



HAL
open science

Nouvelles stratégies pour l'analyse protéomique du tissu cérébral et des fluides biologiques dans la maladie de Parkinson

Affif Zaccaria

► **To cite this version:**

Affif Zaccaria. Nouvelles stratégies pour l'analyse protéomique du tissu cérébral et des fluides biologiques dans la maladie de Parkinson. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENS001 . tel-00820156

HAL Id: tel-00820156

<https://theses.hal.science/tel-00820156>

Submitted on 3 May 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **BIOTECHNOLOGIES, INSTRUMENTATION, SIGNAL**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Affif ZACCARIA

Thèse dirigée par **François BERGER**

préparée au sein du **Grenoble Institut des Neurosciences**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement**.

Nouvelles stratégies pour l'analyse protéomique du tissu cérébral et des fluides biologiques dans la maladie de Parkinson.

Thèse soutenue publiquement le « **15 Mars 2013** »,
devant le jury composé de :

M, Pierre, BURKHARD

Professeur, Université de Genève, Rapporteur

M, Bernard, MONSARRAT

Docteur, Université de Toulouse, Rapporteur

M, Sylvain, LEHMANN

Professeur, Université de Montpellier, Examineur

M, Pascal, MOSSUZ

Professeur, Université de Grenoble, Examineur

M, Stéphane, CHABARDÈS

Professeur, Université de Grenoble, Examineur

M, François, BERGER

Professeur, université de Grenoble, Directeur de Thèse



Remerciements

Sommaire

Sommaire	1
INTRODUCTION	1
I. La maladie de Parkinson	1
1. Contexte de la maladie de Parkinson.	1
2. Neuropathologie de la maladie de Parkinson	2
1) La dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc.	2
2) La dégénérescence des autres régions cérébrales	3
3) Les corps de Lewy.	3
3. Etiologie de la MP	4
1) Les formes génétiques héréditaires	4
2) Les formes sporadiques	5
4. Diagnostic de la MP	6
1) Un diagnostic différentiel difficile	6
2) Un diagnostic tardif	7
5. Conclusions	8
II. L'analyse protéomique par spectrométrie de masse	9
1. La protéomique	9
2. La spectrométrie de masse.	9
1) Les sources d'ionisation	10
2) Les analyseurs	12
3. Les différentes étapes de l'analyse protéomique en spectrométrie de masse.	17
1) Limiter la dégradation de l'échantillon	17
2) Séparer les protéines	17
3) Identifier les protéines	20
4) Quantifier les protéines.	22
RESULTATS	24
Partie I	24
Développement d'une stratégie pour l'analyse protéomique du tissu cérébral in vivo.	24
I. La stimulation cérébrale profonde : une opportunité pour l'analyse protéomique du cerveau in vivo.	24
1. Introduction	24
1) L'analyse protéomique du tissu cérébral post-mortem dans la MP.	24
2) La stimulation cérébrale à haute fréquence du noyau sous-thalamique dans la MP.	26

2. Article 1	28
3. Conclusions et Perspectives.	29
II. Validation de l'efficacité et de l'effet non lésionnel d'un nouvel outil pour la capture in vivo de tissu cérébral.	31
1. Introduction	31
1) Présentation de l'outil	31
2. Article 2	33
3. Conclusions et Perspectives.	34
RESULTATS	36
Partie II	36
Développement d'une stratégie pour l'analyse protéomique des fluides biologiques en clinique.	36
I. L'utilisation de nanoparticules pour l'analyse protéomique du LCR.	37
1. Introduction	37
1) Du tissu pathologique aux fluides biologiques	37
2) Le liquide céphalo-rachidien.	37
3) L'analyse protéomique du LCR	38
4) L'utilisation de micro/nanoparticules pour l'analyse protéomique haut débit du LCR.	39
2. Article 3	41
3. Conclusions et Perspectives.	42
II. L'utilisation de NPs pour l'analyse protéomique du globule rouge (GR).	44
1. Introduction	44
1) L'érythrocyte ou globule rouge.	44
2) L'analyse protéomique du GR	44
2. Article 4 :	45
3. Conclusions et Perspectives.	46
III. L'utilisation de NPs pour l'analyse protéomique du plasma sanguin.	48
1. Introduction	48
1) Le plasma sanguin	48
2) L'analyse protéomique du plasma sanguin	48
2. Matériels et Méthodes	49

1) Collecte du plasma	49
2) Traitement avec les NPs	49
3) Analyse du plasma par SDS-PAGE	50
4) Identification des protéines par nano-LC-MS/MS	50
3. Résultats préliminaires	51
1) L'impact des NPs sur le profil SDS-PAGE du plasma sanguin	51
2) L'identification des protéines captées par les NPs par nano-LC-MS/MS	52
IV. Vers l'utilisation in vivo de NPs pour la capture de protéines dans le sang.	54
1. Introduction générale	54
2. L'encapsulation des NPs dans un biopolymère d'alginate.	56
1) Introduction	56
2) Matériels et Méthodes :	57
3) Résultats préliminaires	60
3. Développement de micro-aimants implantables pour la recapture de NPs dans la circulation sanguine.	63
1) Introduction	63
2) Résultats préliminaires	63
Conclusion générale.	66
I. Développement d'une stratégie pour l'analyse protéomique du cerveau in vivo.	66
II. Développement d'une stratégie pour l'analyse protéomique des fluides biologiques en clinique.	68
Références	70
Annexe	66
1. Informations concernant l'outil d'empreinte tissulaire	78
2. Fiches techniques des NPs utilisées au cours de ce travail	78
3. Brevet concernant l'encapsulation de NPs dans un polymère biocompatible	78
4. Brevet concernant le développement de micro-aimants autonomes et implantables	78

Index des illustrations

Figure 1 : Augmentation du nombre de cas de la MP prévue pour 2030 d'après Dorsey et al.	1
Figure 2 : Coupes anatomiques révélant la perte de neurones dopaminergiques et représentation de la diminution de dopamine délivrée au putamen et noyau caudé chez le patient parkinsonien.....	2
Figure 3: Immunomarquage de l' α synucléine et de l'ubiquitine mettant en évidence un corps de Lewy dans un neurone dopaminergique de la SNc.	3
Tableau 1: Gènes associés aux formes familiales de la MP.	4
Figure 4: Les différentes phases de la MP.....	8
Figure 6: Schéma simplifié de l'ionisation électrospray d'après (Kearle 2000)	11
Figure 7: Schéma simplifié de l'ionisation MALDI.	11
Figure 8: Schéma d'une barrette SELDI et des différentes surfaces d'affinité.	12
Figure 9: Trajet d'un ion dans l'analyseur à temps de vol en mode linéaire.	13
Figure 10: Trajet d'un ion dans l'analyseur à temps de vol en mode réflectron.	14
Figure 11: Photo et schéma simplifié du LTQ-Orbitrap® par Thermo Scientific.	14
Figure 12: Photo d'un Orbitrap et schéma de la trajectoire des ions autour de l'électrode centrale.	15
Figure 13: Schéma d'un piège ionique linéaire à éjection radiale par Thermo Scientific.	16
Tableau 2: Caractéristiques des méthodes de coloration des gels d'électrophorèse bidimensionnelle.	18
Figure 14: Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle associée à la spectrométrie de masse.....	19
Figure 15: Principe du SDS-PAGE 1D couplé à la nano-chromatographie liquide.....	20
Figure 16: L'empreinte peptidique massique.	21
Figure 17: Le séquençage peptidique par MS/MS.	22
Figure 18: Localisation du STN par ventriculographie, IRM et électrophysiologie d'après Benabid et al.	26
Figure 19: Implantation des électrodes définitives dans le STN et du stimulateur en sous-claviculaire.	27
Figure 20: Puce en silicium modifiée chimiquement et micro-structurée. (A) Représentation schématique de la puce. (B) Principe de la fonctionnalisation chimique. (C) Microscopie électronique à balayage des micro-picots.	31

Figure 21 : Observation du tissu tumoral récupéré sur une puce en silicium, par microscopie électronique à balayage (gauche) et bi photonique (droite). Les fibres blanches (droite) sont des fibres de collagène de la MEC.	32
Figure 22: L'outil d'empreinte tissulaire. (A) Schéma et (B) photo de l'outil d'empreinte tissulaire. (C) Radiographie réalisée durant la réalisation d'une empreinte in vivo chez le primate.	33
Figure 23: IRM d'un outil d'empreinte en PEEK dans un kiwi.....	35
Figure 24: Principe de l'égalisation des concentrations protéiques par le Proteominer®	39
Figure 25: Principales étapes de l'utilisation de NPs magnétiques pour la capture protéique dans les fluides biologiques d'après Villanueva et al.....	41
Figure 26: Profils SDS-PAGE d'un plasma non traité ou traité avec NPs. 2 types et 2 tailles différents de NPs ont été utilisés.....	51
Figure 27: Histogramme récapitulatif du nombre de protéines différentes identifiées par nano-lc-ms/ms.....	52
Figure 28: Diagramme de Venn schématisant le nombre de protéines différentes et similaires entre les échantillons.....	53
Figure 29: Structure chimique de l'alginate.....	56
Figure 30: Principe de la gélification.....	57
Figure 31: Photo du dispositif (gauche) permettant la production de capsules d'alginate contenant des NPs (droite).....	58
Figure 33: Profil MALDI des protéines de bas poids moléculaire captées par les NPs encapsulées (spectre du haut) et non encapsulées (spectre du bas).....	61
Figure 34:Photo du dispositif mimant la circulation (gauche) et site d'introduction du micro-aimant (droite).....	64
Figure 35 : (A) Localisation des pièges magnétiques avant la capture de NPs via l'utilisation d'un masque. (B) Observation de ce même aimant sans masque après la capture de NPs. ..	64

Liste des abréviations

MP : Maladie de Parkinson
SNC : Substance noire compacta
MPTP : 1-méthyl 4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
TEP : Tomographie à émission de positons
IRM : Imagerie par résonance magnétique
MS : Spectrométrie de masse
MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
FT-ICR : Résonance cyclotronique d'ions à transformée de Fourier
ESI : Electrospray Ionisation
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
Nano-LC : Chromatographie liquide sur nano-colonne
UV : Ultra-violet
SELDI: Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation
TOF: Time of flight
2-DE: Electrophorèse bidimensionnelle
DIGE: Difference Gel Electrophoresis
SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
ICAT: Isotope Coded Affinity Tag
iTRAQ: isobaric Tag for relative and Absolute Quantitation
SILAC: Stable Isotope Labelling by Amino acid in Cell culture
AQUA : Absolute Quantification
XIC : Extracted Ion Chromatogram
CNDP2 : Cytosolic non specific dipeptidase 2
STN : Noyau sous-thalamique
TOC : Troubles obsessionnels compulsifs
GPI : Globus Pallidus interne
MEC : Matrice Extra Cellulaire
PEEK : polyétheréthercétone
LCR : Liquide céphalo-rachidien
NPs : Nanoparticules
GR : Globule rouge
PSA : Prostate specific antigen
RMN : Résonance magnétique nucléaire

INTRODUCTION

I. La maladie de Parkinson

1. Contexte de la maladie de Parkinson.

Avec le vieillissement de la population et l'augmentation de l'espérance de vie dans les pays industrialisés, les maladies neurodégénératives liées à l'âge constituent un véritable problème de santé public. Parmi les plus fréquentes, la maladie de Parkinson (MP) (Parkinson 2002), (Lang and Lozano 1998; Lang and Lozano 1998) affecte 7 millions de personnes dans le monde. C'est une maladie rare avant 50 ans avec une prévalence de 0,3 % de la population globale, de 1 à 2 % chez les personnes de plus de 65 ans et de 3 à 5 % chez les personnes de plus de 80 ans (de Lau and Breteler 2006). Des prévisions pour 2030 annoncent une augmentation de 50 % du nombre de cas dans les 5 principaux pays d'Europe et de 130 % dans les 10 pays les plus peuplés du monde (Dorsey, Constantinescu et al. 2007) (Figure 1).

