous a permis de réfléchir sur la présence d'un nouvel adduit. Cet adduit est à une différence de masse de 83,036 Da par rapport aux ions b_{10}^{2+} (pic 7) et $(MH_2)^{2+}$ (pic 18). Afin de déterminer la structure de cet adduit, le logiciel Isotope Pattern de Bruker a été utilisé. Ce logiciel permet de calculer les masses exactes des composés à partir de leur formule brute. Les différentes simulations

effectuées nous ont permis de conclure quant à la structure la plus probable. Il s'est avéré qu'il s'agit d'un adduit C(4)H(5)N(1)O(1). En effet, la masse théorique de cet adduit est 83,037 Da. En calculant les masses théoriques des ions avec cet adduit, les erreurs obtenues sont alors de -1,6 ppm pour l'ion b_{10}^{2+} et -1,5 ppm pour l'ion $(MH_2)^{2+}$. Ces erreurs nous permettent d'assurer la formule chimique de l'adduit. Cependant, le précurseur de cet adduit n'a pas pu être identifié.

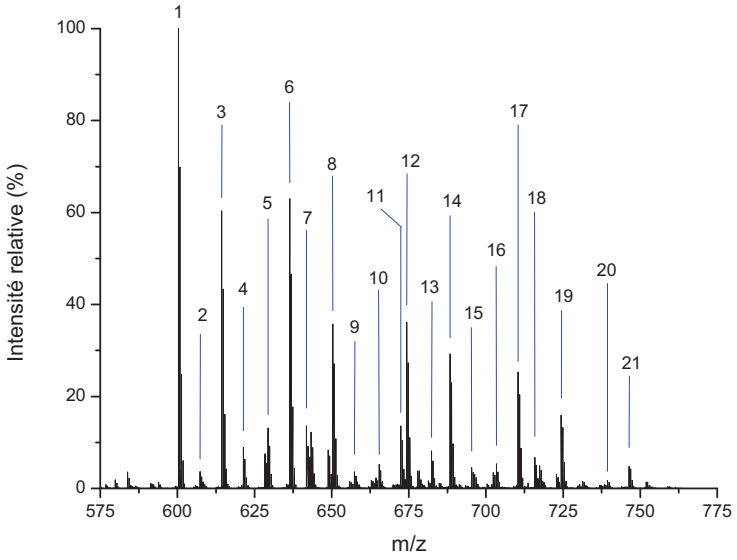


Figure 90 : Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de la SP exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$.

Pics	m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit	Précurseur
1	600,338	1198,661	1198,661	0,000	-0,5		
2	607,347	1212,678	1212,677	14,017	0,6	C(1) H(2)	FA
3	614,354	1226,692	1226,692	28,031	-0,5	C(2) H(4)	AA
4	621,361	1240,707	1240,708	42,047	-0,7	C(3) H(6)	ACR (Schiff)
5	629,359	1256,703	1256,703	58,042	-0,3	C(3) H(6) O(1)	ACR (Michael)
6	636,367	1270,718	1270,719	72,057	-0,7	C(4) H(8) O(1)	CA (Michael)
7	641,856	1281,696	1281,698	83,036	-1,6	C(4) H(5) N(1) O(1)	Non identifié
8	650,382	1298,748	1298,750	100,087	-1,5	C(6) H(12) O(1)	Non identifié
9	657,390	1312,764	1312,766	114,103	-1,2	C(6) H(10) O(2)	ACR
10	665,388	1328,761	1328,760	130,100	0,3	C(7) H(14) O(2)	Non identifié
11	672,395	1342,774	1342,776	144,114	-1,3	C(8) H(16) O(2)	CA
12	674,371	1346,727	1346,728	0,000	-0,7		
13	682,369	1362,723	1362,723	15,996	0,1	O(1)	
14	688,387	1374,759	1374,759	28,032	-0,5	C(2) H(4)	AA
15	695,395	1388,773	1388,775	42,046	-1,3	C(3) H(6)	ACR (Schiff)
16	703,391	1404,767	1404,770	58,040	-2,2	C(3) H(6) O(1)	ACR (Michael)
17	710,400	1418,785	1418,786	72,058	-0,5	C(4) H(8) O(1)	CA (Michael)
18	715,889	1429,763	1429,765	83,036	-1,5	C(4) H(5) N(1) O(1)	Non identifié
19	724,415	1446,815	1446,817	100,088	-1,5	C(6) H(12) O(1)	Non identifié
20	739,421	1476,827	1476,828	130,100	-0,3	C(7) H(14) O(2)	Non identifié
21	746,428	1490,841	1490,843	144,114	-1,4	C(8) H(16) O(2)	CA

Tableau 36 : Adduits identifiés par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour la SP exposée à la phase gazeuse de la fumée dune cigarette et réduite au $NaBH_3CN$

2.3.3 L'α-lactalbumine

Les expériences de fumage ont été réalisées sur la protéine α-lactalbumine. Le milieu a été réduit au $NaBH_3CN$ et dessalé avant la digestion à la trypsine. L'analyse a été effectuée en couplage en ligne nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. Les résultats obtenus à partir de l'analyse des peptides angiotensine I et substance P ont montré que les adduits formés provenaient des aldéhydes présents dans la fumée de cigarette. Aussi, les interrogations des banques de données ont été réalisées en incluant les modifications que nous avions répertoriées lors des réactions modèles. Elles nous ont permis d'identifier dix modifications (tableau 37 lignes 1-10).

Les deux premières modifications correspondent à l'adduit C(1)H(2). Elles ont pu être localisées sur les lysines K24 et K141. Les analyses réalisées précédemment révèlent qu'il s'agit de la base de Schiff issue de la réaction entre la protéine et le formaldéhyde ou des produits de rétroaldolisation des autres aldéhydes contenus dans la fumée de cigarette. Le deuxième type de modification correspond à la formule C(2)H(4) provenant de la réaction de base de Schiff avec l'acétaldéhyde. Trois modifications ont pu être identifiées et localisées sur les lysines K117, K133 et K141. Deux autres provenant de réactions avec des aldéhydes ont été mises en évidence. Il s'agit des réactions de base de Schiff avec le crotonaldéhyde et l'acroléine. Les deux adduits ont été localisés sur la lysine K24. Enfin, la dernière modification identifiée après interrogations des banques de données est l'oxydation du tryptophane W79. Les différences de masse en ppm obtenues pour chaque ion ainsi que leurs scores assurent l'identification et la localisation des modifications. Ainsi, les adduits engendrés par les aldéhydes sont principalement situés sur la lysine 24. Cela était déjà le cas lors du développement des réactions modèles. Cette lysine située en début de chaine protéique semble être le site le plus accessible aux modifications. Il en est de même pour la lysine 141 située en fin de chaine protéique.

Afin de compléter ces résultats, une interprétation manuelle du spectre a été réalisée. Elle nous a permis d'identifier douze modifications supplémentaires (tableau 37 lignes 11-25). Dix d'entre elles correspondent aux adduits formés par le FA, l'AA, l'ACR et le CA et deux correspondent à des oxydations. Malgré l'absence de spectres de fragmentations interprétables, plusieurs paramètres permettent d'assurer l'identification des modifications. Tout d'abord, la précision de mesure du FT-ICR nous permet d'attribuer des modifications sans ambigüité et cela

se vérifie grâce aux calculs d'erreurs. Dans notre cas, elles sont comprises entre -3,2 et 0 ppm ce qui confirme la masse de l'adduit formé. Concernant les adduits aldéhydes, il est vérifié qu'à chaque modification attribuée, le peptide possède un clivage manqué et qu'il s'agit d'une lysine et non une arginine. Cette information nous donne un argument supplémentaire quant à la présence d'une modification mais également à sa localisation. Ainsi, il semblerait que trois adduits se soient formés sur la lysine 32 (lignes 14-16) et deux sur la lysine 112 (lignes 22, 24).

	m/z	m_{exp} (Da)	m_{th} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	miss cleavage	score	séquence	modifications
1	609,814	1217,613	1217,611	1,6	1	10	^{134}LDQWLCEKL^{142}	Carbamidomethyl (C); FA (14)
2	662,341	1322,668	1322,665	1,8	1	54	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); FA (14)
3	636,318	1905,931	1905,933	-0,9	2	29	^{128}ALCSEKLDQWLCEKL^{142}	2 Carbamidomethyl (C); FA (14)
4	425,249	1696,965	1696,966	-0,7	1	10	^{114}ILDKVGINYWLAHK^{127}	AA (28)
5	566,663	1696,966	1696,966	-0,5	1	16	^{114}ILDKVGINYWLAHK^{127}	AA (28)
6	640,989	1919,947	1919,949	-1	2	31	^{128}ALCSEKLDQWLCEKL^{142}	2 Carbamidomethyl (C); AA (28)
7	650,334	1947,981	1947,98	0,4	2	32	^{128}ALCSEKLDQWLCEKL^{142}	2 Carbamidomethyl (C); 2 AA (28)
8	451,240	1350,697	1350,697	0,3	1	28	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); ACR (42)
9	455,911	1364,712	1364,712	-0,3	1	10	^{20}EQLTKCEVFR^{29}	Carbamidomethyl (C); CA (56)
10	652,530	2606,090	2606,095	-1,8	1	15	^{78}IWCKDDQNPHSSNICNISCDK^{98}	3 Carbamidomethyl (C); Oxydation (W)
11	610,805	1219,595	1219,591	-3,2	1		^{134}LDQWLCEKL^{142}	Carbamidomethyl (C); Oxydation (W)
12	697,379	1392,744	1392,743	0	2		^{25}CEVFRELKDLK^{35}	FA (14)
13	465,255	1392,744	1392,743	-0,3	2		^{25}CEVFRELKDLK^{35}	FA (14)
14	484,263	1449,766	1449,765	-0,9	2		^{25}CEVFRELKDLK^{35}	Carbamidomethyl (C); FA (14)
15	493,606	1477,796	1477,796	0	2		^{25}CEVFRELKDLK^{35}	Carbamidomethyl (C); ACR (42)
16	498,278	1491,812	1491,812	-0,3	2		^{25}CEVFRELKDLK^{35}	Carbamidomethyl (C); CA (56)
17	565,303	1692,888	1692,887	-0,6	2		^{20}EQLTKCEVFRELK^{32}	Carbamidomethyl (C); FA (14)
18	598,624	1792,851	1792,849	-1,5	1		^{128}ALCSEKLDQWLCEK^{141}	2 Carbamidomethyl (C); FA (14)
19	897,434	1792,853	1792,849	-2,4	1		^{128}ALCSEKLDQWLCEK^{141}	2 Carbamidomethyl (C); FA (14)
20	603,297	1806,868	1806,864	-1,9	1		^{128}ALCSEKLDQWLCEK^{141}	2 Carbamidomethyl (C); AA (28)
21	607,969	1820,885	1820,88	-2,9	1		^{128}ALCSEKLDQWLCEK^{141}	2 Carbamidomethyl (C); ACR (42)
22	614,627	1840,858	1840,859	0,4	1		^{99}FLDDDLTDDIMCVKK^{113}	Carbamidomethyl (C); FA (14)
23	615,287	1842,839	1842,838	-0,4	1		^{99}FLDDDLTDDIMCVKK^{113}	Carbamidomethyl (C); Oxydation (M)
24	619,299	1854,876	1854,874	-1,1	1		^{99}FLDDDLTDDIMCVKK^{113}	Carbamidomethyl (C); AA (28)
25	645,662	1933,964	1933,964	0,1	2		^{128}ALCSEKLDQWLCEKL^{142}	2 Carbamidomethyl (C); ACR (42)

Tableau 37 : Modifications identifiées par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR pour le digest d'α-LA exposée à la fumée d'une cigarette.

E^{20} QLTKCEVFRE^{30} LKDLKGYGGV^{40} SLPEWVCTTF^{50} HTSGYDTQAI^{60}
VQNNDSTEYG^{70} LFQINNKIWC^{80} KDDQNPHSSN^{90} ICNISCDKFL^{100}
DDDLTDDIMC^{110} VKKILDKVGI^{120} NYWLAHKALC^{130} SEKLDQWLCE^{140} KL

Figure 91 : Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR du digest de l'α-LA exposée à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette et réduite au $NaBH_3CN$.

Colombo *et al* ont publié des travaux portant sur la carbonylation des protéines induite par la fumée de cigarette [117]. Ils ont travaillé sur l'albumine humaine préalablement traitée au DTT afin de former des groupes –SH libres et ensuite exposée à la phase gazeuse de la fumée de cigarette. Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre de masse nanoESI-LTQ XL-Orbitrap (Thermo Scientific) couplé à une chaine de nano chromatographie liquide. Ils ont mis en évidence la formation d'adduits acroléine et crotonaldéhyde formés par addition de Michael sur les résidus C34, K525, K351 et H39 et de deux adduits acroléine issus d'une réaction de base de Schiff sur les résidus K541 et K545. Les analyses ont été effectuées après réduction au $NaBH_4$. Il est intéressant de constater que les auteurs détectent majoritairement des adduits de Michael au détriment des adduits de base de Schiff.

Dans le cas de notre étude, nous avons pu mettre en évidence la formation de deux bases de Schiff C(3)H(6) et C(4)H(8) formées respectivement à partir de l'acroléine et du crotonaldéhyde. Cependant nous avons également détecté des adduits C(2)H(4) provenant de l'acétaldéhyde. Ce dernier est l'aldéhyde dont la concentration est la plus importante dans la fumée de cigarette. Par ailleurs, nous avons également identifié des adduits C(1)H(2). Grâce aux réactions modèles, nous pouvons avancer l'hypothèse que ces adduits proviennent soit du formaldéhyde soit du produit de rétroaldolisation de l'acroléine ou du crotonaldéhyde.

Ainsi, l'exposition de l'α-lactalbumine à la phase gazeuse de la fumée de cigarette a conduit à la formation de multiples adduits provenant de quatre aldéhydes : le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'acroléine et le crotonaldéhyde. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors de l'analyse des deux peptides standards. Par ailleurs, ils sont d'un grand intérêt car les modifications induites par l'acétaldéhyde et le formaldéhyde après exposition à la fumée de cigarette n'avaient jusqu'alors pas été mis en évidence par spectrométrie de masse.

2.4 Analyse des adduits minoritaires

Afin de compléter les résultats présentés précédemment, des expériences supplémentaires ont été réalisées. Elles avaient pour objectif d'identifier les adduits minoritaires et notamment ceux formés par les radicaux. Ainsi, nous avons décidé de supprimer les adduits aldéhydes

formés par base de Schiff lors de l'exposition des peptides et protéine à la phase gazeuse de la fumée de cigarette. Pour cela, nous avons utilisé de l'éthanolamine (figure 92). Sa fonction amine est une base faible et est donc capable de réagir avec les aldéhydes présents dans le milieu réactionnel.

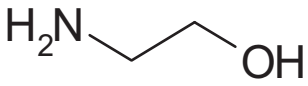


Figure 92 : Formule semi-développée de l'éthanolamine

Les échantillons d'angiotensine I et de substance P exposés à la phase gazeuse d'une bouffée de fumée de cigarette et traités à l'éthanolamine ont été analysés par MALDI-TOF-TOF. Afin de comparer les échantillons traités et non traités, les spectres de masse correspondant aux des deux conditions sont présentés.