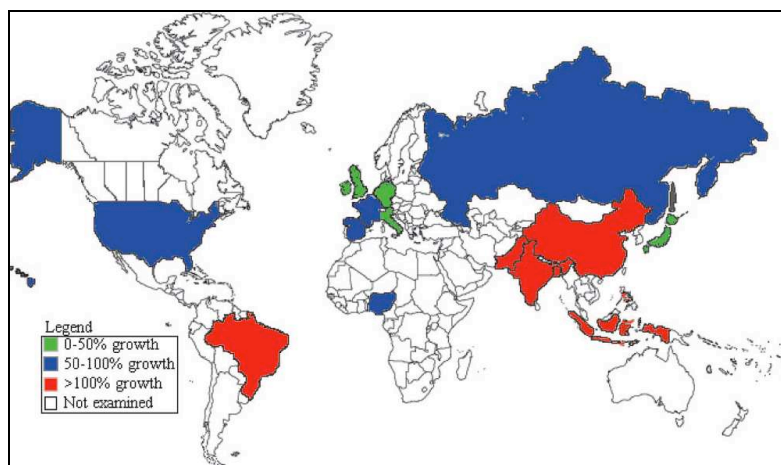


Figure 1 : Augmentation du nombre de cas de la MP prévue pour 2030 d'après Dorsey et al.

Avec les efforts et les découvertes réalisés depuis une vingtaine d'années, la MP bénéficie aujourd'hui de nombreux traitements symptomatiques de la L-Dopa à la neurostimulation en passant par la thérapie génique (Singh, Pillay et al. 2007), mais demeure sans traitement étiologique. Deux raisons principales expliquent cet échec thérapeutique :

-L'incompréhension des causes et des mécanismes moléculaires à l'origine de la neurodégénérescence. Cette méconnaissance de l'étiologie moléculaire est le principal obstacle au développement de thérapies curatives bloquant le processus dégénératif.

- L'incapacité à diagnostiquer la maladie de Parkinson avant l'apparition des symptômes moteurs, et donc l'administration tardive de traitements symptomatiques qui pourraient se révéler neuroprotecteurs à un stade plus précoce de la maladie.

2. Neuropathologie de la maladie de Parkinson

1) La dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire compacta.

La MP se caractérise principalement par la dégénérescence progressive et massive des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNc).

Cette perte de neurones entraîne une diminution drastique de la quantité de dopamine délivrée au niveau du putamen et du noyau caudé (Kish, Shannak et al. 1988), les principaux sites de projection des neurones de la SNc (Figure 2).

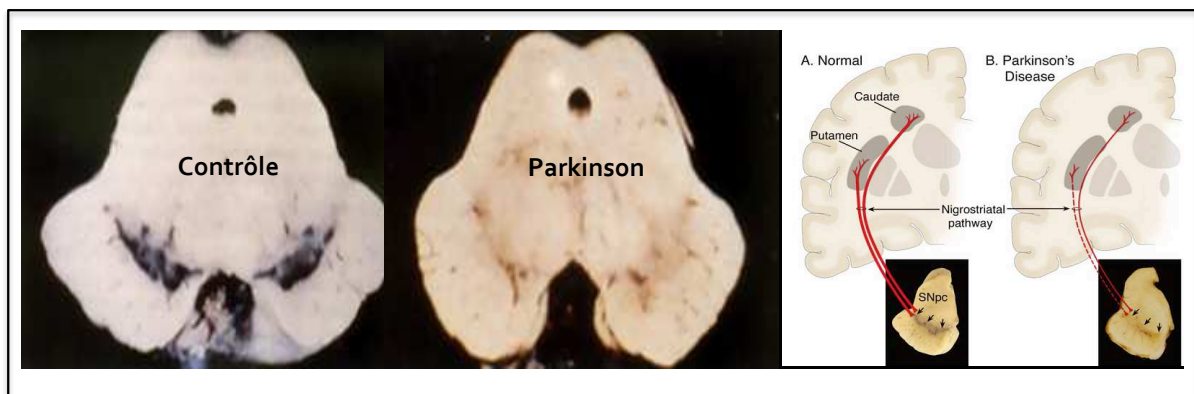


Figure 2 : Coupes anatomiques révélant la perte de neurones dopaminergiques et représentation de la diminution de dopamine délivrée au putamen et noyau caudé chez le patient parkinsonien.

Cette déplétion en dopamine entraîne une cascade de modifications fonctionnelles, impliquant tous les noyaux de la boucle motrice du circuit des ganglions de la base (Blandini, Nappi et al. 2000), et responsable des symptômes moteurs caractéristiques: le tremblement de repos, l'akinésie et la rigidité musculaire dont la sévérité est corrélée à la perte de dopamine (Riederer and Wuketich 1976), (Bernheimer, Birkmayer et al. 1973). La manifestation de ces symptômes nécessite 60 à 80 % de déplétion dopaminergique au niveau du putamen, et la dégénérescence d'environ 60 % des neurones dopaminergiques de la SNc (Bernheimer, Birkmayer et al. 1973), (Bezard, Dovero et al. 2001). La dégénérescence neuronale est un processus physiologique du vieillissement ; mais alors que le vieillissement physiologique affecte principalement et modérément la partie dorso-médiale de la SNc, la

MP révèle une dégénérescence accélérée et majoritaire de la partie ventro-latérale de la SNC (Kish, Shannak et al. 1992), (Fearnley and Lees 1991). Aussi le processus de dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la pathologie est probablement différent de celui lié au vieillissement.

2) La dégénérescence des autres régions cérébrales

Bien que la MP soit principalement décrite comme une destruction du système dopaminergique, une dégénérescence neuronale est aussi observée dans les noyaux catécholaminergiques et sérotoninergiques du tronc cérébral, le noyau basal de Meynert cholinergique, le locus ceruleus, les neurones hypothalamiques, le cortex cérébral mais aussi dans le bulbe olfactif et le système nerveux autonome (Hornykiewicz and Kish 1987), (Forno 1996), (Jellinger 1990). La dégénérescence de ces structures pourrait expliquer les troubles cognitifs parfois présents chez certains patients: démence (Aarsland, Tandberg et al. 1996), dépression (Cummings 1992), anxiété (Shiba, Bower et al. 2000), mais aussi les symptômes précoces et non moteurs, non spécifiques présents chez les patients, plusieurs années avant la manifestation motrice de la maladie (Langston 2006).

3) Les corps de Lewy.

Une autre caractéristique neuropathologique de la MP est la présence d'inclusions cytoplasmiques éosinophiles nommés corps de Lewy (Gibb and Lees 1988), en référence à Frederich Lewy qui fut le premier à les décrire en 1912 (Holdorff 2002) (Figure 3).

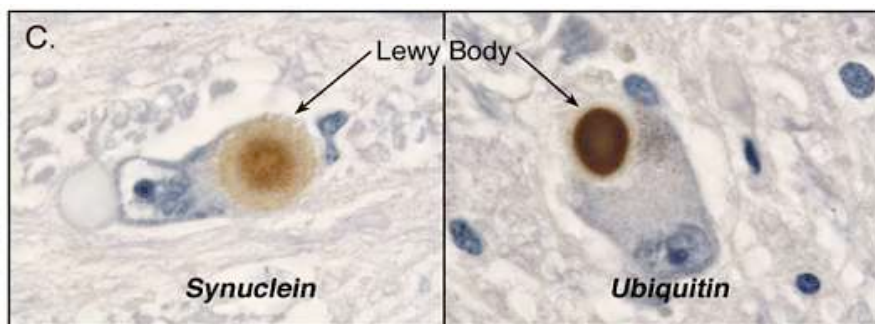


Figure 3: Immunomarquage de l' α synucléine et de l'ubiquitine mettant en évidence un corps de Lewy dans un neurone dopaminergique de la SNC.

D'un diamètre de 5 à 25 μ m, les corps de Lewy sont constitués de neurofilaments (Trojanowski and Lee 1998), d'Ubiquitine (Spillantini, Schmidt et al. 1997), d' α -Synucléine (Spillantini, Crowther et al. 1998), de Parkine (Schlossmacher, Frosch et al. 2002) et ont été

mis en évidence dans toutes les zones cérébrales affectées par la MP. Jusqu'à présent, le mécanisme de formation des corps de Lewy, et leur rôle dans le processus neurodégénératif demeurent inconnus. L'étude du contenu moléculaire de ces corps de Lewy (Leverenz, Umar et al. 2007) apporterait des informations précieuses sur les processus biologiques associés à leur présence dans la MP.

3. Etiologie de la MP

Pendant longtemps la MP a été décrite comme n'ayant aucune composante génétique. Ce concept a radicalement changé ces 10 dernières années avec l'identification de nombreuses mutations génétiques associées à des formes familiales de la MP.

1) Les formes génétiques héréditaires

Aujourd'hui, 5 gènes ont été définitivement impliqués dans la transmission héréditaire de la maladie (Tableau 1); SNCA et LRRK2 à transmission autosomique dominante, PARK2, PINK1 et DJ-1 à transmission autosomique récessive (Wood-Kaczmar, Gandhi et al. 2006), (Farrer 2006). Ces 5 gènes codent respectivement pour l' α -Synucléine, la Leucine Rich Repeat protein Kinase 2 (LRRK2), la Parkine, la PTEN-induced Kinase-1 (PINK1) et DJ-1. Selon le gène muté, le phénotype de la maladie est différent avec un début de pathologie plus ou moins précoce et une évolution plus ou moins lente.

GENE	MODE TRANSMISSION	PROTÉINE	FONCTION PROTÉINE	AGE DÉBUT MALADIE	PHENOTYPE
SNCA	Autosomique dominante	α -synucléine	protéine synaptique de fonction inconnue	35-60 ans	maladie précoce avec démence fréquente
LRRK2	Autosomique dominante	Leucin-rich repeat serin/threonine protein kinase 2	protéine kinase	> 50 ans	apparition tardive comme dans la forme sporadique
PARK2	Autosomique récessive	Parkine	E3 ubiquitine ligase	20-40 ans	maladie très précoce avec progression lente
PINK1	Autosomique récessive	PTEN-induced kinase	protéine mitochondriale de fonction inconnue	30-45 ans	maladie précoce avec progression lente
DJ-1	Autosomique récessive	DJ-1 protein	protéine neuronale et astrocytaire de fonction inconnue	20-45 ans	maladie précoce avec progression lente

Tableau 1: Gènes associés aux formes familiales de la MP.

L'étude des protéines codées par ces gènes mutés dans les formes familiales de la MP a permis d'associer certaines altérations fonctionnelles à l'étiologie de la MP. Ainsi, l'accumulation de protéines agrégées et mal repliées, le dysfonctionnement des complexes mitochondriaux, l'augmentation du stress oxydatif et/ou la défaillance du système ubiquitine-protéasome sont impliqués dans la dégénérescence dopaminergique (Moore, West et al. 2005). Bien que ces formes familiales représentent uniquement 5 % des cas de la MP, leurs études ont révélé que différents mécanismes moléculaires étaient capables d'induire une dégénérescence dopaminergique.