Les résultats obtenus pour l'angiotensine I sont présentés sur la figure 93 et le tableau 38. La première constatation qui peut être faite à partir des spectres de masse est l'importante diminution de l'intensité des adduits. Si l'on considère l'adduit AA (pic 2), l'intensité relative était de 25 % pour l'échantillon non traité (figure 93 A) alors qu'elle n'est plus que de 8 % pour l'échantillon traité (figure 93 B). Par ailleurs les bases de Schiff formées avec le FA, l'ACR et le CA ne sont plus présentes sur le spectre de masse de l'échantillon traité (tableau 38). Ainsi, nous observons principalement les adduits stables, à savoir les adduits de Michael de l'ACR, du CA et de l'acrylonitrile mais également l'adduit formé avec le cuivre.

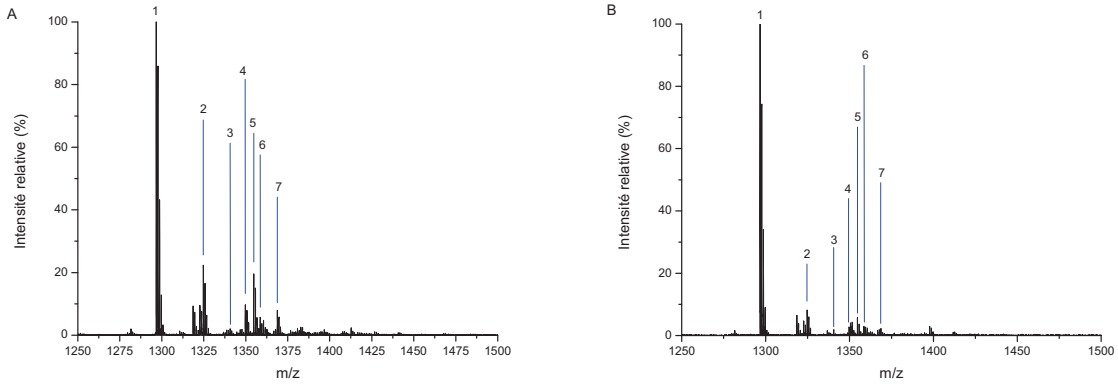


Figure 93 : Spectres MS MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I. A : angiotensine I exposée à une bouffée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$; B : angiotensine I exposée à une bouffée de cigarette, traitée à l'éthanolamine et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

Pics	$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit	Précurseurs
1	1296,68	1296,69	0	0,1		
2	1324,72	1324,72	28,04	-3,6	C(2) H(4)	AA
3	1340,71	1340,71	44,02	2,5	C(2) H(4) O(1)	GO
4	1349,71	1349,71	53,02	4,7	C(3) H(3) N(1)	Acrylonitrile
5	1354,73	1354,73	58,04	-1,3	C(3) H(6) O(1)	ACR (Michael)
6	1358,60	1358,61	61,91	3,6	Cu(1) H(-1)	Cuivre
7	1368,73	1368,74	72,05	7,3	C(4) H(8) O(1)	CA (Michael)

Tableau 38 : Adduits identifiés en MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à une bouffée de cigarette, traitée à l'éthanolamine et réduite au $NaBH_3CN$.

Comme pour l'angiotensine I, l'échantillon de substance P exposé à la phase gazeuse d'une bouffée de cigarette a été traité à l'éthanolamine puis réduit au $NaBH_3CN$. Les résultats que nous avons obtenus sont présentés sur la figure 94 et répertoriés dans le tableau 39. Nous pouvons constater que l'intensité des bases de Schiff a diminué après le traitement à l'éthanolamine. En revanche, nous observons toujours les adduits de Michael formés avec l'ACR et le CA.

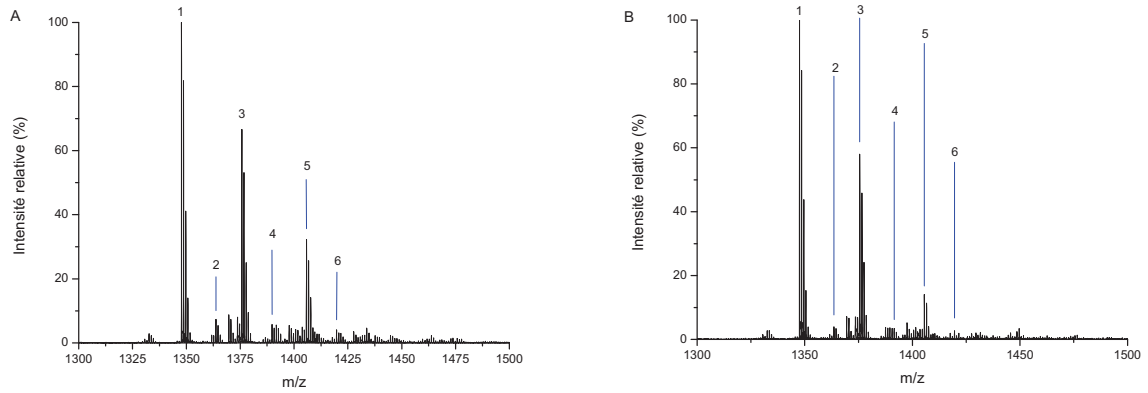


Figure 94 : Spectres MS MALDI-TOF-TOF de la substance P. A : SP exposée à une bouffée de cigarette et réduite au $NaBH_3CN$; B : SP exposée à une bouffée de cigarette, traitée à l'éthanolamine et réduite au $NaBH_3CN$. Analyse de 1 pmol.

Pics	$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit	Précurseurs
1	1347,74	1347,74	0	0		
2	1363,73	1363,73	15,99	1,7	O(1)	
3	1375,76	1375,77	28,02	5,7	C(2) H(4)	AA
4	1391,78	1391,76	44,04	-10	C(2) H(4) O(1)	GO
5	1405,77	1405,78	58,03	6,4	C(3) H(6) O(1)	ACR (Michael)
6	1419,78	1419,79	72,04	10,2	C(4) H(8) O(1)	CA (Michael)

Tableau 39 : Adduits identifiés en MALDI-TOF-TOF pour la SP exposée à une bouffée de cigarette, traitée à l'éthanolamine et réduite au $NaBH_3CN$.

Ainsi, les analyses réalisées dans cette partie n'ont pas permis de mettre en évidence la formation d'autres adduits et notamment ceux issus de réactions avec les radicaux. Cependant ces résultats sont extrêmement intéressants. En effet, ils nous permettent de constater qu'en raison de la très faible concentration des radicaux au sein de la fumée de cigarette, aucun adduit ne peut être identifié. De plus, ils nous permettent de conclure sur la très forte réactivité des aldéhydes avec les protéines.

3. CONCLUSION

Ce chapitre avait pour objectif d'identifier les modifications des protéines induites par la phase gazeuse de la fumée de cigarette. Les expériences, développées sur deux peptides et une protéine standards ont été analysées dans un premier temps sur un spectromètre de masse MALDI-TOF-TOF puis en couplage nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. Nous avons étudié deux conditions : l'exposition à une bouffée de fumée de cigarette puis l'exposition à la fumée d'une cigarette entière. Dans l'éventualité de réactions entre les peptides et les aldéhydes présents dans la phase gazeuse de la fumée de cigarette, les échantillons ont été préalablement réduits avec du $NaBH_3CN$ ainsi qu'avec son équivalent deutérié, le $NaBD_3CN$, avant l'analyse par spectrométrie de masse.

Les spectres de masse obtenus pour les deux peptides exposés à une bouffée ont été marquants en raison du nombre d'adduits formés et de leur intensité. Les développements de réactions modèles effectuées dans le chapitre II nous ont été d'une grande aide pour comprendre l'origine des modifications. En effet, grâce à ce développement méthodologique, la prédominance des adduits issus de réactions avec les aldéhydes a rapidement été mise en évidence. Ainsi cinq aldéhydes ont été identifiés comme étant les précurseurs réactionnels. Il s'agit du formaldéhyde, de l'acétaldéhyde, de l'acroléine, du crotonaldéhyde et du glyoxal. Les réductions au $NaBD_3CN$ ont été essentielles à l'identification des modifications et notamment pour discriminer la réaction avec le malonaldéhyde. Par ailleurs, les spectres de fragmentation nous ont permis de localiser les modifications précisément. Ainsi, les adduits ont été localisés sur la fonction N-terminale pour le peptide angiotensine I et sur le résidu lysine pour la substance P.

L'interprétation des résultats obtenus après exposition à la phase gazeuse de la fumée d'une cigarette entière s'est avérée plus complexe. Concernant les deux peptides, des résultats similaires ont été observés. En effet, les adduits formés avec les quatre aldéhydes (FA, AA, ACR et CA) ont pu être identifiés quel que soit le peptide de départ. Nous avons par ailleurs observé une proportionnalité entre la concentration des aldéhydes au sein de la phase gazeuse de la fumée de cigarette et l'intensité des pics sur les spectres de masse. De plus, les spectres présentent de très nombreux adduits possédant des rapports m/z plus élevé. La composition chimique de ces adduits a pu être identifiée grâce à la précision de mesure des spectromètres de masse utilisés pour l'analyse mais également grâce aux informations obtenues après la réduction au $NaBD_3CN$. Enfin, de nouveaux adduits ont pu être mis en évidence mais leur structure ainsi que les précurseurs réactionnels restent indéterminés.

La recherche des modifications de l'α-lactalbumine exposée à la phase gazeuse de la fumée de cigarette a été réalisée dans un premier temps par interrogation des banques de données puis par une analyse manuelle du spectre de masse. Nous avons pu identifier vingt-deux modifications dont trois correspondent à des oxydations et dix-neuf à des réactions avec les aldéhydes. Les trois oxydations ont été localisées sur les tryptophanes 79 et 137 ainsi que sur la méthionine 109. Les adduits aldéhydes, tous des bases de Schiff, ont été localisés sur les lysines 24, 112, 117, 133 et 141. En raison du nombre de lysines constituant la protéine, il n'y a pas eu de dimérisation des aldéhydes.

Ainsi, dans ce troisième chapitre, nous avons pu mettre en évidence l'importance voire la quasi exclusivité de la chimie des aldéhydes sur des biomolécules. Par ailleurs, nous avons montré qu'il était indispensable de travailler en spectrométrie de masse haute résolution. En effet, les précisions de mesure que nous avons observées au cours de ces analyses se sont révélées être un atout majeur à l'identification des modifications car elles nous ont permis de confirmer les structures des différents adduits formés et donc les précurseurs réactionnels.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail de thèse était d'identifier les modifications de peptides et protéines standards induites par la phase gazeuse de la fumée de cigarette par spectrométrie de masse haute résolution. Pour cela, différents points ont dû être développés : l'analyse des standards sur les spectromètres de masse MALDI-TOF-TOF et nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR, le développement de réactions modèles et l'exposition à la fumée de cigarette.

Le développement des analyses des standards protéiques nous a permis d'optimiser les paramètres techniques à utiliser pour obtenir un maximum d'information sur les spectres avec une précision de mesure de l'ordre du ppm. Pour la protéine, il s'est avéré essentiel de réaliser les analyses à partir du digest protéique.

Comme la fumée de cigarette est un aérosol complexe, il a été indispensable de réaliser des réactions modèles. Pour cela, nous avons sélectionné les espèces réactives majoritaires soit deux espèces radicalaires (radicaux nitroxyl et hydroxyle) et six aldéhydes (formaldéhyde, acétaldéhyde, acroléine, crotonaldéhyde, malonaldéhyde et glyoxal). Ces modèles nous ont permis de répertorier les modifications engendrées pour chacun de ces réactifs. Cela inclut la structure chimique de chaque modification, c'est-à-dire l'adduit formé, ainsi que sa localisation.

Ainsi :

- Les réactions avec le radical hydroxyle engendrent des oxydations (+15,99 Da) sur les résidus tryptophane, histidine, méthionine et tyrosine.
- La réaction avec le radical nitroxyl entraine des mono- ou di-substitution par des groupements NO_2 sur le cycle aromatique du résidu tyrosine.
- Les réactions avec les aldéhydes saturés entrainent la formation de base de Schiff sur les résidus lysines pour la substance P et l'α-lactalbumine et sur la fonction N-terminale pour l'angiotensine I.
- Les réactions avec les aldéhydes insaturés forment des bases de Schiff majoritairement et des adduits de Michael. Des produits issus de rétroaldolisation ont également été identifiés.

Nous avons ensuite appliqué les techniques d'analyse développées aux échantillons exposés à la phase gazeuse de la fumée de cigarette. De nombreux adduits ont pu être identifiés. Ces adduits sont principalement issus des réactions avec cinq aldéhydes présents dans la fumée de cigarette : le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'acroléine, le crotonaldéhyde et le glyoxal. Les peptides exposés à la fumée de cigarette réagissent en formant à la fois des bases de Schiff et des adduits de Michael comme cela a pu être observé avec les réactions modèles. Par ailleurs, cette application a montré qu'il existe aussi la formation de dimères d'aldéhydes. Nous avons également mis en évidence la formation de nouveaux adduits. La haute résolution de l'analyseur de masse FT-ICR nous a permis de leur attribuer une formule chimique. Leurs précurseurs n'ont pas tous été identifiés mais ce résultat montre bien qu'il existe d'autres composés réactifs au sein de la phase gazeuse de la fumée de cigarette. Les localisations des modifications sont en corrélation avec les résultats obtenus à partir des réactions modèles c'est-à-dire la fonction N-terminale pour l'angiotensine I et le résidu lysine pour la substance P. Nous avons ensuite soumis la protéine à la phase gazeuse de la fumée de cigarette. Nous avons de nouveau mis en évidence une forte réactivité vis-à-vis des aldéhydes. Il est intéressant de noter que nous avons observé uniquement des bases de Schiff provenant du formaldéhyde, de l'acétaldéhyde, de l'acroléine et du crotonaldéhyde. Ces adduits ont été localisés sur les lysines 24, 32, 112, 117, 133 et 141. Ainsi, cette étude montre que la carbonylation des protéines induite par les aldéhydes présents dans la fumée de cigarette est prépondérante.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons donc mis en place une méthode permettant d'induire des modifications de protéines à partir de la fumée de cigarette. L'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution nous a permis d'identifier avec certitude les adduits formés ainsi que leur localisation. Ce modèle d'étude offre de nouvelles perspectives pour l'étude de l'impact de la fumée de cigarette sur le protéome.

Perspectives

L'étude réalisée pendant ce travail de thèse ouvre plusieurs perspectives. Tout d'abord, il serait intéressant de poursuivre le développement de réactions modèles sur les standards protéiques. Cela nous permettrait de vérifier la structure des adduits formés *in-situ* par l'acrylonitrile et le cuivre. Par ailleurs, il est d'une grande importance d'identifier les précurseurs réactionnels dont la formule des adduits a été caractérisée. Grâce aux réactions modèles développées lors de ce travail et les données présentes dans la littérature, il a été montré que la quantité d'aldéhyde présent dans le milieu influe sur la modification des protéines. Ainsi, il parait pertinent de réaliser les réactions modèles en utilisant une quantité d'aldéhydes proche de celle contenue dans la phase gazeuse de la fumée de cigarette). Cela inclut les réactions avec les aldéhydes isolés mais également avec un mélange de ces composés.