2) Les formes sporadiques

Les formes sporadiques représentent 95 % des cas de la MP. Alors que leur étiologie demeure inconnue, ici aussi le stress oxydatif (Jenner and Olanow 1996), le dysfonctionnement mitochondrial (Schapira, Cooper et al. 1990) et l'altération du système ubiquitine-protéasome (McNaught, Mytilineou et al. 2002) sont considérés comme potentiellement impliqués dans la pathogénèse.

Des études post-mortem des formes sporadiques de la maladie ont mis en évidence la présence d'un stress oxydatif accru dans la SNc de patients parkinsoniens (Jenner and Olanow 1996). La source de ce stress n'est pas connue ; elle pourrait provenir du métabolisme de la dopamine qui produit des espèces radicalaires de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'un dysfonctionnement du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, observé dans la SNc de patients parkinsoniens (Schapira, Cooper et al. 1990). Ici aussi, la cause de ce dysfonctionnement mitochondrial dans les formes sporadiques n'a toujours pas été élucidée. Elle pourrait être la conséquence d'une exposition environnementale aux pesticides (Sherer, Betarbet et al. 2002) ou aux opioïdes de synthèse (Langston, Ballard et al. 1983) comme le 1-méthyl 4-phényl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP), qui vont inhiber le complexe I de la chaîne mitochondriale. Si l'altération de la fonction mitochondriale peut induire une augmentation du stress oxydatif, l'inverse est aussi possible. Cette observation reflète les difficultés à déterminer l'enchaînement chronologique des mécanismes moléculaires altérés dans la MP, et donc de distinguer les causes précoces de la dégénérescence dopaminergique, des conséquences tardives.

Aujourd'hui, la MP est considérée dans ses formes sporadiques comme une maladie multifactorielle où l'âge, l'exposition environnementale (Elbaz, Clavel et al. 2009) mais aussi

une susceptibilité génétique (Tan, Khajavi et al. 2000), (Huang, Chen et al. 2004), (Healy, Abou-Sleiman et al. 2004) vont entraîner la perturbation de différents mécanismes moléculaires, responsables de la dégénérescence dopaminergique. Dans ce contexte complexe et multifactoriel, l'identification des mécanismes moléculaires déclencheurs de la dégénérescence passe par l'étude de la maladie à des stades plus précoces. Elle apporterait de précieuses informations pour le développement de nouvelles thérapies ciblant l'étiologie et pas uniquement les symptômes, et orienterait la recherche de marqueurs moléculaires précieux pour un diagnostic précis et précoce de la MP.

4. Diagnostic de la MP

1) Un diagnostic différentiel difficile

Jusqu'à présent, il n'existe pas de test spécifique ou de biomarqueur permettant le diagnostic précis de la MP. Ce dernier repose essentiellement sur l'examen clinique des symptômes moteurs caractéristiques : l'akinésie, le tremblement de repos et la rigidité musculaire (Calne, Snow et al. 1992), (Gelb, Oliver et al. 1999). La présence asymétrique d'un ou plusieurs symptômes, dont la sévérité est diminuée par l'administration de L-Dopa est le critère d'inclusion principal pour le diagnostic de la MP. Cependant, les variations de réponse à la L-Dopa chez des patients parkinsoniens mais aussi l'existence d'autres syndromes parkinsoniens :

- dégénératifs ou Parkinson+, regroupant la démence à corps de Lewy, l'amyotrophie multisystématisée et la paralysie supranucléaire progressive

- secondaires d'origine vasculaire, tumorale, infectieuse ou toxique,

présentant les mêmes symptômes que la MP, compliquent le diagnostic (Galvin, Lee et al. 2001), (Samii, Nutt et al. 2004). En effet, des études histopathologiques post-mortem ont révélé un diagnostic erroné dans 25 % des cas (Hughes, Daniel et al. 1992) et actuellement, l'autopsie cérébrale demeure indispensable pour un diagnostic définitif. Même dans les centres spécialisés dans les troubles du mouvement, la sensibilité du diagnostic est seulement de 90 % (Hughes, Daniel et al. 2002).

Complémentaire de l'examen clinique en cas d'incertitude, l'utilisation de la neuroimagerie de type Tomographie par émission de positons (TEP) (Brooks 2004) et de l'IRM (Zijlmans, Thijssen et al. 1995) vont permettre de confirmer/infirmer une déplétion dopaminergique et d'exclure/retenir un syndrome parkinsonien secondaire d'origine vasculaire ou tumorale.

Ces techniques peuvent aussi se révéler utile pour distinguer la MP d'autres syndromes Parkinson+ (Schocke, Seppi et al. 2002); cependant elles demeurent relativement chères et peu disponible pour une utilisation diagnostique en routine clinique.

2) Un diagnostic tardif

En plus de la difficulté à discriminer la MP d'autres syndromes parkinsoniens, ce diagnostic basé sur les symptômes moteurs n'est possible qu'à leur apparition, soit après une dégénérescence d'au moins 60 % des neurones dopaminergiques de la SNc. En effet, avant ce stade, le patient est dans une phase asymptomatique pouvant durer entre 5 et 10 ans, mais durant laquelle la dégénérescence dopaminergique a bien commencé (Fearnley and Lees 1991), (Morrish, Rakshi et al. 1998) (Figure 4). Durant cette large fenêtre temporelle, le patient va parfois développer des symptômes pré et non moteurs tels que la dysarthrie (Tsanas, Little et al. 2012), l'hyposmie, les troubles du sommeil, la constipation ou encore la perte de l'innervation sympathique au niveau cardiaque (Langston 2006), (Ansari and Johnson 1975). De nombreux groupes s'intéressent à ces symptômes afin d'identifier les patients à risques (Wolters, Francot et al. 2000), (Tolosa, Compta et al. 2007), (Iwanaga, Wakabayashi et al. 1999). Mais la non-spécificité de ces symptômes et les différentes spécialités médicales que requiert leur prise en charge, rendent difficiles le rapprochement avec une maladie neurodégénérative.

Jusqu'à présent, le diagnostic de la MP ne peut être posé que tardivement, après une dégénérescence d'au moins 60 % des neurones dopaminergiques et la manifestation clinique de symptômes moteurs caractéristiques mais non spécifiques. Cette non spécificité des symptômes va être à l'origine d'un mauvais diagnostic dans 10 à 25 % des cas et d'une prise en charge du patient inadaptée. Tant qu'il reposera sur ces symptômes moteurs, le diagnostic de la MP ne pourra en aucun cas être précoce ; et jusqu'à présent les symptômes prémoteurs observés chez des patients parkinsoniens plusieurs années avant l'apparition des symptômes moteurs sont trop peu spécifiques pour être utilisés en tant que biomarqueurs diagnostiques de la MP. C'est pourquoi il est primordial de comprendre les mécanismes moléculaires déclencheurs de la dégénérescence afin d'identifier des biomarqueurs intimement associés aux causes et détectables au début de la maladie. L'identification de tels biomarqueurs permettrait une prise en charge précoce des patients mais aussi le développement de nouvelles thérapeutiques, agissant directement sur l'étiologie moléculaire de la maladie, et donc capables de stopper le processus de

dégénérescence sur lequel les traitements symptomatiques actuellement proposés sont inefficaces (Singh, Pillay et al. 2007).

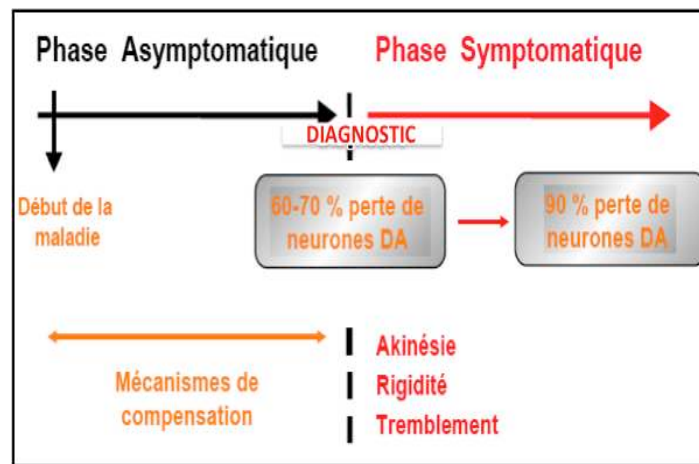


Figure 4: Les différentes phases de la MP.

5. Conclusions

La recherche sur les mécanismes moléculaires, à l'origine des formes sporadiques de la MP suggère l'implication d'un stress oxydatif accru, d'un dysfonctionnement mitochondrial ou d'une altération du système de dégradation des protéines dans la dégénérescence dopaminergique. L'altération de ces fonctions cellulaires va entraîner l'oxydation et l'accumulation de certaines protéines au sein des neurones de la SNc, faisant de la MP une maladie associée à une modification de l'expression et de l'état fonctionnel des protéines. Jusqu'à présent les études se sont principalement focalisées sur la caractérisation ciblée d'un de ces mécanismes sans pour autant réussir à décrypter les événements moléculaires responsables de la dégénérescence dans les formes sporadiques de la MP. Grâce au développement de la spectrométrie de masse, l'émergence de la protéomique (Aebersold and Mann 2003) ces dix dernières années permet aujourd'hui d'entrevoir l'analyse d'un tissu ou d'un fluide biologique sans cibler un mécanisme moléculaire particulier mais en ayant une approche plus générale et sans à priori. Ces approches permettraient ainsi de souligner de nouveaux mécanismes moléculaires et/ou de mieux caractériser ceux supposés à l'origine de la maladie.

Mon travail de thèse s'est appuyé sur ces techniques de protéomique afin de valider l'intérêt de nouvelles stratégies, basées sur l'utilisation de micro/nanotechnologies pour la compréhension des mécanismes moléculaires associés à la MP.

II. L'analyse protéomique par spectrométrie de masse

1. La protéomique

Introduit par Wilkins et al (Wilkins, Sanchez et al. 1996) en 1996, le terme « protéomique » concerne l'étude globale de l'expression des protéines d'une cellule ou d'un organisme. Complémentaire de la génomique qui concerne l'étude de l'expression des gènes, l'émergence de la protéomique provient du fait que la protéine, produit final du gène est plus représentative de la fonction d'une cellule que le gène lui-même. L'analyse protéomique est dynamique ; un même génome peut conduire à différents protéomes selon le contexte cellulaire. De plus, les modifications post traductionnelles que peuvent subir les protéines (phosphorylations, oxydations, ubiquitinations, glycosylations) et qui impactent fortement sur la signalisation et la régulation cellulaire sont uniquement accessibles par des approches protéomiques. Cependant contrairement à la génomique qui permet aujourd'hui d'étudier l'expression de la totalité des 27 000 gènes constituant le génome humain, la complexité du protéome estimée à plus de 700 000 protéines différentes nécessitent différentes étapes jusqu'à l'identification et la quantification des protéines en spectrométrie de masse. Afin de répondre à cet enjeu, différents spectromètres de masse ont été développés, utilisant différentes sources d'ionisation des protéines, différents analyseurs et différents détecteurs. Nous détaillerons ceux qui ont été utilisés au cours de ce travail.