Les études réalisées sur l'impact de la fumée de cigarette sur des protéines standards nous ont permis de mettre en évidence la prédominance des carbonylations des protéines par les aldéhydes. Or il semble que l'introduction d'un dérivé carbonyle peut modifier la conformation d'une protéine et par conséquent son activité. Dès lors, la carbonylation d'une protéine peut devenir un biomarqueur de l'état de stress oxydatif d'un organisme. Ainsi, il serait intéressant d'appliquer notre stratégie d'analyse à un modèle plus complexe, une cellule. Les cellules épithéliales bronchiques apparaissent comme un modèle de choix. En effet, les tissus constituant les poumons sont les cibles principales aux attaques des composants de la fumée de cigarette. Pour cela, il faudrait développer une analyse protéomique classique incluant l'extraction du matériel protéique des cellules épithéliales exposées ou non à la fumée de cigarette, l'électrophorèse bidimensionnelle ainsi que l'analyse par spectrométrie de masse. Ces expériences pourraient être complétées par une étude quantitative en utilisant la technique de 2D-DIGE. Enfin, il faudrait étendre cette approche au protéome plasmatique d'un fumeur. Cela faciliterait en effet l'étude d'un biomarqueur potentiel en vue de sa validation, notamment en termes de collecte d'échantillon.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Kahn, P., *Science* 1995, *270*, 369-370.
[2] Anderson, N. L., Anderson, N. G., *Electrophoresis* 1998, *19*, 1853-1861.
[3] Gow, A. J., McClelland, M., Garner, S. E., Malcolm, S., Ischiropoulos, H., *Methods in Molecular Biology (Totowa, New Jersey)* 1998, *100*, 291-299.
[4] Hernandez, P., Muller, M., Appel, R. D., *Mass Spectrometry Reviews* 2006, *25*, 235-254.
[5] Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F., *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 1987, *78*, 53-68.
[6] Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S.*, et al.*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1988, *2*, 151-153.
[7] Karas, M., Krüger, R., *Chemical Reviews* 2003, *103*, 427-440.
[8] Kebarle, P., Tang, L., *Anal. Chem.* 1993, *65*, 972A-986A.
[9] Luo, Y., Li, T., Yu, F., Kramer, T., Cristea, I. M., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, *21*, 34-46.
[10] Ouvry-Patat, S. A., Torres, M. P., Gelfand, C. A., Quek, H. H.*, et al.*, *Methods in Molecular Biology (Totowa, NJ, United States)* 2009, *492*, 215-231.
[11] Wiley, W. C., McLaren, I. H., *Review of Scientific Instruments* 1955, *26*, 1150-1157.
[12] Medzihradszky, K. F., Campbell, J. M., Baldwin, M. A., Falick, A. M.*, et al.*, *Anal. Chem.* 2000, *72*, 552-558.
[13] Karlsson, K. E., Novotny, M., *Anal Chem* 1988, *60*, 1662-1665.
[14] Yamashita, M., Fenn, J. B., *Journal of Physical Chemistry* 1984, *88*, 4451-4459.
[15] Wilm, M. S., Mann, M., *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 1994, *136*, 167-180.
[16] Wilm, M., Mann, M., *Anal. Chem.* 1996, *68*, 1-8.
[17] Kebarle, P., Verkerk, U. H., *Mass Spectrometry Reviews* 2009, *28*, 898-917.
[18] Hipple, J. A., Sommer, H., Thomas, H. A., *Physical Review* 1949, *76*, 1877.
[19] Comisarow, M. B., Marshall, A. G., *Chemical Physics Letters* 1974, *26*, 489-490.
[20] Comisarow, M. B., Marshall, A. G., *Canadian Journal of Chemistry* 1974, *52*, 1997-1999.
[21] Comisarow, M. B., Marshall, A. G., *Chemical Physics Letters* 1974, *25*, 282-283.
[22] Nikolaev, E. N., Gorshkov, M. V., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 1985, *64*, 115-125.
[23] Marshall, A. G., Hendrickson, C. L., Jackson, G. S., *Mass Spectrometry Reviews* 1998, *17*, 1-35.
[24] Gorshkov, M. V., Marshall, A. G., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1993, *4*, 855-868.
[25] Nikolaev, E. N., Heeren, R. M. A., Popov, A. M., Pozdneev, A. V., Chingin, K. S., *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007, *21*, 3527-3546.
[26] Shi, S. D. H., Drader, J. J., Freitas, M. A., Hendrickson, C. L., Marshall, A. G., *International Journal of Mass Spectrometry* 2000, *195/196*, 591-598.
[27] Emmett, M. R., Kazazic, S., Marshall, A. G., Greig, M. J., (Florida State University Research Foundation, USA). Application: US
US 2010, pp. 11pp , Cont -in-part of U S Ser No 672,789.
[28] Ferrario, C. M., Chappell, M. C., Dean, R. H., Iyer, S. N., *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1998, *9*, 1716-1722.
[29] Chang, M. M., Leeman, S. E., *Journal of Biological Chemistry* 1970, *245*, 4784-4790.
[30] Chang, M. M., Leeman, S. E., *Nature (London), New Biology* 1971, *232*, 86-87.

[31] Qin, X.-Z., Yuan, Y., *International Journal of Mass Spectrometry* 2004, *237*, 123-133.
[32] Zherelova, O. M., Kataev, A. A., Grishchenko, V. M., Knyazeva, E. L.*, et al.*, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2009, *41*, 229-237.
[33] Permyakov, E. A., Berliner, L. J., *FEBS Lett.* 2000, *473*, 269-274.
[34] Brew, K., Castellino, F. J., Vanaman, T. C., Hill, R. L., *Journal of Biological Chemistry* 1970, *245*, 4570-4582.
[35] Dube, M. F. R., Green, C. R., *Rec Adv Tob Sci* 1982, *8*, 42-102.
[36] Southorn, P. A., Powis, G., *Mayo Clinic Proceedings* 1988, *63*, 381-389.
[37] Halliwell, B., *Journal of the Royal Society of Medicine* 1989, *82*, 747-752.
[38] Ohshima, H., Tatemichi, M., Sawa, T., *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003, *417*, 3-11.
[39] Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S., Aruoma, O. I., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1995, *35*, 7-20.
[40] Davies, M. J., *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics* 2005, *1703*, 93-109.
[41] Cadet, J., Bardet, M., Berger, M., Berthod, T.*, et al.*, *NATO ASI Series, Series A: Life Sciences* 1999, *302*, 47-58.
[42] Pre, J., *Pathologie Biologie* 1991, *39*, 716-736.
[43] Aldini, G., Dalle-Donne, I., Facino, R. M., Milzani, A., Carini, M., *Medicinal Research Reviews* 2007, *27*, 817-868.
[44] Ying, J., Clavreul, N., Sethuraman, M., Adachi, T., Cohen, R. A., *Free Radical Biology & Medicine* 2007, *43*, 1099-1108.
[45] Davies, M. J., Fu, S., Wang, H., Dean, R. T., *Free Radical Biology & Medicine* 1999, *27*, 1151-1163.
[46] Chao, C.-C., Ma, Y.-S., Stadtman, E. R., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, *94*, 2969-2974.
[47] Southorn, P. A., Powis, G., *Mayo Clinic Proceedings* 1988, *63*, 390-408.
[48] Ischiropoulos, H., Beckman, J. S., *Journal of Clinical Investigation* 2003, *111*, 163-169.
[49] Butterfield, D. A., Lauderback, C. M., *Free Radical Biology & Medicine* 2002, *32*, 1050-1060.
[50] Butterfield, D. A., *Brain Research* 2004, *1000*, 1-7.
[51] Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H., *Free Radical Biology & Medicine* 1991, *11*, 81-128.
[52] Uchida, K., *Progress in Lipid Research* 2003, *42*, 318-343.
[53] Stadtman, E. R., *Annual Review of Biochemistry* 1993, *62*, 797-821.
[54] Stadtman, E. R., Berlett, B. S., *Free Radical Toxicology* 1997, 71-87.
[55] Stadtman, E. R., Levine, R. L., *Amino Acids* 2003, *25*, 207-218.
[56] Picot, C. R., Petropoulos, I., Friguet, B., *NATO Science Series, Series I: Life and Behavioural Sciences* 2005, *367*, 83-92.
[57] Molnar, G. A., Nemes, V., Biro, Z., Ludany, A.*, et al.*, *Free Radical Res.* 2005, *39*, 1359-1366.
[58] Headlam, H. A., Davies, M. J., *Free Radical Biology & Medicine* 2002, *32*, 1171-1184.
[59] Headlam, H. A., Davies, M. J., *Free Radical Biology & Medicine* 2004, *36*, 1175-1184.
[60] Peluffo, G., Radi, R., *Cardiovascular Research* 2007, *75*, 291-302.
[61] Reznick, A. Z., Cross, C. E., Hu, M. L., Suzuki, Y. J.*, et al.*, *Biochemical Journal* 1992, *286*, 607-611.

[62] Petruzzelli, S., Puntoni, R., Mimotti, P., Pulera, N.*, et al.*, *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997, *156*, 1902-1907.
[63] Riordan, J. F., Sokolovsky, M., Vallee, B. L., *Biochemistry* 1967, *6*, 3609-3617.
[64] Sokolovsky, M., Riordan, J. F., Vallee, B. L., *Biochemistry* 1966, *5*, 3582-3589.
[65] Petersson, A.-S., Steen, H., Kalume, D. E., Caidahl, K., Roepstorff, P., *Journal of Mass Spectrometry* 2001, *36*, 616-625.
[66] Sarver, A., Scheffler, N. K., Shetlar, M. D., Gibson, B. W., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2001, *12*, 439-448.
[67] Ichihashi, K., Osawa, T., Toyokuni, S., Uchida, K., *The Journal of biological chemistry* 2001, *276*, 23903-23913.
[68] Wilbourn, J., Heseltine, E., Moller, H., *Scandinavian journal of work, environment & health* 1995, *21*, 229-232.
[69] Metz, B., Kersten, G. F. A., Hoogerhout, P., Brugghe, H. F.*, et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 2004, *279*, 6235-6243.
[70] Means, G. E., Feeney, R. E., *Anal Biochem* 1995, *224*, 1-16.
[71] Sinz, A., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, No pp yet given.
[72] Qiu, H., Wang, Y., *J. Proteome Res.* 2009, *8*, 1983-1991.
[73] Wang, M., McIntee, E. J., Cheng, G., Shi, Y.*, et al.*, *Chemical Research in Toxicology* 2000, *13*, 1149-1157.
[74] Matter, B., Guza, R., Zhao, J., Li, Z.-Z.*, et al.*, *Chemical Research in Toxicology* 2007, *20*, 1379-1387.
[75] Hecht, S. S., McIntee, E. J., Wang, M., *Toxicology* 2001, *166*, 31-36.
[76] Birt, J. E. E. C., Shuker, D. E. G., Farmer, P. B., *Chemical Research in Toxicology* 1998, *11*, 136-142.
[77] Bootorabi, F., Janis, J., Valjakka, J., Isoniemi, S.*, et al.*, *BMC biochemistry* 2008, *9*, 32.
[78] Mauch, T. J., Donohue, T. M., Jr., Zetterman, R. K., Sorrell, M. F., Tuma, D. J., *Hepatology (Baltimore, Md.)* 1986, *6*, 263-269.
[79] Nakamura, K., Iwahashi, K., Furukawa, A., Ameno, K.*, et al.*, *Archives of Toxicology* 2003, *77*, 591-593.
[80] Lo Pachin, R. M., Gavin, T., Petersen, D. R., Barber, D. S., *Chemical Research in Toxicology* 2009, *22*, 1499-1508.
[81] Uchida, K., Kanematsu, M., Morimitsu, Y., Osawa, T.*, et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 1998, *273*, 16058-16066.
[82] Witz, G., *Free Radic Biol Med* 1989, *7*, 333-349.
[83] Aldini, G., Dalle-Donne, I., Vistoli, G., Facino, R. M., Carini, M., *Journal of Mass Spectrometry* 2005, *40*, 946-954.
[84] Beretta, G., Arlandini, E., Artali, R., Anton, J. M. G., Maffei Facino, R., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008, *47*, 596-602.
[85] Kurtz, A. J., Lloyd, R. S., *Journal of Biological Chemistry* 2003, *278*, 5970-5976.
[86] Kozekov, I. D., Nechev, L. V., Moseley, M. S., Harris, C. M.*, et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, *125*, 50-61.
[87] Chan, K., Poon, R., O'Brien, P. J., *Journal of Applied Toxicology* 2008, *28*, 1027-1039.
[88] Tamamizu-Kato, S., Wong, J. Y., Jairam, V., Uchida, K.*, et al.*, *Biochemistry* 2007, *46*, 8392-8400.
[89] Fujioka, K., Shibamoto, T., *Environmental Toxicology* 2006, *21*, 47-54.
[90] Cai, J., Bhatnagar, A., Pierce, W. M., *Chemical Research in Toxicology* 2009, *22*, 708-716.

[91] Dong, J.-Z., Glass, J. N., Moldoveanu, S. C., *Journal of Microcolumn Separations* 2000, *12*, 142-152.
[92] Liu, X.-y., Yang, Z.-h., Pan, X.-j., Zhu, M.-x., Xie, J.-p., *Toxicology Letters* 2010, *197*, 113-122.
[93] Slatter, D. A., Avery, N. C., Bailey, A. J., *Journal of Biological Chemistry* 2004, *279*, 61-69.
[94] Ishii, T., Kumazawa, S., Sakurai, T., Nakayama, T., Uchida, K., *Chemical Research in Toxicology* 2006, *19*, 122-129.
[95] Long, J., Wang, X., Gao, H., Liu, Z.*, et al.*, *Life Sci.* 2006, *79*, 1466-1472.
[96] Lederer, M. O., Klaiber, R. G., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1999, *7*, 2499-2507.
[97] Miller Antonia, G., Gerrard Juliet, A., *Ann N Y Acad Sci* 2005, *1043*, 195-200.
[98] Frye, E. B., Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R., Baynes, J. W., *Journal of Biological Chemistry* 1998, *273*, 18714-18719.
[99] Cotham, W. E., Metz, T. O., Ferguson, P. L., Brock, J. W. C.*, et al.*, *Molecular and Cellular Proteomics* 2004, *3*, 1145-1153.
[100] Beckman, J. S., *Chemical Research in Toxicology* 1996, *9*, 836-844.
[101] Lee, S. J., Lee, J. R., Kim, Y. H., Park, Y. S.*, et al.*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007, *21*, 2797-2804.
[102] Carre, V., Aubriet, F., Muller, J.-F., *Anal. Chim. Acta* 2005, *540*, 257-268.
[103] Church, D. F., Pryor, W. A., *Environ Health Perspect* 1985, *64*, 111-126.
[104] Cueto, R., Pryor, W. A., *Vibrational Spectroscopy* 1994, *7*, 97-111.
[105] Lyons, M. J., Gibson, J. F., Ingram, D. J., *Nature* 1958, *181*, 1003-1004.
[106] Pryor, W. A., Prier, D. G., Church, D. F., *Environ Health Perspect* 1983, *47*, 345-355.
[107] Bartalis, J., Chan, W. G., Wooten, J. B., *Analytical Chemistry (Washington, DC, United States)* 2007, *79*, 5103-5106.
[108] Pryor, W. A., Stone, K., Zang, L.-Y., Bermudez, E., *Chemical Research in Toxicology* 1998, *11*, 441-448.
[109] Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2009, *6*, 445-462.
[110] Cosgrove, J. P., Borish, E. T., Church, D. F., Pryor, W. A., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1985, *132*, 390-396.
[111] Lu, X., Cai, J., Kong, H., Wu, M.*, et al.*, *Anal. Chem.* 2003, *75*, 4441-4451.
[112] Parrish, M. E., Lyons-Hart, J. L., Shafer, K. H., *Vibrational Spectroscopy* 2001, *27*, 29-42.
[113] Eiserich, J., Vossen, V., O'Neill, C. A., Halliwell, B.*, et al.*, *FEBS Letters* 1994, *353*, 53-56.
[114] Pignatelli, B., Li, C.-Q., Boffetta, P., Chen, Q.*, et al.*, *Cancer Research* 2001, *61*, 778-784.
[115] Panda, K., Chattopadhyay, R., Chattopadhyay, D., Chatterjee, I. B., *Toxicology Letters* 2001, *123*, 21-32.
[116] Nagler, R., Lischinsky, S., Diamond, E., Drigues, N.*, et al.*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000, *379*, 229-236.
[117] Colombo, G., Aldini, G., Orioli, M., Giustarini, D.*, et al.*, *Antioxidants & Redox Signaling* 2010, *12*, 349-364.
[118] Byrd, G. D., Fowler, K. W., Hicks, R. D., Lovette, M. E., Borgerding, M. F., *Journal of Chromatography* 1990, *503*, 359-368.
[119] Torrence, K. M., McDaniel, R. L., Self, D. A., Chang, M. J., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2002, *372*, 723-731.

ANNEXES

1. MATERIELS ET METHODES

1.1 Modifications *in vitro* de peptides et de protéines

a. Standards peptidiques et protéiques

Les différentes réactions de modifications ont été développées sur deux peptides : l'angiotensine I (Sigma-Aldrich) et la substance P (Sigma-Aldrich) et sur la protéine α-lactalbumine (Sigma-Aldrich). Les solutions mères sont préparées à 2 mg/mL soit dans du sérum physiologique pH 7 (NaCl 0,9 %) et sont conservées à -20°C.

Toutes les réactions de modifications ont été réalisées dans du sérum physiologique pH 7 et avec une concentration protéique finale fixée à 300 pmol/µL.

b. Oxydation

Les réactions d'oxydation ont été réalisées à partir du radical hydroxyle. Le radical hydroxyle est obtenu selon la réaction de Fenton par l'utilisation de peroxyde d'hydrogène (Riedel-De Haën) en présence de sulfate de fer III (Sigma-Aldrich). Le rapport molaire entre la protéine et le peroxyde d'hydrogène est fixé à 20 tandis que celui entre la protéine et le métal est de 1. Les tubes sont mis à incuber 2 h à 25°C.

c. Nitration

Les réactions de nitration ont été réalisées avec du tétranitrométhane (Sigma-Aldrich) connu pour relâcher du dioxyde d'azote ($NO_2°$) en solution aqueuse. L'excès molaire en tétranitrométhane est fixé à 5. Les paramètres d'incubation sont de 2 h à 25°C.

d. Formation d'adduits avec des aldéhydes

- *Solutions mères*

Le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'acroléine, le crotonaldéhyde et le glyoxal proviennent de Sigma Aldrich. Le malonaldéhyde est obtenu par réaction du tétrametoxypropane dans une solution d'acide chlorhydrique à 0,01 M. La synthèse se fait pendant une nuit sous agitation magnétique.

- *Réactions*

Le rapport molaire entre la protéine et les différents aldéhydes est fixé à 1. Le temps de réaction est de 1 h et la température est de 25°C. L'échantillon protéique est ensuite réduit pendant 2 h à 25°C par ajout de 400 équivalents de cyanoborohydrure de sodium (Sigma Aldrich) et 0,01% d'acide chlorhydrique (Sigma Aldrich). Le même protocole a été utilisé pour la réduction au $NaBD_3CN$ (Sigma Aldrich).

e. Protocole de fumage

Les expériences de fumage sont réalisées avec une machine LM1 de Borgwaldt kc à laquelle un système de bullage a été adapté. Les cigarettes sont fumées selon les paramètres suivant : une bouffée de 35 mL d'une durée de 2 s toutes les 58 s avec un profil de cloche. La solution de bullage correspond à 1 mL de tampon contenant la protéine ou le peptide à une concentration de 300 pmol/µL. Après le fumage, la solution de bullage est immédiatement congelée.

f. Traitement à l'éthanolamine

Après exposition à la phase gazeuse de la fumée de cigarette, 1000 équivalents d'éthanolamine (Sigma) sont ajoutés dans le milieu. Le temps de réaction est de 20 min et la température est de 25°C.

g. Dessalage des échantillons

Les échantillons d'angiotensine I et de substance P sont dessalés sur Zip Tip C18. La phase est tout d'abord conditionnée par passage de 100 µL d'acétonitrile puis 100 µL d'eau milliQ à 0,1% d'acide formique. Le chargement de la phase se fait par environ 30 pipetages (allers-retours) de 10 µL d'échantillon dilués à 1 pmol/µL dans de l'eau milliQ à 0,1% d'acide formique. La phase est lavée par 10 µL d'eau milliQ à 0,1% d'acide formique (10 allers-retours) et éluée par 10 µL d'un mélange acétonitrile/eau milliQ à 0,1% d'acide formique (50/50 v/v) (30 allers-retours). Les échantillons sont ensuite évaporés à sec et repris dans 10 µL de tampon A (94,9% d'eau milliQ, 5% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique)

Les échantillons d'α-lactalbumine sont dessalés sur Microcon 3kDa de Millipore. L'échantillon est déposé sur la membrane et centrifugé pendant 45 min à 9000 tours/min et 25°C. La membrane est ensuite retournée, placée dans un nouvel ependorf et centrifugée 3 min à 9000 tours/min et 25°C.

h. Hydrolyse enzymatique en solution

L'échantillon protéique est préparé à une concentration de 1 mg/mL, il est dilué au dixième dans un tampon de dénaturation contenant du Tris HCl à 50 mM, du DTT à 4 mM et du TFE à 60 % et chauffé à 70°C pendant 2 h. Les protéines sont ensuite alkylées avec 5 mM d'iodoacétamide pendant 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'échantillon est enfin dilué au dixième dans un tampon bicarbonate d'ammonium à 50 mM pH 8,8. Pour la digestion enzymatique, le rapport enzyme/protéine est fixé à 1/50. L'échantillon est alors incubé toute la nuit à 37°C. L'échantillon est ensuite évaporé et les peptides sont repris dans 10 µL d'eau milliQ à 0,1% d'acide formique.

1.2 Analyse par spectrométrie de masse

a. analyse MALDI-TOF-TOF

Les analyses MALDI-TOF-TOF ont été réalisées sur un ABI 4800 (Applied Biosystems) équipé d'un laser Nd-YAG de longueur d'onde 355 nm. Les analyses de peptides sont réalisées en mode positif réflectron. La matrice utilisée est de l'HCCA préparée à 5 mg/mL dans un mélange contenant 75% d'acétonitrile, 25% d'eau milliQ et 0,1% de TFA. L'échantillon et la matrice sont mélangés dans un eppendorf avec un rapport (1 : 1). 0,5 µL du mélange est déposé et co-cristallisé sur la cible MALDI par séchage à l'air et à température ambiante.

L'interprétation des spectres MS et MS^2 est effectuée avec le logiciel Data Explorer (Applied Biosystems). Toutes les identifications sont réalisées manuellement.

b. Analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR

- *nanoLC*

La séparation des digests protéiques avant analyse par nanoESI-FT-ICR-MS a été réalisée sur une chaine nanoLC (Dionex LC Packings). Elle se compose d'un passeur automatique d'échantillon Famos équipée d'une plaque réfrigérée, d'une pompe Switchos et d'une pompe quaternaire Ultimate. La boucle d'injection est de 10 µL et le mode d'injection est le mode pick up permettant de prélever 1 µL d'échantillon, le volume de la boucle étant complété par une phase aqueuse A (94,9% d'eau milliQ, 5% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique). L'échantillon est dessalé et concentré pendant trois minutes à un débit de 10 µL/min sur une colonne de préconcentration C18 possédant une longueur de de 5 mm, des pores 100Å, et un diamètre interne de 300 µm. L'élution est réalisée sur la nanocolonne analytique C18 possédant une longueur de 25 cm, des pores de 100Å et un diamètre interne de 3 µm à un débit de 170 µL/min avec la phase aqueuse A et une phase organique B (24,9% d'eau milliQ, 75% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique) suivant le gradient représenté sur la figure suivante.

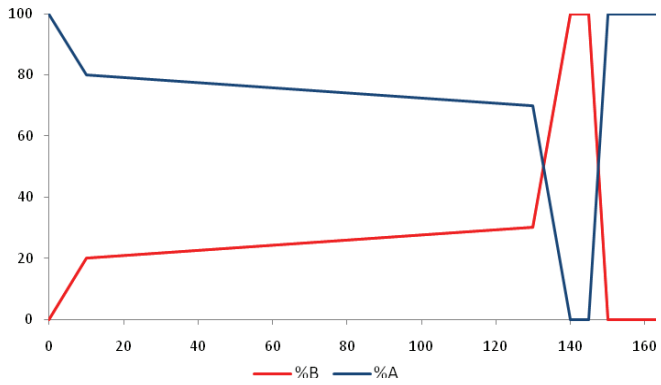


Figure a : Gradient utilisé pour la séparation chromatographique des protéines par nanoLC (phase aqueuse A : 94,9% eau milliQ, 5% acétonitrile, 0,1% acide formique ; phase organique B : 24,9% eau milliQ, 75% acétonitrile, 0,1% acide formique).

- *nanoESI-Qh-FT-ICR*

Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre de masse à transformée de Fourier possédant un aimant de 9,4 T et équipé d'une source nanoélectrospray (ApexQ, Bruker Daltonics). Les analyses ont été réalisées en mode d'ionisation positif. Les aiguilles nanoélectrospray utilisées proviennent de chez New Objective (Woburn, USA). Elles sont recouvertes d'un alliage conducteur et ont un diamètre interne de 20 µm. Une tension de 1650 V est appliquée sur l'aiguille pour la formation du spray. La température du capillaire est fixée à 180°C.

Les paramètres utilisés pour l'analyse de peptides sont décrits ci-après. L'accumulation des ions dans la cellule de collision en mode MS/MS se fait sur une durée de 1 s. La méthode d'acquisition consiste en un full scan MS entre m/z 288-2500 en mode large bande avec 512 k points de données.

Le retraitement de données est effectué avec le logiciel Data Analysis 3.2. L'interprétation des spectres a été réalisée manuellement pour les peptides Angiotensine I et substance P. Concernant la protéine α-lactalbumine, la déconvolution des spectres multichargés a été réalisée avec le logiciel MaxEnt. Les spectres correspondant au digest protéique ont été analysés de deux manières. Tout d'abord la génération des pics monoisotopiques a été réalisée avec le logiciel Automation (Bruker Daltonics) afin d'interroger les banques de données. Ensuite, les spectres ont été interprétés manuellement.

2. REDUCTION DES ECHANTILLONS AU $NaBD_3CN$

1. Modifications identifiées en MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à 1 eq de formaldéhyde et réduite au $NaBD_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
1296,69	1296,69	0,00	-0,1	
1311,71	1311,71	15,02	0,3	C(1)H(1)D(1)
1325,72	1325,72	29,04	-0,5	C(2)H(3)D(1)

2. Modifications identifiées en MALDI-TOF-TOF pour la substance P exposée à 1 eq de formaldéhyde et réduite au $NaBD_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
1347,74	1347,74	0,00	0,0	
1362,76	1362,76	15,02	-0,3	C(1)H(1)D(1)
1376,77	1376,77	29,04	0,5	C(2)H(3)D(1)

3. Modifications identifiées en MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à 1 eq d'acétaldéhyde et réduite au $NaBD_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
1296,69	1296,69	0,00	-0,1	
1311,71	1311,71	15,02	-0,7	C(1)H(1)D(1)
1325,72	1325,72	29,03	2,4	C(2)H(3)D(1)

4. Modifications identifiées en MALDI-TOF-TOF pour la substance P exposée à 1 eq d'acétaldéhyde et réduite au $NaBD_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
1347,74	1347,74	0,00	0,0	
1362,76	1362,76	15,03	-2,5	C(1)H(1)D(1)
1376,77	1376,77	29,04	-0,2	C(2)H(3)D(1)

5. Modifications identifiées en MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à 1 eq d'acroléine et réduite au $NaBD_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
1296,68	1296,69	0,00	0,1	
1340,74	1340,74	44,05	5,9	C(3)H(4)D(2)
1355,73	1355,73	59,05	0,7	C(3)H(3)D(2)O(1)
1414,77	1414,78	118,09	4,8	C(6)H(10)D(2)O(2)

6. Modifications identifiées en MALDI-TOF-TOF pour la substance P exposée à 1 eq d'acroléine et réduite au $NaBD_3CN$.

(m/z)exp	(m/z)th	madduit (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
1347,74	1347,74	0,00	0,0	
1363,73	1363,73	15,99	3,4	O(1)
1406,78	1406,78	59,04	3,2	C(3)H(5)D(1)O(1)

7. Modifications identifiées en MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à 1 eq de crotonaldéhyde et réduite au $NaBD_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
1296,69	1296,69	0,00	-0,1	
1354,75	1354,76	58,06	11,0	C(4)H(6)D(2)
1369,74	1369,71	73,05	-19,4	C(4)H(5)D(2)O(1)

8. Modifications identifiées en MALDI-TOF-TOF pour la substance P exposée à 1 eq de crotonaldéhyde et réduite au $NaBD_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
1347,74	1347,74	0,00	0,0	
1363,73	1363,73	15,99	2,9	O(1)
1405,81	1405,81	58,07	2,5	C(4)H(6)D(2)
1420,80	1420,80	73,07	-3,3	C(4)H(7)D(1)O(1)

9. Modifications identifiées en MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à 1 eq de malonaldéhyde et réduite au $NaBD_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
1296,69	1296,69	0,00	-0,1	
1356,73	1356,74	60,05	4,7	C(3)H(4)D(2)O(1)

10. Modifications identifiées en MALDI-TOF-TOF pour la substance P exposée à 1 eq de malonaldéhyde et réduite au $NaBD_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
1347,74	1347,74	0,00	0,0	
1407,80	1407,79	60,07	-9,5	C(3)H(4)D(2)O(1)

11. Modifications identifiées en MALDI-TOF-TOF pour l'angiotensine I exposée à 1 eq de glyoxal et réduite au $NaBD_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
1296,69	1296,69	0,00	-0,1	
1342,72	1342,72	46,03	3,1	C(2)H(2)D(2)O(1)

12. Modifications identifiées en MALDI-TOF-TOF pour la substance P exposée à 1 eq de glyoxal et réduite au $NaBD_3CN$.

$(m/z)_{exp}$	$(m/z)_{th}$	m_{adduit} (Da)	$(\Delta m/m)\times10^6$ (ppm)	Adduit
1347,74	1347,74	0,00	-0,1	
1363,73	1363,73	15,99	0,9	O(1)
1393,77	1393,77	46,03	6,6	C(2)H(2)D(2)O(1)

3. SPECTRES DE FRAGMENTATION

3.1 Spectres de fragmentation MALDI-TOF-TOF

Pour chaque spectre de fragmentation, la nomenclature suivante sera appliquée

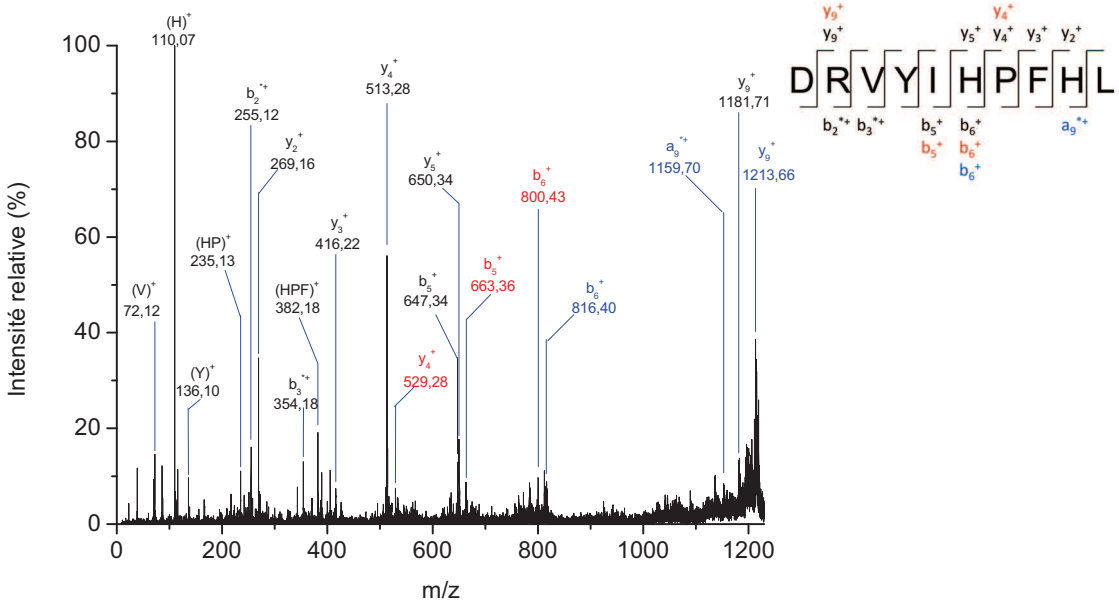
$b_x{}^{*+}$: $(b_x\text{-}NH_3)^+$

$b_x{}^{0+}$: $(b_x\text{-}H_2O)^+$

Et $b_x{}^+$: $(b_x + C_nH_nO_n)^+$ où x représente le numéro du fragment.