2. La spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. À l'origine elle servait à détecter et séparer les différents isotopes d'un élément. Le développement de nouvelles technologies autour de la spectrométrie de masse a permis son essor dans le domaine biomédical, et l'émergence de la protéomique clinique. Le principe de la spectrométrie de masse réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Aujourd'hui les spectromètres de masse sont constitués de 3 éléments majeurs (Figure 5) :

Une source ionique : vaporise et ionise les molécules. Plusieurs types de sources existent et sont utilisées en fonction du résultat recherché.

Un analyseur : sépare les ions en fonction de leur rapport m/z . Ces analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences d'identification protéique en spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). En général, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet de fragmenter les ions, et un second analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs, comme les pièges à ions ou le FT-ICR, constituent plusieurs analyseurs en un et permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement.

Le détecteur : collecte les ions en fonction de leur rapport m/z et amplifie leur signal. Le signal est numérisé et converti en spectre de masse où chaque pic est représenté par sa masse et son intensité relative.



Figure 5: Principaux éléments d'un spectromètre de masse

En protéomique, la plupart des spectromètres de masse sont de types ESI (ElectroSpray Ionisation) ou MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) en référence à la source ionique utilisée.

1) Les sources d'ionisation

a. L'ionisation par électronébulisation ou Electrospray (ESI) (Fenn, Mann et al. 1989)

Souvent couplée à la chromatographie liquide sur nano-colonne (nanoLC), cette technique d'ionisation est utilisée en spectrométrie de masse pour produire des ions à partir de composé en solution. L'électrospray est produit par application d'un fort champ électrique sur un liquide qui va se rompre pour former des gouttelettes fortement chargées. Un courant d'air chauffé va provoquer l'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes ; leur densité de charge devenant trop importante, les gouttelettes explosent libérant des microgouttelettes contenant des molécules protonées de l'analyte (Figure 6).

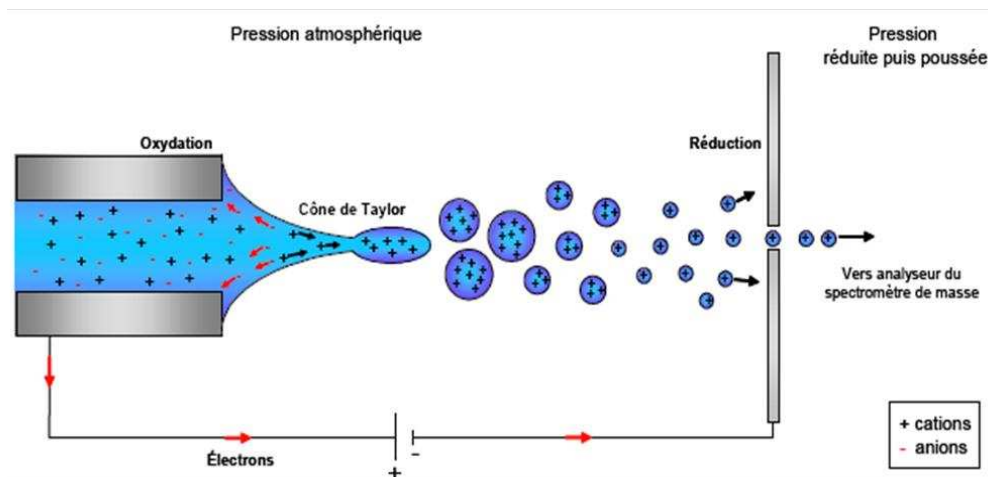


Figure 6: Schéma simplifié de l'ionisation électrospray d'après (Kearle 2000)

b. La désorption-ionisation laser assistée par matrice ou MALDI

Introduite en 1988 par Karas et Hillenkamp (Karas and Hillenkamp 1988), la méthode MALDI consiste à mélanger la substance à analyser à une solution de petites molécules organiques, appelée matrice. Un faisceau laser pulsé est utilisé pour désorber et ioniser le mélange matrice/échantillon cocrystallisé sur une surface métallique, la cible. Les molécules de matrice absorbent l'énergie transmise par le laser sous forme de photons UV, s'excitent et s'ionisent. L'énergie absorbée par la matrice provoque sa dissociation et son passage en phase gazeuse. Les molécules de matrice ionisées transfèrent leur charge à l'échantillon. Elle conduit à la formation d'ions mono et multichargés (Figure 7).

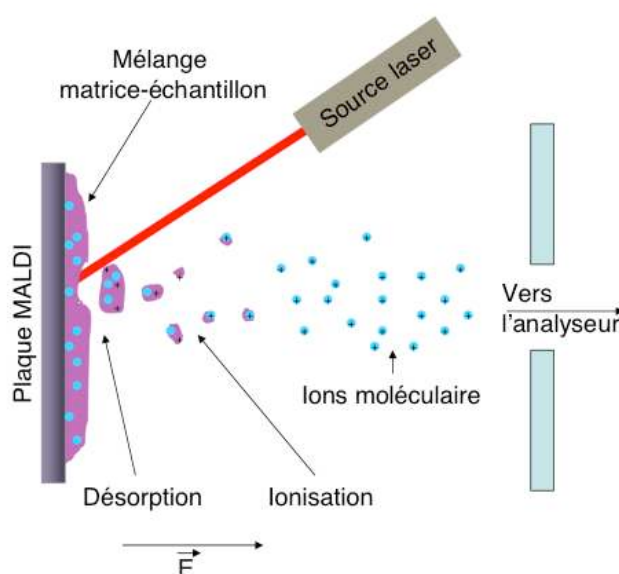


Figure 7: Schéma simplifié de l'ionisation MALDI.

Une variante du MALDI décrite par Hutchens et Yip (Hutchens and Yip 1993) est le Surface Enhanced Laser Desorption-Ionization ou SELDI (Seibert, Wiesner et al. 2004). Le principe et l'originalité du SELDI résident dans les surfaces d'affinité sur barrettes permettant la capture spécifique de cibles protéiques en fonction de leur caractère physico-chimique. Les surfaces de capture proposées offrent des propriétés multiples qui vont de la chromatographie classique (hydrophobe, hydrophile, anionique, cationique, affinité aux métaux) aux interactions biochimiques (anticorps, récepteurs, acides nucléiques) (Figure 8).

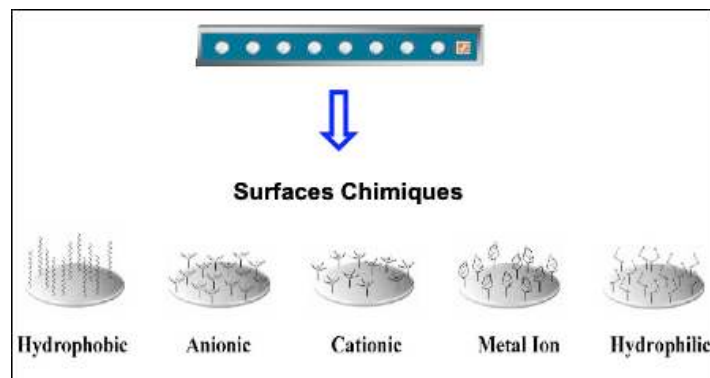


Figure 8: Schéma d'une barrette SELDI et des différentes surfaces d'affinité.

Ces surfaces vont permettre un fractionnement de l'échantillon et la capture d'un sous protéome qui sera analysé par spectrométrie de masse type MALDI. L'avantage majeur du SELDI est associé aux étapes de lavage des surfaces chromatographiques qui permettent l'utilisation de tampons normalement incompatibles avec les méthodes classiques de spectrométrie de masse. Cependant la quantification des protéines et la reproductibilité de cette technologie sont fortement critiquées (Albrethsen 2007). De plus, le SELDI ne permet pas l'identification des protéines d'intérêt.

2) Les analyseurs

Tout comme il existe différentes sources d'ionisations, il existe différents types d'analyseurs, classé en 2 catégories:

Les analyseurs à faisceaux d'ions comme les quadripôles et les analyseurs à temps de vol (TOF).

Les analyseurs à piégeage d'ions comprenant l'analyseur par résonance cyclotronique d'ions à transformée de Fourier (FT-ICR), l'Orbitrap et le piège ionique linéaire.

Ces analyseurs sont différents dans leurs mécanismes de séparation des ions et leur résolution. La résolution R représente la capacité de l'analyseur à séparer deux composés de m/z proche, et est donnée par $R=m/\Delta m$ où m correspond au rapport m/z mesuré et Δm à la largeur du pic à mi-hauteur. On parle de résolution FWHM de l'anglais Full Width at Half-Maximum peak height.

Dans ce travail de thèse, l'analyseur à temps de vol (TOF) ou l'Orbitrap associé en tandem au piège ionique linéaire (LTQ-Orbitrap®) ont principalement été utilisés. Ils sont décrits dans la partie qui suit.

a. L'analyseur à temps de vol ou TOF

L'analyseur à temps de vol (TOF) consiste à mesurer le temps que met un ion, accéléré par une tension électrique à parcourir une distance donnée dans un tube de vol. Il existe deux modes d'utilisation de cet analyseur. En mode linéaire (Figure 9), les ions sont accélérés vers le tube de vol par une différence de potentiel appliquée entre une électrode et la grille d'extraction. Les particules accélérées ayant toutes la même énergie cinétique passent ensuite dans le tube de vol, libre de champ, où elles sont séparées en fonction de leur vitesse acquise. Les ions les plus légers (de rapport m/z le plus petit) arrivent au détecteur plus rapidement que les ions lourds. Ce mode de détection linéaire n'est pas limité en m/z mais possède une faible résolution ($R=5000$); il est parfaitement adapté au profilage protéique d'échantillons sur protéines entières ayant pour but la classification hiérarchique des profils en fonction de leur similarité dans un but diagnostique, pronostic ou prédictif en clinique (Hsieh 2008 classification). C'est en mode linéaire que le TOF a été utilisé dans ce travail de thèse, afin de valider que notre stratégie permettait l'enrichissement des profils observés par rapport à une situation contrôle.

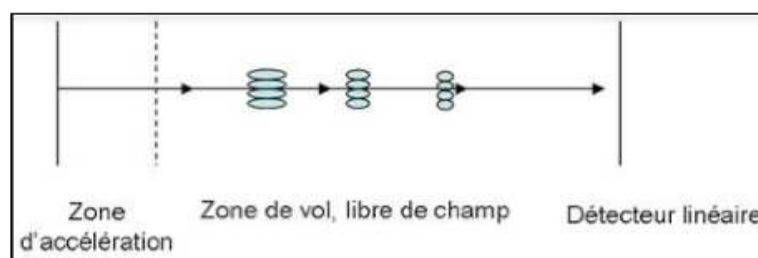


Figure 9: Trajet d'un ion dans l'analyseur à temps de vol en mode linéaire.

Pour des expériences ayant pour but l'identification d'une protéine, à partir de ses peptides tryptiques, ce mode linéaire n'est pas assez résolu. Le mode réflectron (Figure 10) permet

d'accroître la résolution. En mode réflectron, un miroir électrostatique impose un champ électrique de direction opposée à celle du champ accélérateur initial, et donc du mouvement des ions. Il permet d'allonger la distance de vol sans pour autant augmenter la taille de l'analyseur : les ions mettent plus de temps pour atteindre le détecteur, et réduisent aussi leur dispersion en temps, la résolution s'en trouve donc grandement améliorée. Plus résolu ($R=20\ 000$), ce mode est cependant limité à des m/z allant jusqu'à 10 000. Il est donc plus adapté à l'analyse de peptides.

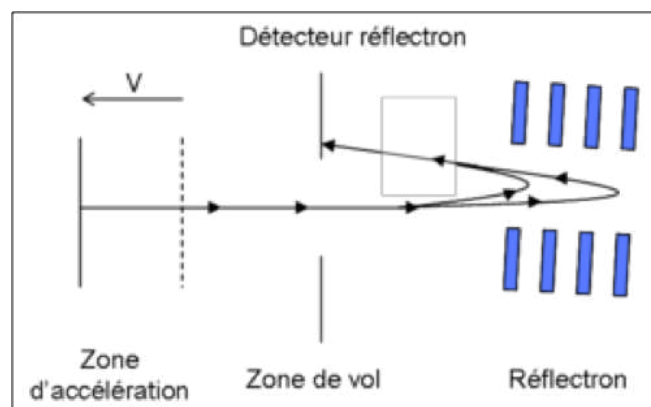


Figure 10: Trajet d'un ion dans l'analyseur à temps de vol en mode réflectron.

b. Le LTQ-Orbitrap

L'association en tandem du piège ionique linéaire et de l'orbitrap (Makarov, Denisov et al. 2006) est commercialisée par la société Thermo Scientific sous le nom de LTQ-Orbitrap® (Figure 11). Cet instrument a été utilisé pour toutes les analyses MS/MS dans ce travail de thèse.

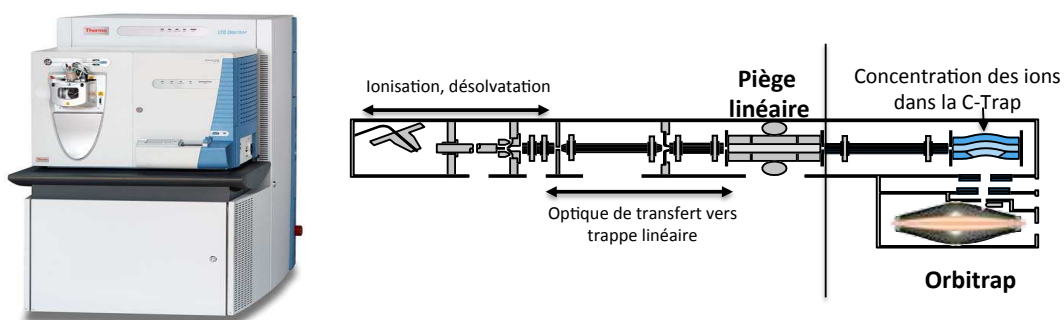


Figure 11: Photo et schéma simplifié du LTQ-Orbitrap® par Thermo Scientific.

Au cours d'une analyse MS/MS, l'Orbitrap fournit un spectre MS haute résolution ($R= 60\ 000$), permettant de déterminer avec précision la masse des peptides qui seront fragmentés

en MS/MS au niveau du piège ionique linéaire. Pendant l'acquisition de ce spectre MS haute résolution, 5 MS/MS consécutives de basse résolution ont lieu dans le piège ionique linéaire. La précision en masse fournie par l'excellente résolution de l'Orbitrap et la rapidité du piège ionique à réaliser des MS/MS, font du LTQ-Orbitrap le spectromètre de masse idéal pour l'identification rapide et exhaustive des protéines contenues dans un échantillon complexe. Introduit par Alexander Makarov (Makarov 2000), (Hu, Noll et al. 2005), l'Orbitrap est constitué d'une électrode externe creuse en forme de tonneau coupé en deux, à l'intérieur de laquelle est placée une électrode en forme de fuseau (Figure 12). Un champ électrique quadri-logarithmique est maintenu entre les électrodes. Les ions sont injectés de manière tangentielle par l'interstice séparant les deux moitiés de l'électrode externe. Les ions se mettent alors à osciller en orbite de l'électrode centrale et à chaque passage devant l'électrode externe, ils génèrent des courants induits sur lesquels est appliquée une transformée de Fourier permettant d'accéder aux m/z .

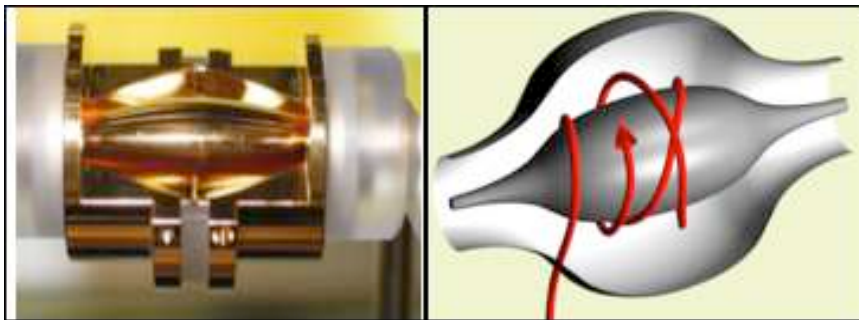


Figure 12: Photo d'un Orbitrap et schéma de la trajectoire des ions autour de l'électrode centrale.

Le piège ionique linéaire (Figure 13) est un analyseur constitué de quatre barres comme pour un quadripôle, fermé par une électrode d'entrée et une électrode de sortie, permettant de conserver les ions à l'intérieur du quadripôle en appliquant des tensions continues positives pour piéger les ions positifs, et négatives pour piéger les ions négatifs. Les ions effectuent des allers retours entre les électrodes terminales suivant z , et simultanément oscillent dans le plan xy par application d'une tension radiofréquence sur les barres du quadripôle, ce qui a pour effet de créer un champ quadripolaire. Dans un piège ionique, les ions de différentes masses sont présents simultanément, et on cherche à les expulser en fonction de leur masse en faisant appel à des fréquences de résonance. Le piège ionique linéaire utilisé dans ce travail de thèse expulse de manière radiale les ions, à travers des fentes creusées dans deux barres opposées du quadripôle, en appliquant une tension

alternative adaptée sur ces deux barres. Un détecteur est placé à la sortie de ces fentes permettant d'acquérir le spectre MS.

Dans le cas d'un piège ionique, l'analyse par MS/MS ne repose pas sur des régions distinctes de l'appareil mais sur des séquences successives au sein de la même enceinte. La sélection des tensions alternatives appliquées aux électrodes permet de conserver dans le piège que les ions d'une masse choisie et d'expulser du piège tous les autres. Après excitation, les ions précurseurs sélectionnés vont se fragmenter au cours du temps, via des collisions multiples avec les atomes d'hélium présents dans le piège. Les ions fragments produits sont ensuite expulsés et détectés pour donner le spectre MS/MS.

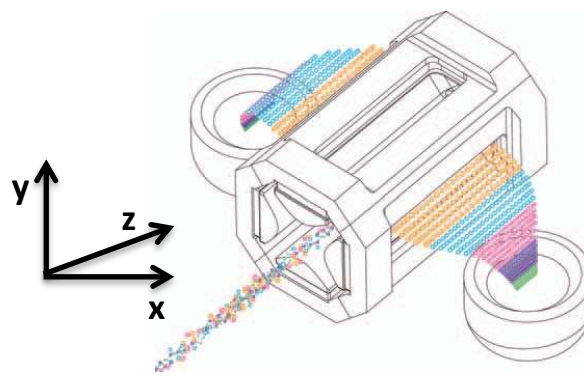


Figure 13: Schéma d'un piège ionique linéaire à éjection radiale par Thermo Scientific.

L'émergence de la protéomique clinique ces dernières années a permis le développement de nombreux spectromètres de masse différents par leur source d'ionisation et/ou leurs analyseurs. Ces différences vont impacter sur la gamme de m/z visible, la méthode de séparation des ions, la précision des masses et la résolution des spectres obtenus. En fonction des besoins de l'expérimentateur, l'utilisation d'un spectromètre de masse en particulier sera plus adéquate. Dans ce travail de thèse qui avait pour but la validation de nouveaux outils pour l'analyse protéomique du tissu et des fluides biologiques, nous avons utilisé un MALDI-TOF-MS pour évaluer l'efficacité de ces outils sur la capture protéique et leur intérêt pour le profilage protéique, et un LTQ-Orbitrap pour valider leur efficacité et reproductibilité de capture à travers l'identification et la quantification relative des protéines captées.

3. Les différentes étapes de l'analyse protéomique en spectrométrie de masse.

Avant son introduction dans le spectromètre de masse, l'échantillon doit être prélevé et conservé dans de bonnes conditions afin d'éviter la dégradation des protéines. Des étapes supplémentaires de séparation des protéines en fonction de leurs propriétés physico-chimiques sont également indispensables dans des expériences visant à identifier les protéines. Enfin, l'analyse des spectres obtenus, via des logiciels adaptés va permettre l'identification et la quantification relative ou absolue des protéines présentes dans notre échantillon.

Pour chacune de ces étapes, différentes stratégies ont été développées. La partie qui suit décrit les principales et celles utilisées durant mon travail.

1) Limiter la dégradation de l'échantillon

La fiabilité des résultats obtenus en protéomique dépend fortement des conditions de prélèvement et de préparation de l'échantillon, lesquelles doivent être préétablies pour assurer le maximum de reproductibilité. Dès la collecte de l'échantillon, les protéines contenues dans ce dernier doivent être protégées de l'activité des protéases endogènes et exogènes ; pour cela, une congélation rapide du fluide biologique ou du tissu prélevé, et l'utilisation d'anti-protéases le jour de l'analyse protéomique, sont essentielles. Le respect de ces conditions, qui nécessite d'optimiser chaque étape afin d'en assurer et d'en faciliter la réalisation, est une bonne garantie de débiter une étude sur un échantillon pas ou peu dégradé et de pouvoir ainsi identifier un plus grand nombre de protéines.

2) Séparer les protéines

Dans des expériences de profilage protéique sur protéine entière en MALDI-TOF-MS, l'échantillon va être directement introduit dans le spectromètre de masse sans réelle étape de séparation des protéines. Pour des expériences ayant pour but l'identification des protéines contenues dans des échantillons complexes comme le tissu cérébral ou les fluides biologiques, une étape de séparation des protéines basée sur leurs propriétés physico-chimiques est indispensable.

a. L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel (2-DE)

La 2-DE (O'Farrell 1975) est la méthode de choix pour séparer les protéines puisqu'elle permet la séparation de plusieurs milliers de protéines d'un mélange complexe en fonction de 2 propriétés différentes : le point isoélectrique et la masse moléculaire.

Après la séparation des protéines et leur coloration, leur intensité révélée par un spot va être proportionnelle à leur quantité relative dans l'échantillon. En fonction du colorant utilisé (Bleu de Coomassie, nitrate d'argent ou fluorescence), la sensibilité de détection mais aussi la gamme de linéarité quantitative sera différente (Tableau 2).

Méthode de coloration	Mode de détection	Limite de détection	Gamme de linéarité
Bleu de Coomassie	Colorimétrie	10-100 ng	1-3
Nitrate d'argent	Colorimétrie	1 ng	Pas de linéarité
Cyanines	Fluorescence	0,1 ng	3-5

Tableau 2: Caractéristiques des méthodes de coloration des gels d'électrophorèse bidimensionnelle.