1. Spectre MS^2 MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine oxydée.

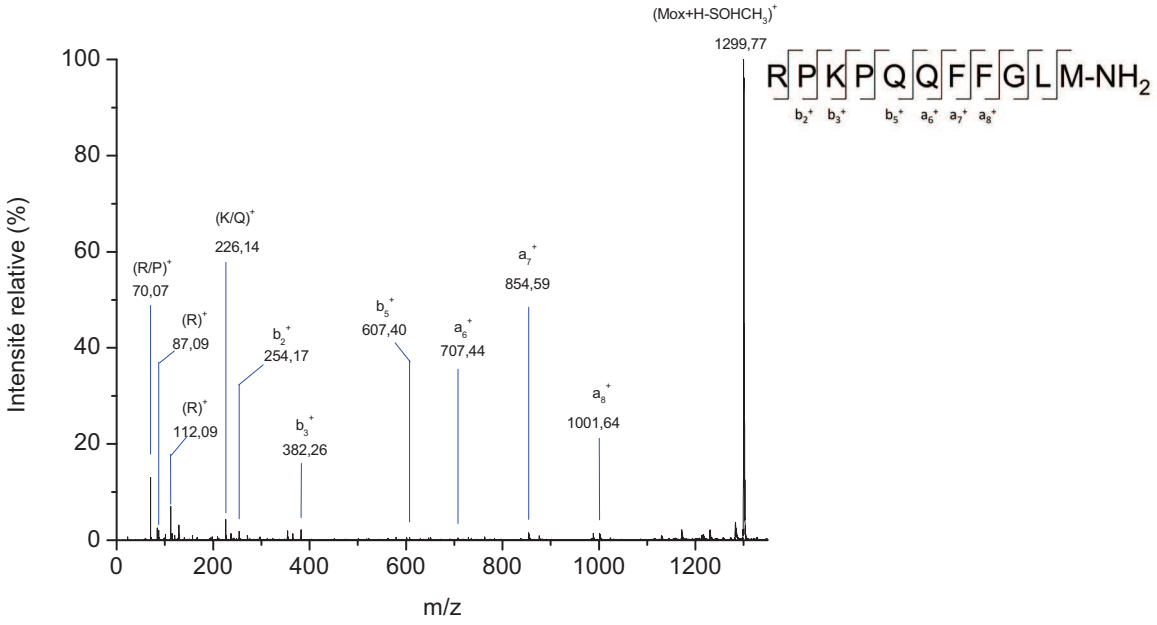
- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1328,72 : $(MH + O(2))^+$***



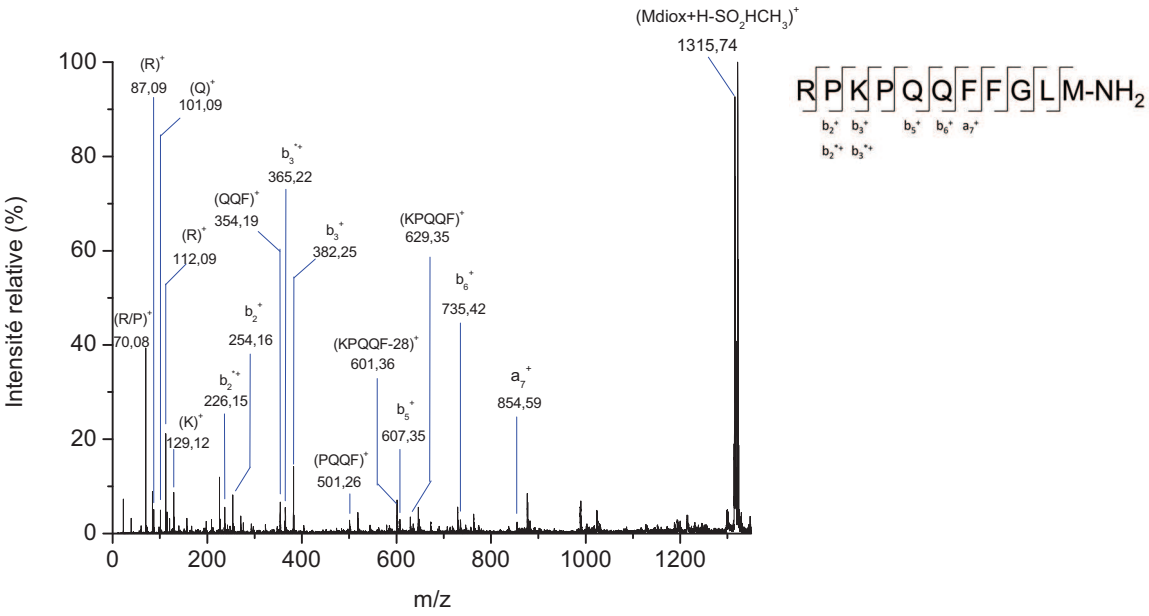
Les ions en bleu correspondent aux fragments identifiés avec une dioxydation.

2. Spectre MS^2 MALDI-TOF-TOF de la substance P oxydée.

- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1363,72 : $(MH + O)^+$***

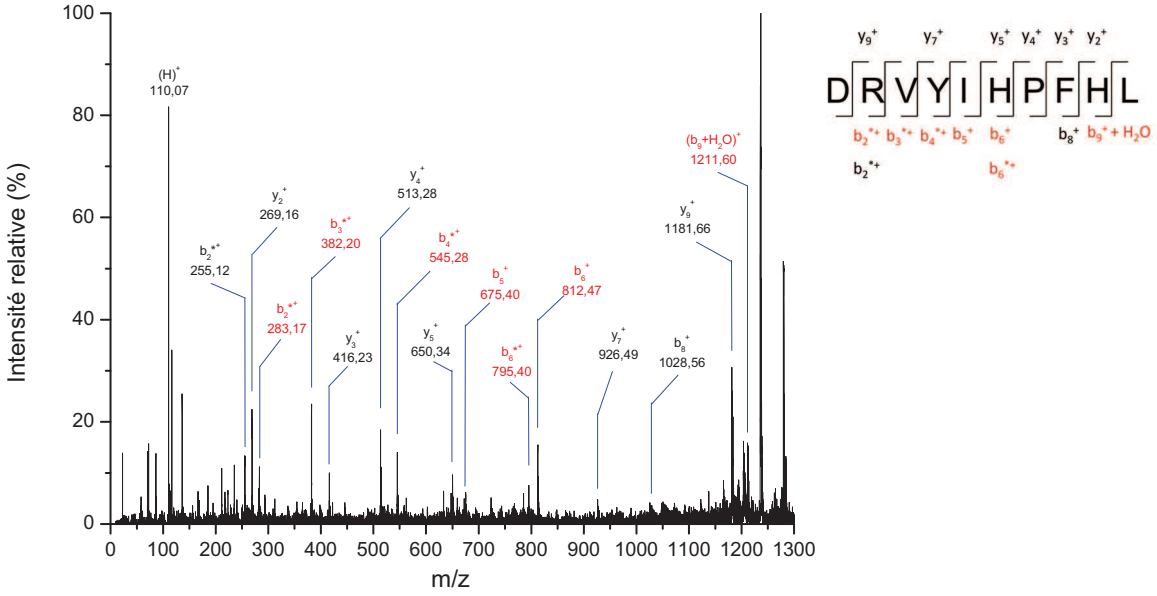


- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1379,72 : $(MH + O(2))^+$***



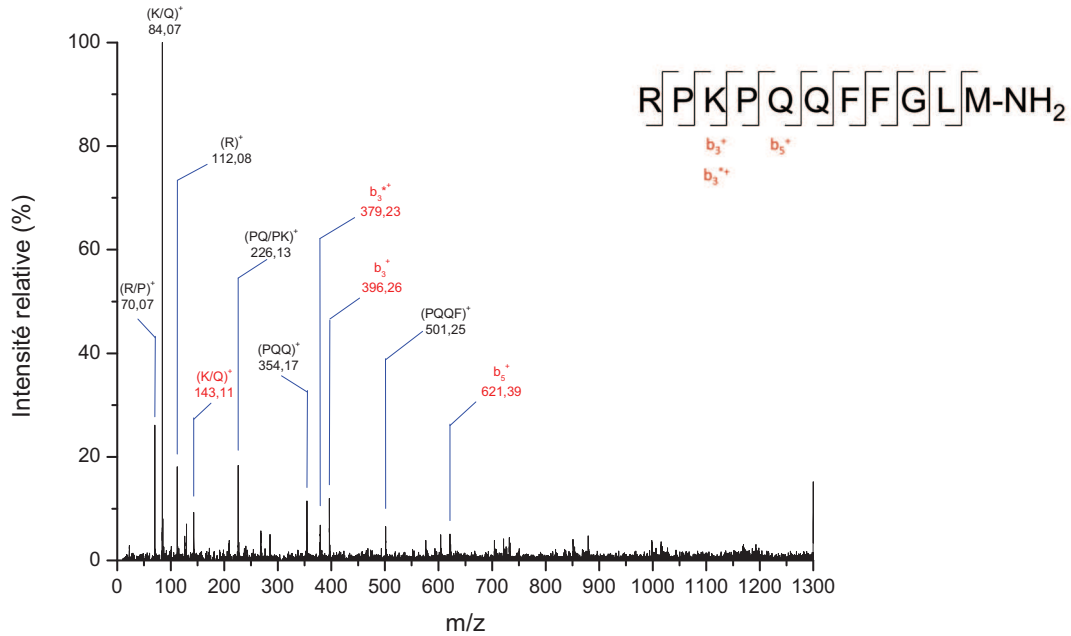
3. Spectre MS^2 MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq d'acétaldéhyde et réduite au $NaBH_3CN$.

- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1324,72 : $(MH + C_2H_4)^+$***



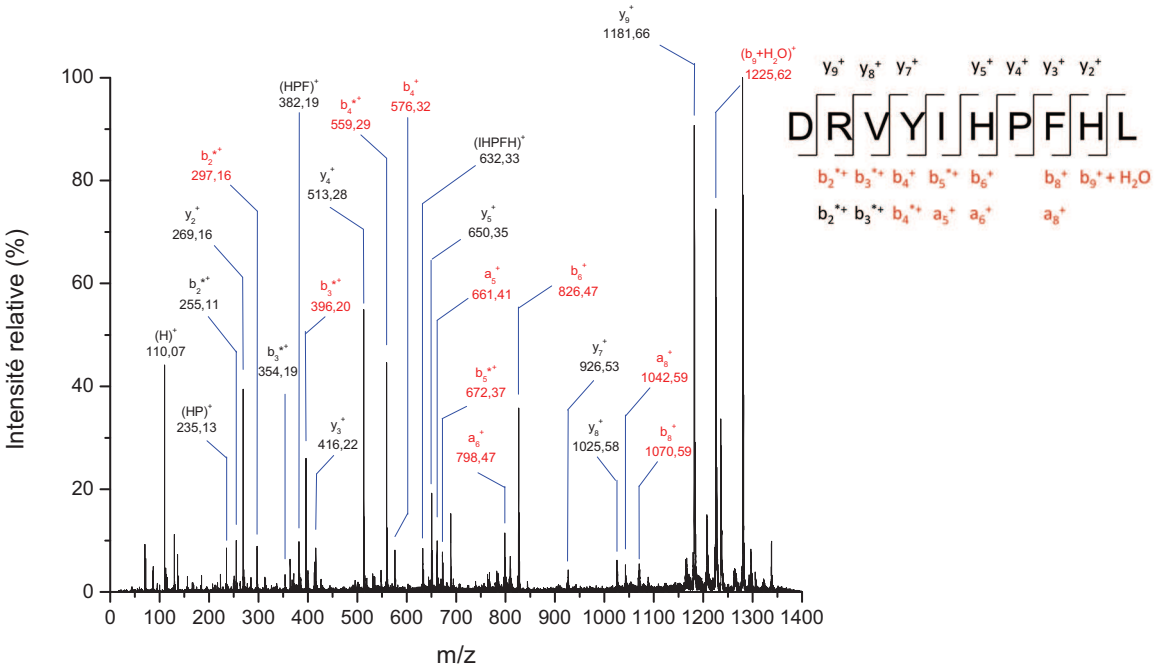
4. Spectre MS^2 MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée à 1 eq d'acétaldéhyde et réduite au $NaBH_3CN$.

- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1361,77 : $(MH + CH_2)^+$***

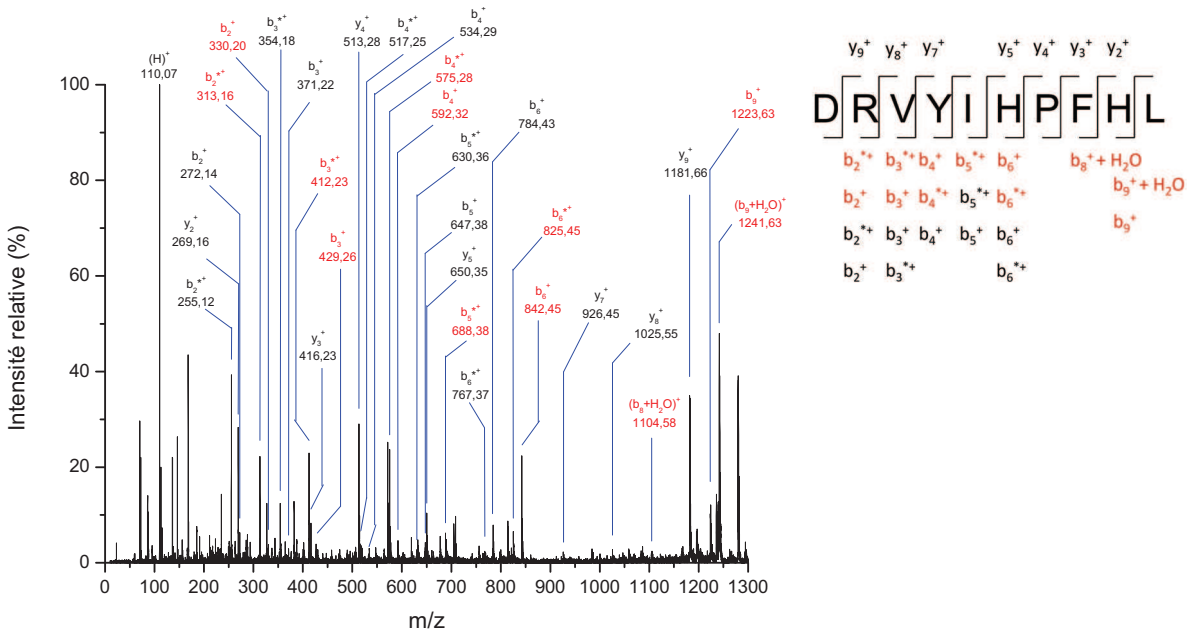


5. Spectres MS^2 MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq d'acroléine et réduite au $NaBH_3CN$.

- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1338,73 : $(MH + C_3H_6)^+$***

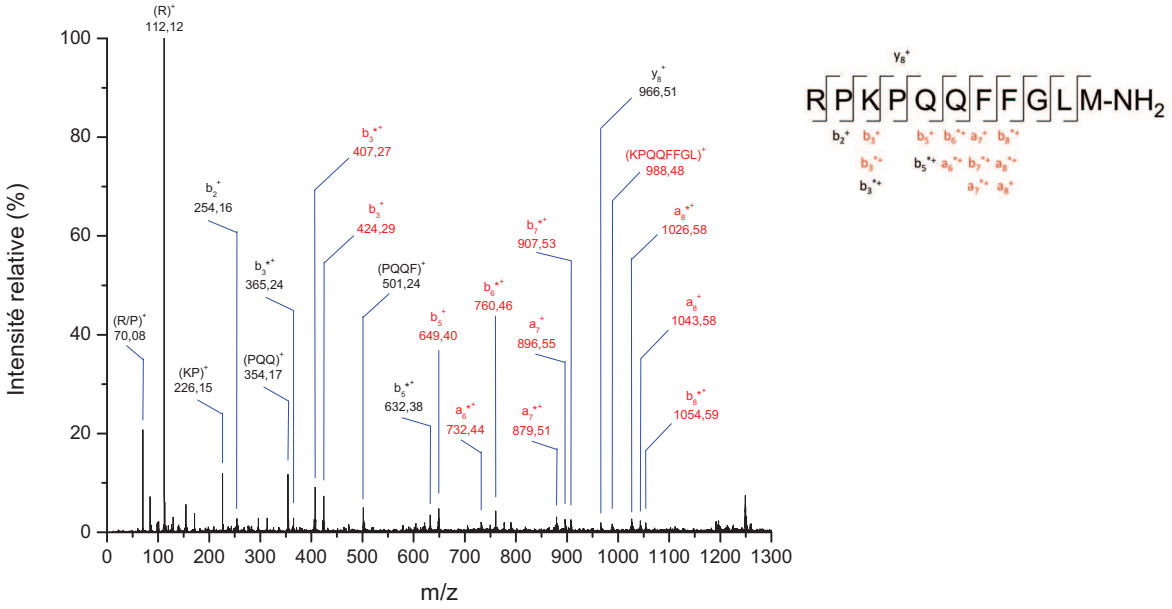


- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1354,73 : $(MH + C_3H_6O)^+$***

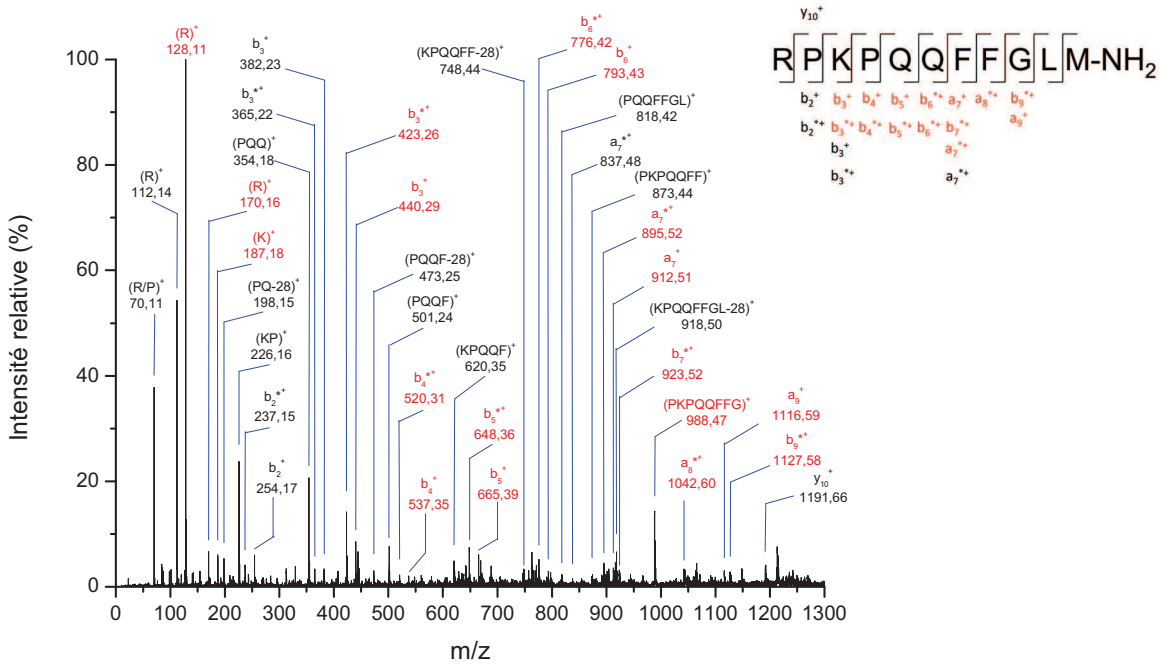


6. Spectres MS^2 MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée à 1 eq d'acroléine et réduite au $NaBH_3CN$.

- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1389,77 : $(MH + C_3H_6)^+$***

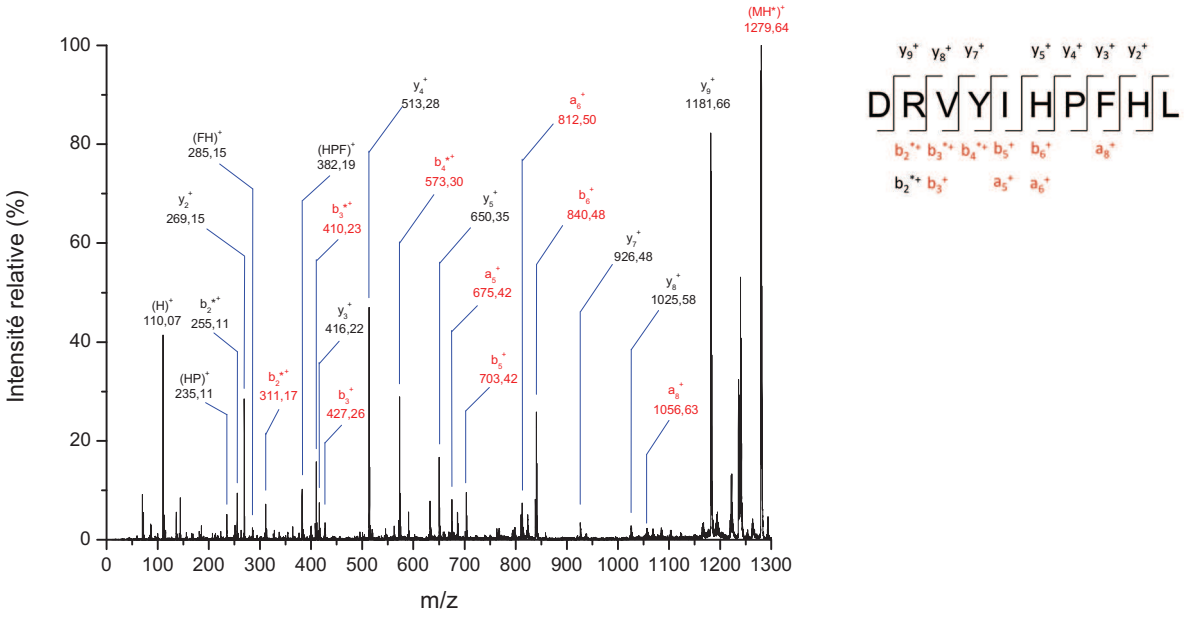


- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1405,75 : $(MH + C_3H_6O)^+$***

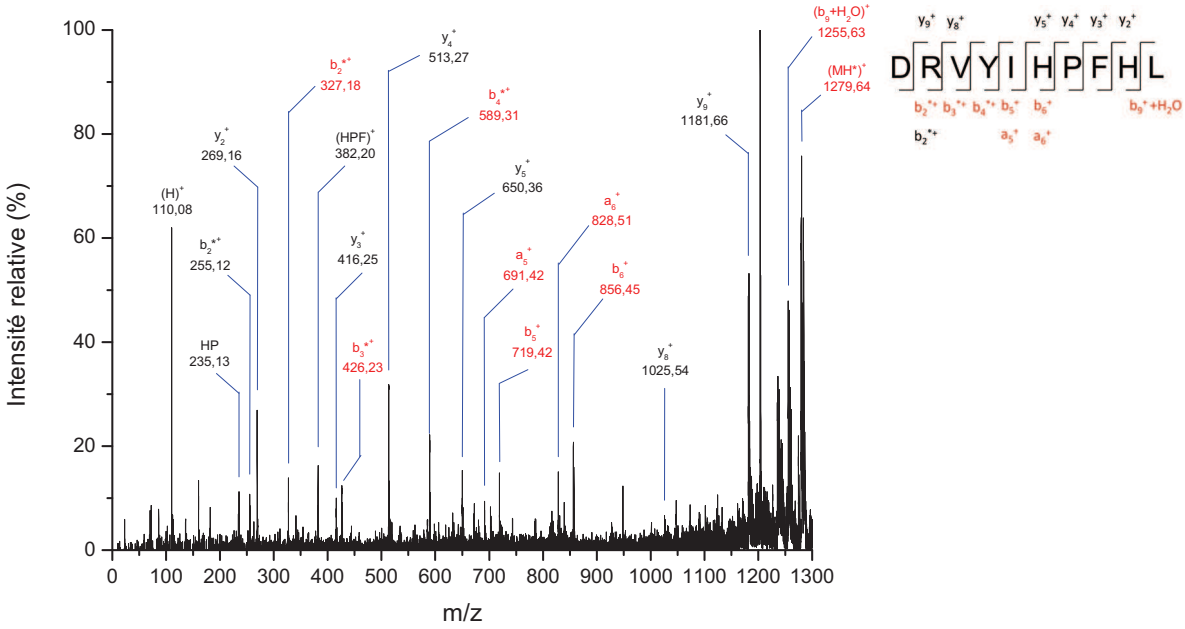


7. Spectre MS^2 MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq de crotonaldéhyde et réduite au $NaBH_3CN$.

- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1352,73 : $(MH + C_4H_8)^+$***

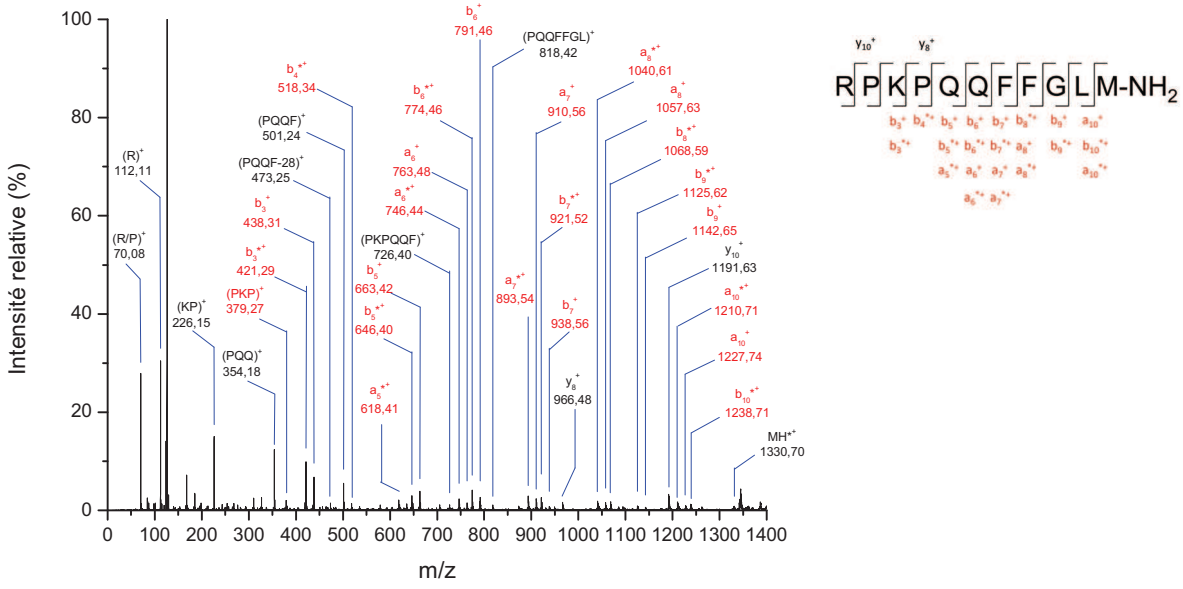


- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1368,74 : $(MH + C_4H_8O)^+$***

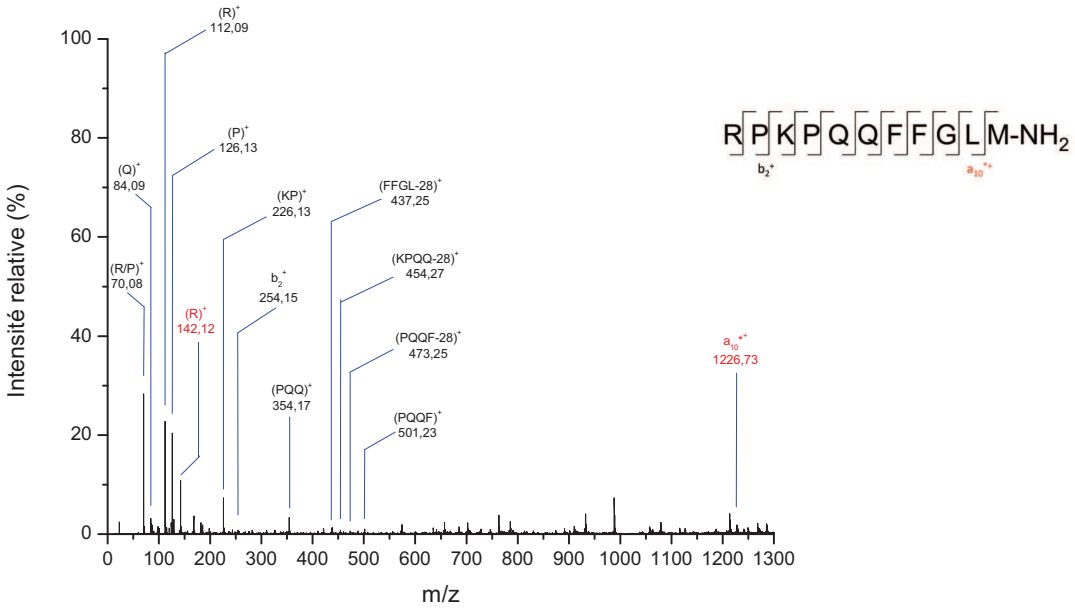


8. Spectres MS^2 MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée à 1 eq de crotonaldéhyde et réduite au $NaBH_3CN$.

- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1403,78 : $(MH + C_4H_8)^+$***

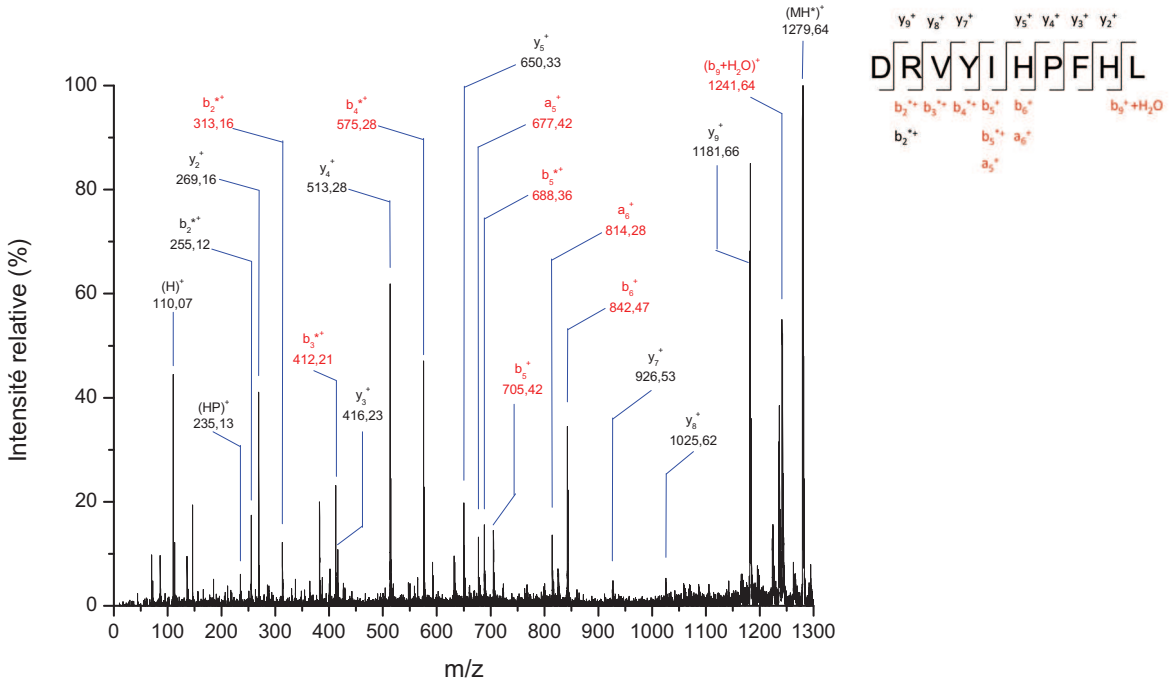


- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1419,77 : $(MH + C_4H_8O)^+$***



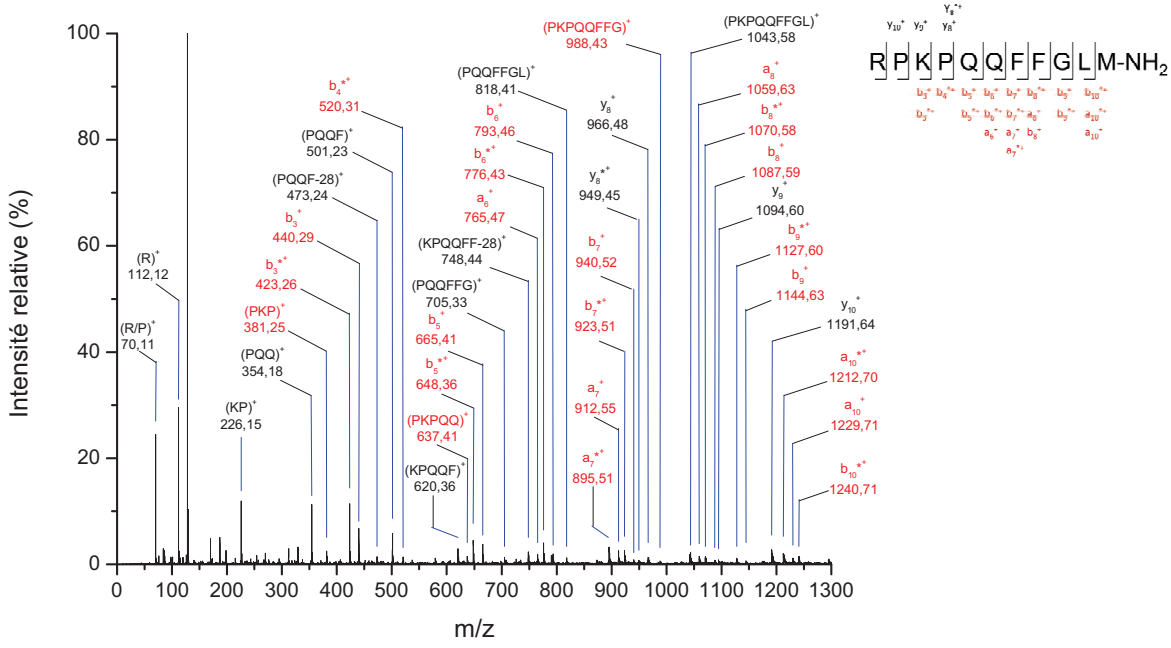
9. Spectre MS^2 MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq de malonaldéhyde et réduite au $NaBH_3CN$.

- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1354,72 : $(MH + C_3H_6O)^+$***



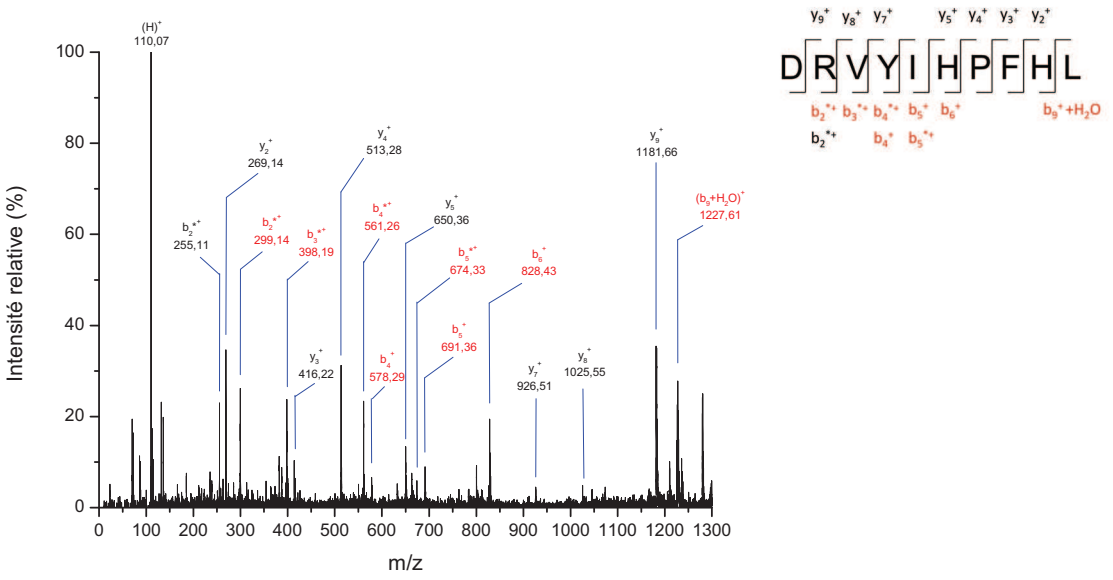
10. Spectre MS^2 MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée à 1 eq de malonaldéhyde et réduite au $NaBH_3CN$.

- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1405,76 : $(MH + C_3H_6O)^+$***



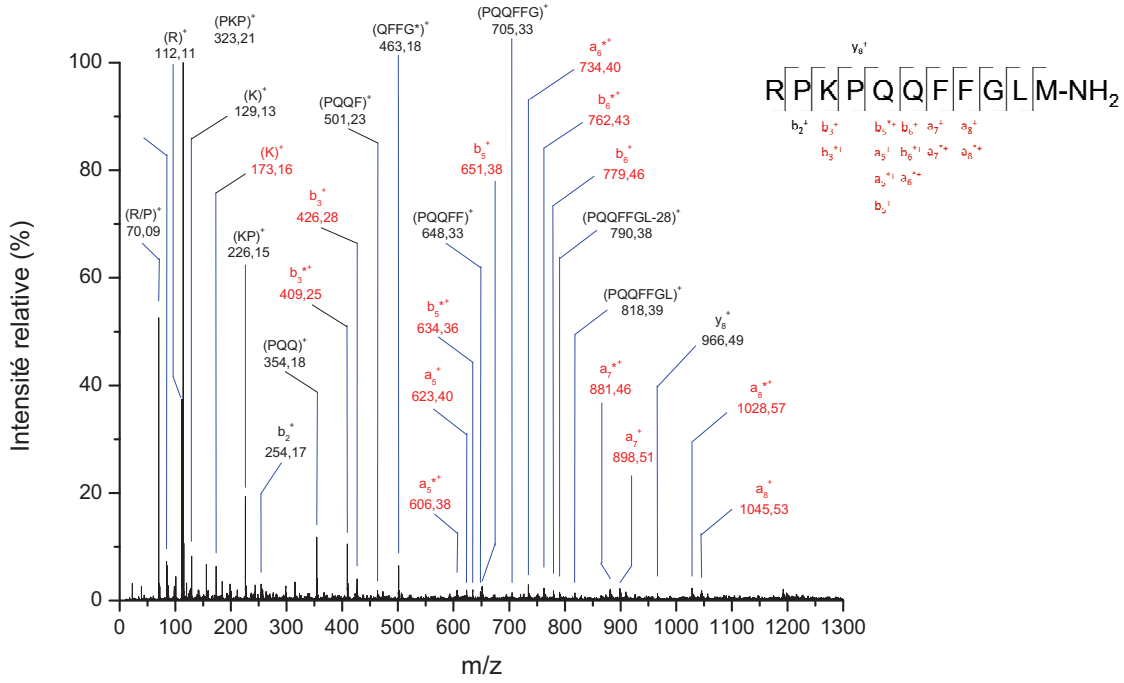
11. Spectre MS^2 MALDI-TOF-TOF de l'angiotensine I exposée à 1 eq de glyoxal et réduite au $NaBH_3CN$.

- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1340,71 : $(MH + C_2H_4O)^+$***



12. Spectre MS^2 MALDI-TOF-TOF de la substance P exposée à 1 eq de glyoxal et réduite au $NaBH_3CN$.

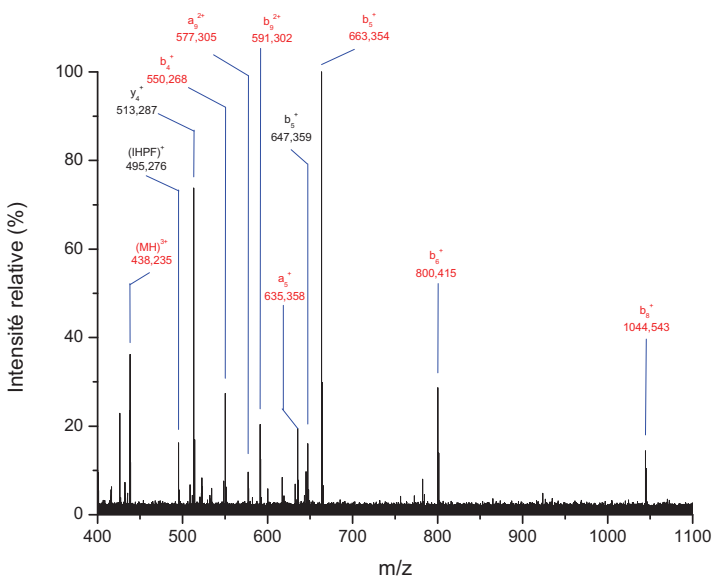
- ***Fragmentation de l'ion à m/z 1391,76 : $(MH + C_2H_4O)^+$***

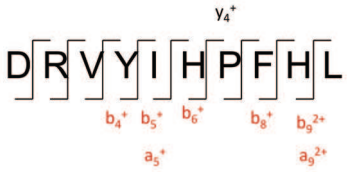


3.2 Spectres de fragmentation nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR

1. Spectre MS^2 FTMS de l'angiotensine I exposée au peroxyde d'hydrogène en présence de Fe(II).

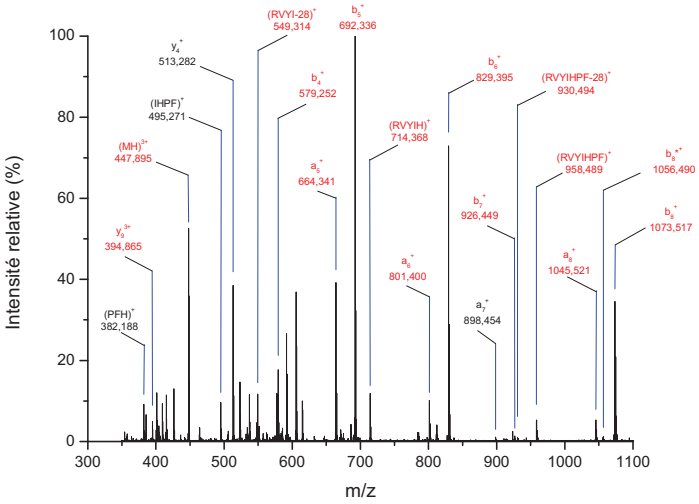
- ***Fragmentation de l'ion à m/z 438,231 : $(M + 3H + O)^{3+}$***

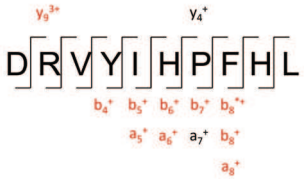




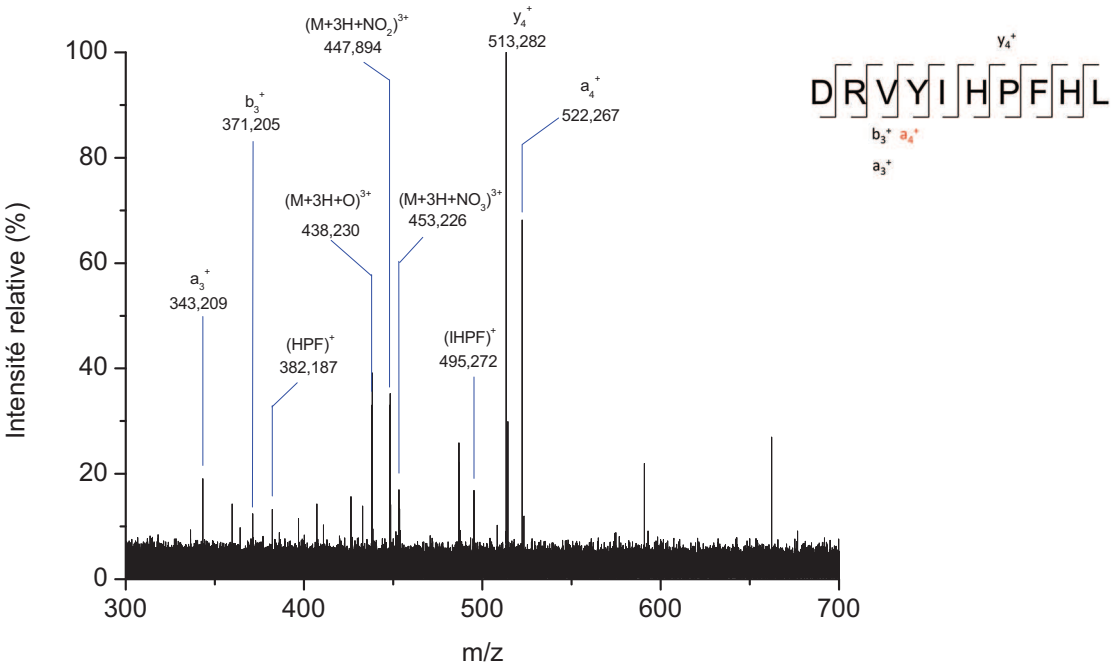
2. Spectre MS^2 FTMS de l'angiotensine I exposée au TNM.