Des avancées ont été réalisées avec la Difference Gel Electrophoresis (DIGE) qui consiste en l'utilisation de sondes fluorescentes permettant de marquer les extraits protéiques avec des sondes différentes et de les charger sur un même gel, améliorant grandement la reproductibilité qui fait souvent défaut aux techniques classiques sur gels (Marouga, David et al. 2005).

La 2-DE offre la possibilité d'étudier les variations d'abondance relative directement sur gel de chaque protéine et ce, sur des centaines de protéines simultanément. Elle permet aussi de voir les modifications post-traductionnelles, lesquelles vont modifier le point isoélectrique de la protéine. Elle est souvent utilisée pour la comparaison d'échantillon de même nature mais provenant de deux groupes différents (sain vs pathologique) afin de quantifier sur gel des différences d'expression protéique. Après avoir scanné les gels, un logiciel va repérer les spots et donc les protéines qui présentent une différence d'intensité significative entre les échantillons. L'identification de la protéine se fera par spectrométrie de masse : le spot contenant la protéine sera découpé, la protéine sera digérée à la trypsine pour générer des peptides qui seront identifiés en MS par empreinte peptidique massique, ou en MS/MS par séquençage peptidique (Figure 14). Cependant, malgré une certaine standardisation des protocoles opératoires, la 2-DE est une méthode lente, coûteuse, qui demande beaucoup de main d'œuvre. De plus elle ne permet pas une bonne séparation des

protéines aux propriétés physico-chimiques « extrêmes » (hautement acides/basiques, hydrophobes, de petite <7KDa ou grande taille> 200KDa).

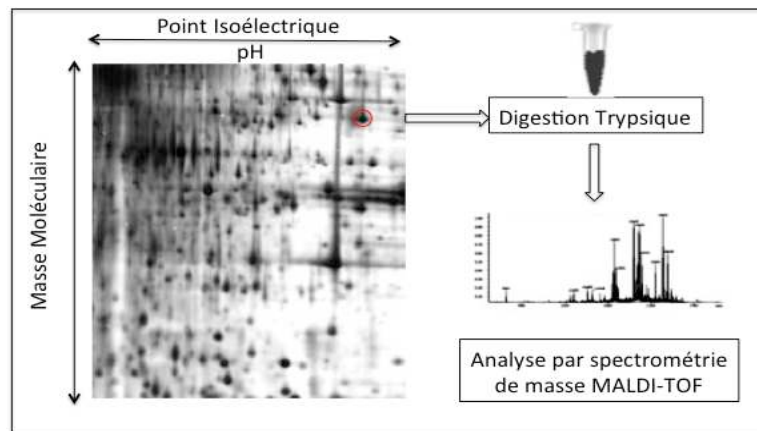


Figure 14: Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle associée à la spectrométrie de masse.

b. Le SDS-PAGE 1D couplé à la nanochromatographie liquide phase inverse (nano-LC)

Une solution alternative à la 2-DE pour la séparation des protéines a été le couplage du SDS-PAGE à la nanochromatographie liquide phase inverse (Figure 15). La première étape va permettre la séparation des protéines sur gel SDS-PAGE, en fonction de leur masse moléculaire. Les régions d'intérêt sont alors découpées sur gel et digérées à la trypsine. Les peptides extraits de ces digestions sont ensuite séparés en fonction de leur hydrophobicité par nano-LC sur nano-colonne de phase inverse de type C18. Ils sont enfin introduits dans un spectromètre de masse pour analyse et identification par MS/MS. Le couplage réussi de la nano-LC à la spectrométrie de masse (Cappiello, Famiglini et al. 2005) (MS) en fait une méthode de choix pour l'analyse du protéome. En effet, la connexion de ces deux plateformes permet un traitement automatisé à travers l'injection directe dans le spectromètre de masse des peptides élués de la nano-colonne. Cette stratégie a été adoptée pour séparer les protéines contenues dans nos échantillons.

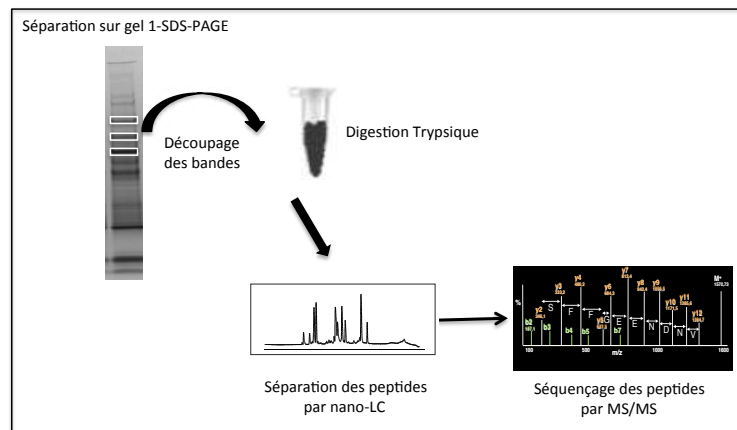


Figure 15: Principe du SDS-PAGE 1D couplé à la nano-chromatographie liquide.

3) Identifier les protéines

L'accumulation des données spectrales ne permet pas à elle seule d'identifier les protéines. Il faut ensuite traiter ces spectres afin d'identifier les protéines d'où les peptides tryptiques sont issus en interrogeant les banques de données selon une approche dite « bottom-up », c'est à dire une approche utilisant une série d'identifications de fragments de la protéine, qui apportent chacun une information spécifique pour l'identification et la caractérisation globale de la protéine étudiée. Si le génome de l'organisme étudié est disponible dans les banques de données protéiques, l'approche « Peptide Mass Fingerprinting » ou empreinte peptidique massique sera envisagée ; dans le cas d'un organisme non référencé ou ayant subi des mutations, une analyse MS/MS permettant d'obtenir une partie de la séquence des peptides analysés sera favorisée.

a. L'empreinte peptidique massique (Pappin, Hojrup et al. 1993), (Cottrell 1994)

Le principe de cette approche peut être décrit de la façon suivante : les fragments tryptiques obtenus expérimentalement sont analysés par MS afin de générer une liste de masse des peptides présents dans l'échantillon. Cette liste est comparée aux listes de masses théoriques obtenues par digestion *in silico* des protéines présentes dans les banques de données (SwissProt, NCBI) grâce à des logiciels spécifiques (Mascot, Prospector, Profound). En fonction du nombre de peptides identifiés, de l'écart de masse expérimentale et théorique et du pourcentage de recouvrement de la séquence protéique, la protéine pourra être identifiée (Figure 16).

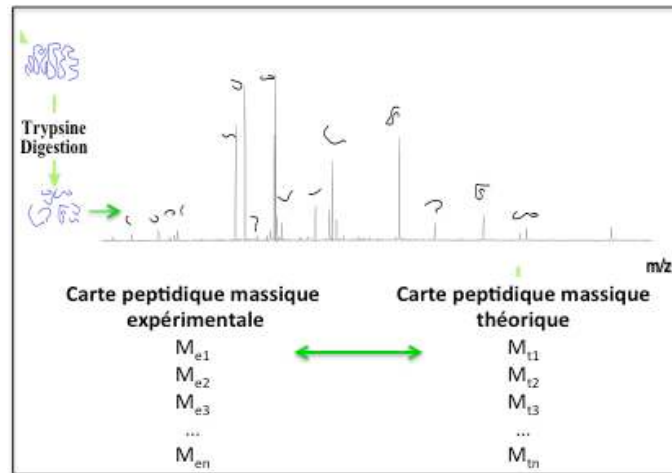


Figure 16: L'empreinte peptidique massique.

Néanmoins l'identification par cette stratégie peut échouer en cas de modifications post-traductionnelles, d'un recouvrement insuffisant de la séquence protéique ou d'absence de la protéine des banques de données. La présence de plusieurs protéines, dans l'échantillon analysé, va aussi compliquer les identifications ; d'où l'importance d'une séparation préalable.

En cas d'impossibilité d'identification, un séquençage peptidique par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) sera indispensable afin d'identifier la protéine.

b. Le séquençage peptidique par MS/MS (Yates, Eng et al. 1995)

Lorsque l'approche MS ne permet pas d'identifier les protéines à partir des peptides protéolytiques, il est possible de sélectionner les peptides d'intérêt et de les séquencer par une seconde MS. Les peptides sélectionnés entrent alors dans une cellule de collision où leur rencontre avec des molécules de gaz neutre va permettre leur fragmentation principalement au niveau des liaisons peptidiques, générant deux types de fragments (ou ions car chargés positivement). Les fragments b qui contiennent la partie N-terminale du peptide fragmenté et les fragments y qui contiennent la partie C-terminale. La différence de masse entre deux fragments consécutifs de même type (b ou y) sur le spectre MS/MS correspond donc à la masse d'un acide aminé. L'interprétation des spectres MS/MS est relativement aisée grâce aux outils informatiques disponibles (Figure 17). En effet, de la même manière qu'il existe des logiciels de recherche pour comparer les listes de masses peptidiques théoriques et expérimentales, il existe aussi des outils informatiques qui comparent la liste des masses des fragments peptidiques obtenus avec les listes de masses théoriques, ou encore des moteurs

de recherche capable de fonctionner avec une information de séquence partielle, appelée « peptide sequence tag » (Mann and Wilm 1994).

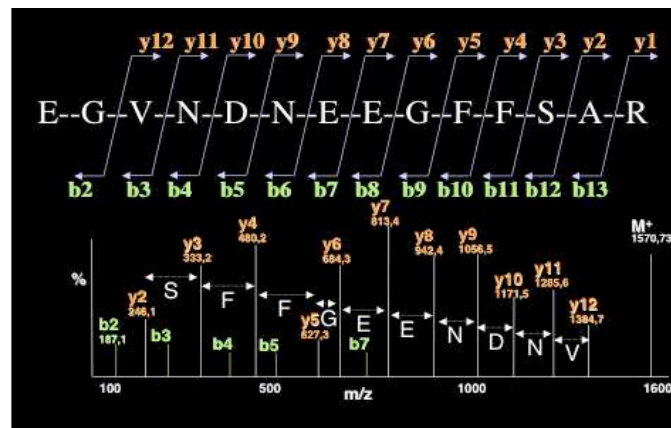


Figure 17: Le séquençage peptidique par MS/MS.

4) Quantifier les protéines.

Utilisée en clinique dans le but de mettre en évidence des différences d'expression protéique dans différentes pathologies, la spectrométrie de masse est devenue un outil puissant pour la quantification des protéines grâce à sa haute sensibilité, sa rapidité d'exécution et sa spécificité. Bien qu'une quantification relative par densitométrie puisse être réalisée sur les gels 2D, elle reste moins sensible et limitée aux protéines accessibles par cette technique excluant par exemple les protéines minoritaires, basiques, acides ou hydrophobes.

a. La quantification par marquage isotopique.

C'est pourquoi des techniques de marquage chimique isotopique comme l'Isotope Coded Affinity Tag (ICAT) (Gygi, Rist et al. 1999), (Shiio and Aebersold 2006), l'Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ), (Wiese, Reidegeld et al. 2007) (Wu et al 2006), le Stable Isotope Labelling by Amino acid in Cell Culture (SILAC) (Ong, Blagoev et al. 2002) (Qiu et Wang 2008) ou encore la méthode Absolute Quantification (AQUA) (Gygi, Rist et al. 1999), ont été développées en vue de quantifier les protéines par spectrométrie de masse. Bien qu'elles soient performantes et précises, ces approches, utilisant des marquages isotopiques, présentent plusieurs inconvénients tels qu'un coût relativement élevé et l'impossibilité de comparer de grandes séries d'échantillons.

b. La quantification sans marquage ou « label free ».

Plus récemment, une technique sans marquage dite « quantification label free » a été introduite (Wang, Wu et al. 2006), (Ono, Shitashige et al. 2006); elle présente un grand intérêt car elle permet une quantification relative fiable des protéines contenues dans un nombre beaucoup plus grand d'échantillons tout en réduisant considérablement les coûts d'analyse. Cette technique a été privilégiée dans ce travail de thèse suite à notre collaboration étroite avec le laboratoire du Dr Bernard Monsarrat à Toulouse.

La quantification « label free » se base sur la comparaison des intensités des signaux MS détectés lors de l'analyse individuelle de chaque échantillon. L'analyse des données MS consiste à utiliser comme point de départ les résultats d'identification MS/MS. A partir de ces résultats d'identification validés, les signaux MS des peptides sont extraits sous forme d'un courant ionique ou XIC (Extracted Ion Chromatogram). L'aire sous la courbe du pic chromatographique est le XIC et elle est proportionnelle à l'abondance du peptide dans l'échantillon (Ong and Mann 2005). Cette méthode consiste donc à extraire l'intensité du signal pour chaque peptide identifié, de m/z connu. La quantification est réalisée en comparant les XIC des peptides au sein des différents échantillons.

RESULTATS

Partie I

Développement d'une stratégie pour l'analyse
protéomique du tissu cérébral *in vivo*.

I. La stimulation cérébrale profonde : une opportunité pour l'analyse protéomique du cerveau *in vivo*.

1. Introduction

1) L'analyse protéomique du tissu cérébral post-mortem dans la MP.

Grâce au développement exponentiel de la spectrométrie de masse, la protéomique s'est révélée être un outil puissant, indispensable à l'identification et à la quantification des protéines en vue de détecter des modifications associées à un état pathologique. Elle a naturellement suscité l'intérêt de nombreux groupes de recherche ayant pour objectif l'analyse protéomique du cerveau humain (Zhang, Keene et al. 2008), (Shi, Caudle et al. 2009). En effet, l'analyse protéomique du cerveau humain est la première étape vers la compréhension de la structure et de la fonction cérébrale. Contrairement à la plupart des organes du corps humain, le cerveau est hautement organisé structurellement et chaque structure est associée à une fonction spécifique. Cette spécificité fonctionnelle des structures explique la vulnérabilité de régions cérébrales bien distinctes dans les différentes maladies neurodégénératives. L'analyse protéomique de ces régions pathologiques est en enjeu majeur à la compréhension des mécanismes moléculaires associés à la dégénérescence. Cependant l'accès difficile au tissu cérébral *in vivo* et l'invasivité des biopsies limitent actuellement ces études au stade post-mortem.

La première étude à s'être intéressée à l'analyse protéomique post-mortem de la SNc dans la MP a été réalisée en 2004 par Basso et al (Basso, Giraudo et al. 2004). Dans cette étude, les protéines extraites de la SNc de patients parkinsoniens et de patients contrôles ont été séparées et quantifiées par 2-DE, et identifiées par MALDI-TOF-MS. Cette étude a permis l'identification de 44 protéines dont 9 avec un taux d'expression significativement différent entre les deux groupes. Parmi ces protéines, la surexpression de la peroxiredoxin II (Fang, Nakamura et al. 2007), du complexe III (ubiquinol cytochrome c reductase) et V (ATP synthase) de la mitochondrie (Mizuno, Yoshino et al. 1998), jouant toutes les trois un rôle dans la régulation du stress oxydatif, a été observée dans le groupe pathologique, confortant ainsi l'existence d'un stress oxydatif accru dans la MP (Jenner and Olanow 1996), (Orth and

Schapira 2002). Suite à cette étude, d'autres travaux s'intéressant à l'analyse protéomique de la SNc (Werner, Heyny-von Haussen et al. 2008; Licker, Cote et al. 2012) ou d'autres régions cérébrales telles que le cortex frontal (Shi, Jin et al. 2008) ou le locus ceruleus (van Dijk, Berendse et al. 2012) ont été publiés. Ces différentes études ont permis d'identifier de nombreuses protéines présentes dans ces régions cérébrales, initiant ainsi une cartographie protéique de différents noyaux du cerveau post-mortem. En effet, 1263, 1864 et 2495 protéines différentes ont pu être respectivement identifiées dans la SNc (Kitsou, Pan et al. 2008), le cortex frontal (Shi, Jin et al. 2008), et le locus ceruleus (van Dijk, Berendse et al. 2012). En parallèle, ces études et d'autres ont mis en évidence des différences d'expression protéique entre le groupe parkinsonien et le groupe contrôle, confortant l'existence, d'un stress oxydatif accru, d'un dysfonctionnement mitochondrial et d'une altération du protéasome, et proposant aussi de nouvelles protéines potentiellement impliquées dans la pathogénèse de la MP. C'est le cas des études de Jin et al. (Jin, Hulette et al. 2006), et de Licker et al. (Licker, Cote et al. 2012) qui ont respectivement démontré la sous expression de la mortaline mitochondriale, et la surexpression de la CNDP2 (cytosolic non specific dipeptidase 2) dans la SNc de patients parkinsoniens en post-mortem. La confirmation de ces résultats par d'autres études sera nécessaire avant de s'intéresser à la fonction précise de ces protéines et à leur implication dans le processus dégénératif.

En résumé, l'analyse protéomique du tissu cérébral post mortem dans la MP a permis d'initier la cartographie protéique du cerveau, à travers l'identification des protéines contenues dans les différentes structures étudiées. Elle a aussi permis de mettre en évidence des différences d'expression protéique liées à la MP par des approches de protéomique quantitative. L'identification de protéines déjà décrites comme potentiellement associées à la pathogénèse de la maladie mais aussi la mise en évidence de nouvelles protéines telles que la mortaline et CNDP2 ont conforté l'implication de processus biologiques tels que le stress oxydatif et le dysfonctionnement mitochondrial dans la pathogénèse de la maladie.

Ces résultats confirment le fort potentiel de cette approche et ouvrent la voie à l'analyse protéomique d'autres régions cérébrales directement ou indirectement affectées, dans la MP, par la dégénérescence dopaminergique de la SNc. En effet, des études électrophysiologiques réalisées chez l'animal et le patient, ont montré que la dégénérescence de la SNc dans la MP entraîne une modification du fonctionnement de la

boucle motrice du circuit des ganglions de la base, se traduisant par l'apparition d'une activité électrique neuronale anormale au sein des structures de cette boucle (Obeso, Rodriguez-Oroz et al. 2008), (Blandini, Nappi et al. 2000). Aussi, l'analyse protéomique de ces noyaux dont l'activité neuronale est modifiée dans la MP constitue un intérêt majeur afin d'établir des profils protéiques pathologiques en complément des profils électrophysiologiques observés dans la MP. Les informations apportées par la protéomique viendraient ainsi compléter les données d'électrophysiologie, déjà décrites dans la littérature (Brown 2003) et acquises *in vivo* chez l'humain depuis plus de 20 ans, au cours de la procédure chirurgicale de stimulation cérébrale profonde proposée comme traitement symptomatique de la MP (Benabid 2003).

2) La stimulation cérébrale à haute fréquence du noyau sous-thalamique dans la MP.

a. La procédure chirurgicale

La stimulation cérébrale profonde du noyau sous-thalamique (STN) à 130 Hz s'est rapidement imposée comme le traitement chirurgical de référence des symptômes moteurs de la MP (Benabid, Chabardes et al. 2009). Elle consiste à délivrer un courant électrique continu via une électrode connectée à un stimulateur externe, et implantée par chirurgie stéréotaxique dans le STN.

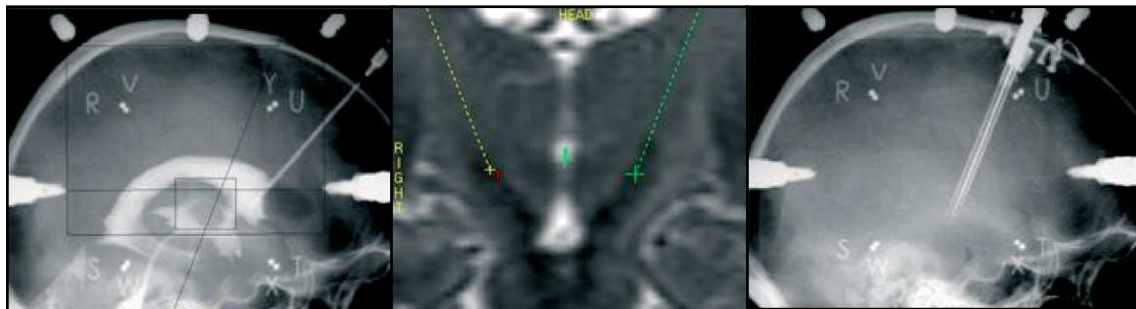


Figure 18: Localisation du STN par ventriculographie, IRM et électrophysiologie d'après Benabid et al.

La trajectoire optimale pour atteindre le STN est déterminée par IRM et ventriculographie. 5 microélectrodes vont permettre l'enregistrement électrophysiologique des régions cérébrales traversées, permettant de se repérer jusqu'au STN grâce à la signature électrique spécifique des noyaux traversés (Figure 18). Une stimulation électrique générée à la pointe de chacune des microélectrodes va déterminer la zone du STN la plus propice à la stimulation, en se basant sur l'atténuation des symptômes moteurs et les sensations du

patient durant ces épisodes de stimulation. Enfin une électrode définitive est placée dans cette zone du STN, et connectée au stimulateur externe placé sous la clavicule du patient (Figure 19).

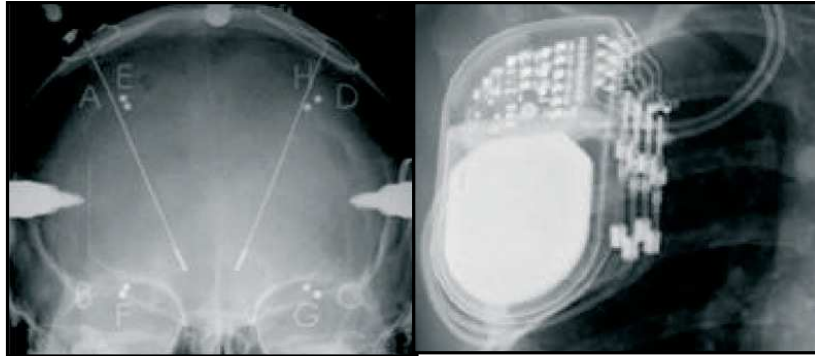


Figure 19: Implantation des électrodes définitives dans le STN et du stimulateur en sous-claviculaire.

Les paramètres de stimulation sont déterminés pour chaque patient ; ils peuvent être modifiés et la stimulation stoppée à tout moment. La réversibilité instantanée et l'action très locale de la stimulation ont multiplié son indication et la validation de son efficacité dans d'autres noyaux, pour d'autres pathologies (Perlmutter and Mink 2006). Ainsi, les tremblements essentiels (Ondo, Jankovic et al. 1998), les dystonies (Vidailhet, Vercueil et al. 2005), les troubles obsessionnels compulsifs (TOC) (Mallet, Polosan et al. 2008), et certaines formes d'épilepsies (Chabardes, Kahane et al. 2002) peuvent être atténués par la stimulation cérébrale profonde. Et aujourd'hui plusieurs milliers de personnes dans le monde bénéficient de ce traitement symptomatique dont les mécanismes d'action demeurent non élucidés (Montgomery and Gale 2008).

b. L'exploration électrophysiologique du cerveau *in vivo*.