- ***Fragmentation de l'ion à m/z 447,890 : $(M + 3H + NO_2)^{3+}$***

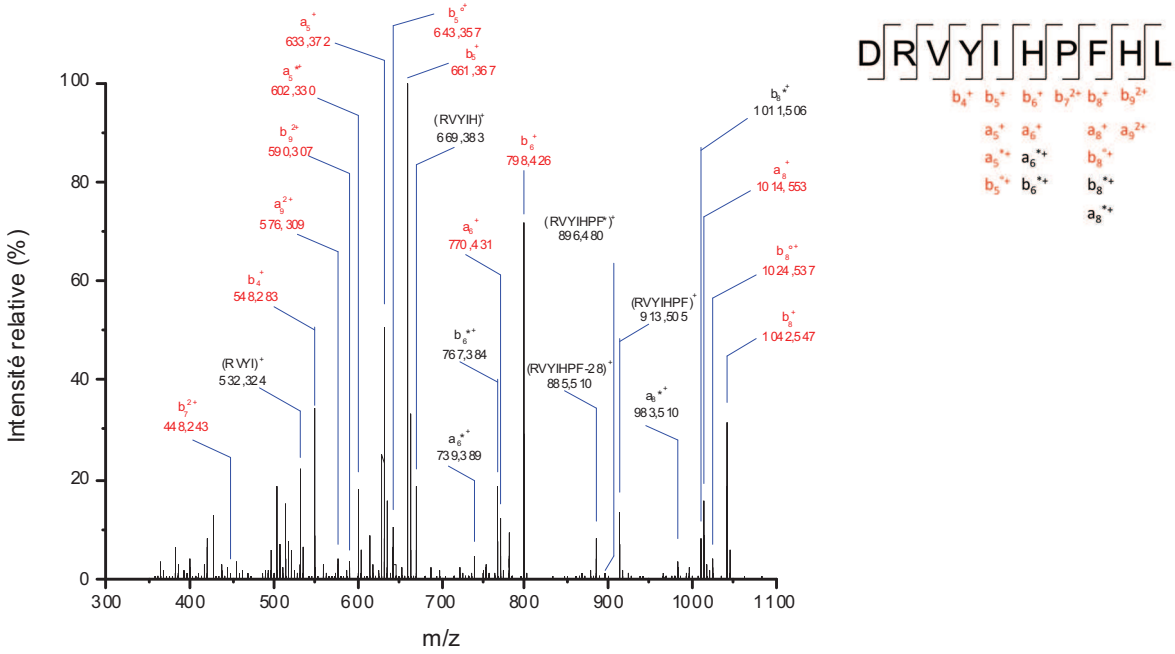




- ***Fragmentation de l'ion à m/z 453,226 : $(M + 3H + NO_3)^{3+}$***

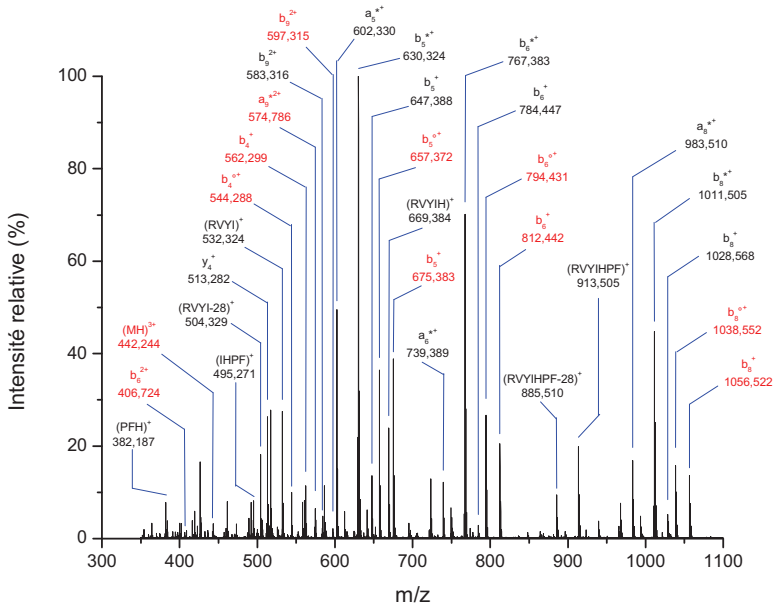


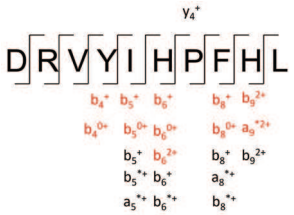
3. Spectre MS^2 FTMS de l'angiotensine I exposée à 1 eq de formaldéhyde et réduite au $NaBH_3CN$.



4. Spectre MS^2 FTMS de l'angiotensine I exposée à 1 eq d'acétaldéhyde et réduite au $NaBH_3CN$.

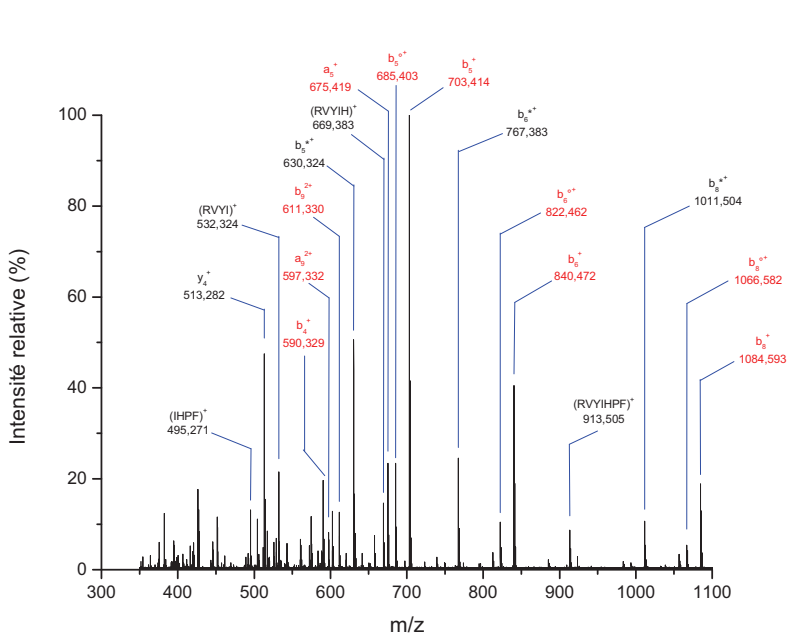
- ***Fragmentation de l'ion à m/z 442,249 : $(M + 3H + C_2H_4)^{3+}$***

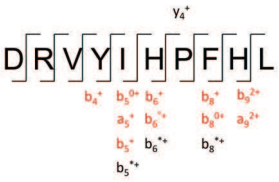




5. Spectre MS^2 FTMS de l'angiotensine I exposée à 1 eq de crotonaldéhyde et réduite au $NaBH_3CN$.

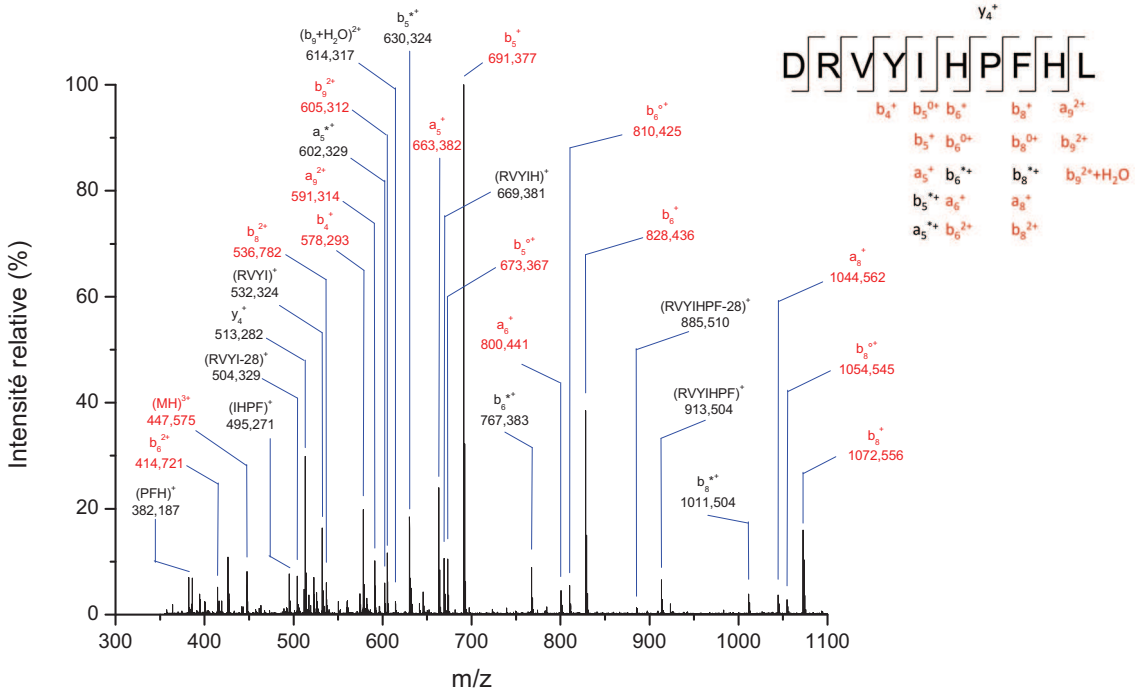
- ***Fragmentation de l'ion à m/z 451,592 : $(M + 3H + C_4H_8)^{3+}$***



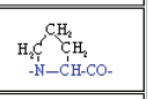


6. Spectre MS^2 FTMS de l'angiotensine I exposée à 1 eq de glyoxal et réduite au $NaBH_3CN$.

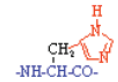
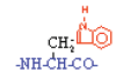
- ***Fragmentation de l'ion à m/z 447,580 : $(M + 3H + C_2H_4O)^{3+}$***



4. NOMENCLATURE DES ACIDES AMINES

AA Codes		AA Residue Composition	Mono.	Avg.	Structure
Gly	G	C_2H_3NO	57.021464	57.05	-NH-CH_2-CO-
Ala	A	C_3H_5NO	71.037114	71.08	-NH-CH(CH_3)-CO-
Ser	S	$C_3H_5NO_2$	87.032029	87.08	-NH-CH(CH_2-OH)-CO-
Pro	P	C_5H_7NO	97.052764	97.12	
Val	V	C_5H_9NO	99.068414	99.07	-NH-CH(CH(CH_3)$_2$)-CO-
Thr	T	$C_4H_7NO_2$	101.04768	101.1	-NH-CH(CH(OH)CH_3)-CO-
Cys	C	C_3H_5NOS	103.00919	103.1	-NH-CH(H_2C-SH)-CO-
Leu	L	$C_6H_{11}NO$	113.08406	113.2	-NH-CH(CH_2-CH(CH_3)$_2$)-CO-
Ile	I	$C_6H_{11}NO$	113.08406	113.2	-NH-CH(CH(CH_3)-CH_2CH_3)-CO-
Asn	N	$C_4H_6N_2O_2$	114.04293	114.1	-NH-CH(CH_2-CO-NH_2)-CO-

IONSOURCE.COM

AA Codes		AA Residue Composition	Mono.	Avg.	Structure
Asp	D	$C_4H_5NO_3$	115.02694	115.1	-NH-CH(CH_2-CO-OH)-CO-
Gln	Q	$C_5H_8N_2O_2$	128.05858	128.1	-NH-CH(CH_2CH_2-CO-NH_2)-CO-
Lys	K	$C_6H_{12}N_2O$	128.09496	128.2	-NH-CH($CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$)-CO-
Glu	E	$C_5H_7NO_3$	129.04259	129.1	-NH-CH(CH_2CH_2-CO-OH)-CO-
Met	M	C_5H_9NOS	131.04048	131.2	-NH-CH(CH_2CH_2S-CH_3)-CO-
His	H	$C_6H_7N_3O$	137.05891	137.1	
Phe	F	C_9H_9NO	147.06841	147.2	-NH-CH(CH_2-C$_6$H$_5$)-CO-
Arg	R	$C_6H_{12}N_4O$	156.10111	156.2	-NH-CH($CH_2CH_2CH_2NH$-C(=NH)-NH_2)-CO-
Tyr	Y	$C_9H_9NO_2$	163.06333	163.2	-NH-CH(CH_2-C$_6$H$_4$-OH)-CO-
Trp	W	$C_{11}H_{10}N_2O$	186.07931	186.2	

La fumée de cigarette, reconnue comme carcinogène, est un aérosol complexe composé de plusieurs milliers de substances chimiques susceptibles de réagir avec les biomolécules. Aussi l'identification de modifications des protéines induites par la phase gazeuse de la fumée de cigarette s'avère être un enjeu majeur à la compréhension de pathologies comme les cancers des voies respiratoires ou les maladies cardiovasculaires.

L'objectif de ce travail a été de développer une méthode d'analyse basée sur la spectrométrie de masse à haute résolution afin d'identifier et de localiser les modifications des protéines exposées à la phase gazeuse de la fumée de cigarette. Deux techniques ont été utilisées : l'analyse MALDI-TOF-TOF et l'analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. Dans le but de comprendre la réaction avec la fumée de cigarette, des modèles de réactions ont été développés sur des peptides et protéines standards. Ainsi des réactions d'oxydation et de nitration ont été effectués à partir des radicaux libres $HO^{\bullet}$ et $NO_2^{\bullet}$ tandis que des réactions de formation d'adduits ont été réalisées à partir d'un équivalent molaire d'aldéhydes commerciaux (formaldéhyde, acétaldehyde, malonaldéhyde, acroléine, crotonaldéhyde et glyoxal).

Ces mêmes standards ont ensuite été exposés à la fumée de cigarette. Par comparaison avec les modèles de réaction, des adduits provenant d'aldéhydes ont pu être identifiés et localisés sur des résidus lysines. Cependant aucun adduit provenant de réaction avec des radicaux n'a été mis en évidence. Ces résultats permettent donc de conclure que les protéines sont principalement modifiées par les aldéhydes contenus dans la fumée de cigarette.

Mots Clés : Protéine, fumée de cigarette, spectrométrie de masse, aldéhydes, adduit

---

Cigarette smoke, well known to be carcinogen, is a high complex aerosol composed of further thousands of chemicals able to react with biomolecules. Also the identification of protein modifications induced by gas phase of cigarette smoke is a major stake for the understanding of some pathology like cancers of airways and cardiovascular diseases.

The aim of this work was to develop an analytical method based on high resolution mass spectrometry in order to identify and localize protein modifications induced by cigarette smoke. Two techniques were used: a MALDI-TOF-TOF analysis and a nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR analysis. In order to understand reaction with cigarette smoke, model reactions were developed on standard peptides and protein. Thus oxidation and nitration were realized using $HO^{\bullet}$ and $NO_2^{\bullet}$ free radicals while formation of adducts was performed using 1 molar equivalent of different commercial aldehydes (formaldehyde, acetaldehyde, malonaldehyde, acrolein, crotonaldehyde and glyoxal).

These standards were subsequently exposed to cigarette smoke. By comparison with model reactions, adducts coming from aldehydes were identified and localized on lysine residues. However, no adduct from the reaction with free radicals was highlighted. These results allowed concluding that proteins are principally modified by aldehydes contained in cigarette smoke.

Keywords: Protein, cigarette smoke, mass spectrometry, aldehydes, adduct