En plus des bénéfices considérables apportés au patient par la stimulation cérébrale profonde, l'exploration électrophysiologique *in vivo* des ganglions de la base a révélé de précieuses informations sur l'activité électrique de ces régions, mettant en évidence des différences d'activité des neurones d'une même région selon la pathologie. En effet, Sanghera et al. (Sanghera, Grossman et al. 2003) démontrèrent des différences d'activité neuronale entre le globus pallidus de patients dystoniques et parkinsoniens. De la même manière, Piallat et al. (Piallat, Polosan et al. 2011) mirent en évidence un taux de décharge augmenté des neurones du STN chez les patients parkinsoniens, comparé aux neurones de ce même noyau chez les patients atteints de TOC. A l'instar des études électrophysiologiques

qui ont souligné des modifications d'activité, l'analyse protéomique des ganglions de la base permettrait d'identifier des modifications d'expression protéique consécutives à la dégénérescence dopaminergique, aux différents niveaux de la boucle motrice. Actuellement, l'analyse protéomique du tissu cérébral est limitée au post-mortem à des stades très avancés de la maladie, rendant difficile l'identification des premiers acteurs moléculaires responsables de la maladie. De plus, des facteurs pré et post mortem tels que l'état de médication, l'état hypoxique du cerveau et le délai de prélèvement vont fortement impacter sur l'état moléculaire du cerveau, augmentant et diminuant l'expression de nombreuses protéines (Hynd, Lewohl et al. 2003), (Crecelius, Gotz et al. 2008).

C'est pourquoi la protéomique devrait s'inspirer de l'électrophysiologie pour avoir une place au bloc opératoire et analyser le cerveau vivant, à un stade moins avancé de la maladie que celui observé dans les études post-mortem. En effet, l'accès temporaire à des régions profondes du cerveau au cours de procédures chirurgicales de plusieurs heures est une opportunité unique d'obtenir une information moléculaire du cerveau *in vivo*, s'affranchissant ainsi des limites des études post-mortem. Cependant les biopsies trop invasives et risquées dans des noyaux aussi petits que le STN ne sont pas envisageables.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai pu assister à de nombreuses implantations d'électrodes dans le STN. Juste avant l'implantation de l'électrode définitive, le chirurgien introduit un stylet de guidage dont l'extrémité interagit brièvement avec le STN. J'ai récupéré ces stylets au cours de différentes opérations et évalué si ce bref contact suffisait à l'obtention d'une information moléculaire représentative du tissu cérébral.

2. Article 1

Deep brain stimulation in Parkinson's disease: an opportunity for proteomics exploration of subthalamic nucleus.

Affif Zaccaria, Ali Bouamrani, Yohann Couté, Christophe Bruley, Jérôme Garin, Eric Seigneuret, Alim-Louis Benabid, Stephan Chabardes, François Berger.

Suppl data: <https://docs.google.com/folder/d/0B1GhVE-38pVBVUo4S3hjXORPUFU/edit>

Deep brain stimulation in Parkinson's disease: an opportunity for proteomics exploration of subthalamic nucleus.

Affif Zaccaria^{1,*}, Ali Bouamrani^{1,2,*}, Yohann Couté^{3,4,5}, Christophe Bruley^{3,4,5}, Jérôme Garin^{3,4,5}, Eric Seigneuret⁶, Alim-Louis Benabid², Stephan Chabardes⁶, François Berger^{1,2}.

¹ Grenoble Institute Neurosciences Brain and Nanomedicine Group, Inserm U836, UJF, CHU, Grenoble, France.

² CEA-LETI Clinatec, Grenoble, France.

³ CEA, IRTSV, Biologie à Grande Echelle, Grenoble, France.

⁴ INSERM, U1038, Grenoble, France.

⁵ Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

⁶ Department of Neurosurgery, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France.

* These authors contributed equally to this work.

Abstract

The emergence of proteomics holds the promise of significant progress in neurological diseases. However, limited access to human brain tissues and the restriction to post-mortem material impeded earlier molecular investigations of disease-associated mechanisms. Electrode implantation in functional neurosurgery for deep brain stimulation (DBS) is an appropriate opportunity to have a temporary access to cerebral regions in earlier stage of disease. This study reports a unique and valuable exploration of the STN protein content through the molecular analysis of tissue traces bound to the surgical stylet used during electrode implantation in a Parkinson's disease context. An appropriate sample preparation in the surgical room allowed the identification of 1353 different proteins by nano-LC-MS/MS. The presence of proteins already described as implicated in neurodegenerative disorders and representative of brain tissue underlies the relevance of such approach.

It provides an opportunity to perform molecular explorations on such fresh brain tissue fingerprints from different implanted nucleus. The method, imposing no additional surgical procedure, is readily translatable in routine neurosurgery and may constitute a significant complement to post-mortem brain tissue banking.

Proteomics has revealed itself as a powerful tool in the identification and quantification of proteins, and have stimulated a great interest for the analysis of the human

brain proteome in healthy and pathological state [1-3]. Up to now, the physical confinement of brain in the skull has limited deep brain nucleus to post-mortem proteomic analysis [4-8]. Although these studies permitted to correlate various biological pathways to neurological disorders, the results often derived from a very late stage of the disease and didn't consider medication, post mortem and agonal state of brain [9]. It has been reported that postmortem-related factors, as well as agonal conditions, generate significant changes in proteins and mRNA expression and degradation [10,11]. These modifications are related to oxidative stress, mitochondrial functions or inflammation, hence affecting the major molecular pathways described in several neuropathologies. In addition, postmortem samples generally derived from advanced disease stages, limiting most findings to late molecular events of the pathology. Availability of fresh brain tissues at the time of the disease progression would greatly improve the significance of proteomics explorations, providing a valuable insight into the pathological mechanisms. The implantation of electrode for deep brain stimulation (DBS) has become one of the most growing fields in functional neurosurgery [12,13]. The surgical procedure that takes several hours offers a temporary access to deep nucleus in well-suited conditions and has permitted to better understand the electrophysiological behavior of basal ganglia, involved in neurological and psychiatric diseases [14-16]. Once the optimal location is determined, the neurosurgeon uses a stylet to prepare the path for the definitive-electrode implantation.

In this study, we have taken advantage of a brief contact with the implanted subthalamic nucleus (STN) of Parkinson's disease (PD) patients to extract fresh molecular information from a, usually thrown out, surgical stylet (Figure 1).

With no additional intervention to the surgical procedure, an appropriate sample preparation in the surgical room allowed (i) the following identification of 1353 different proteins from the STN region by nano-LC-MS/MS. The

identification of proteins linked to neurodegenerative processes and representative of brain tissue confirmed an *in vivo* access to the brain proteome.

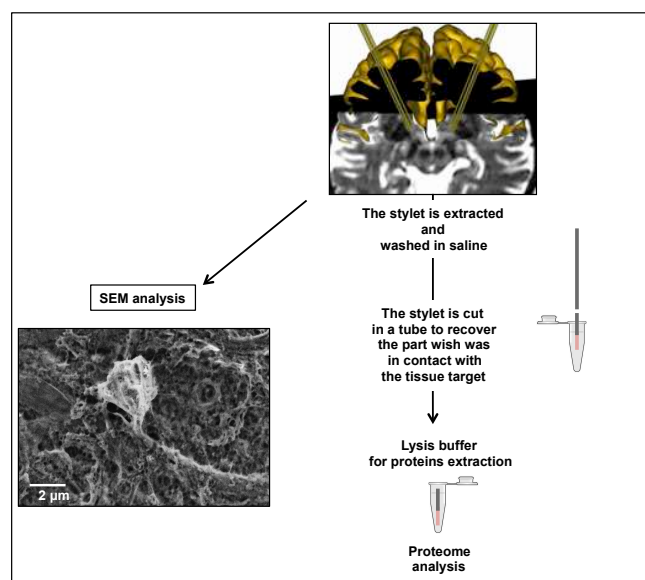


Figure 1: Schematic principle of the STN fingerprint procedure for proteomics investigations. The upper image represents the five parallel recording/stimulating microelectrodes implanted in the STN for intraoperative neuronal microrecording that provide the specific electrophysiological signature of the targeted nucleus. Scanning electron micrograph shows the brain tissue harvested on the extremity of the stylet. Scale bar is 2 µm. After their removal from brain, the extremities of stylets are immersed in the corresponding lysis buffer for protein extraction.

Human tissue samples were collected from two patients suffering from severe PD and who have been offered bilateral STN DBS treatment in Grenoble Hospital. Patients gave clear informed consent to participate in this study and we followed strict ethical guidelines given by the Comité Consultatif National d’Éthique (The French National Review Committee). Once removed from brain, the stylet was immediately immersed in 100µL 9M urea / 2% CHAPS buffer or briefly rinsed before in PBS buffer to remove blood contamination. MS profiling of tissue lysates were performed using cationic ProteinChip arrays (CM10, Biorad) and profiling was performed on a MALDI mass spectrometer (Autoflex, Bruker) in a linear mode. The washing step is essential to minimize blood proteins contamination. In fact, mass spectrometry profiling of the pre-washed fingerprint revealed a clear diminution of hemoglobin peaks (around 14 kDa) and an increased number of detected species,

particularly in low molecular mass (Figure 2a). In comparison, the unprocessed sample presented a profile similar to a blood sample with highly abundant hemoglobin, impeding the detection of other proteins.

In addition to the profiling approach, we performed an extensive proteome characterization of the pre-washed fingerprints. Protein identification of tissue obtained from 2 different stylets was performed after two different gel separation approaches (stacking gel or resolving gel) and LC MS/MS. Proteins were separated into 12 bands (patient 1) or stacked into one band (patient 2). Each band was cut and washed prior to iodoacetamide alkylation and in-gel digestion using trypsin. Peptides were extracted from gel bands and dried in a SpeedVac. Peptides were resuspended in 2% Acetonitrile/0.2% formic acid buffer and injected into a nanoLiquid Chromatography system (Ultimate 3000, Dionex®) coupled to an LTQ Orbitrap Velos (Thermo®). Peptides were separated using a micro-Pre-column cartridge (C18 Pepmap 100, LC Packings) and then separated using a 90 min RP gradient on a C18 column (Gemini C18 3µm 100A (75µm x 150mm)).

Data were processed using Mascot server 2.3.0 (Matrix Science) using following parameters: Enzyme=Trypsin/P with a maximum of 2 missed cleavages, a mass tolerance of 10 ppm for MS and 1 Da for MS/MS, with a fixed modification of Carbamidomethyl (C), and 2 variable modifications of Acetyl (Protein N-term) and Oxidation (M). Validation and false-positive rate assessment were performed using IRMA and hEIDI softwares. Protein groups identified with a minimum of 2 different peptides were validated.

Despite a remaining hemoglobin contamination clearly observed on the gel profile (Figure 2b), the identification of the peptide mixture extracted from the 12 bands revealed a total of 1187 different proteins. The stacking approach, performed on a sample from a different patient identifies 670 different proteins. Among these 670 proteins, 75 %

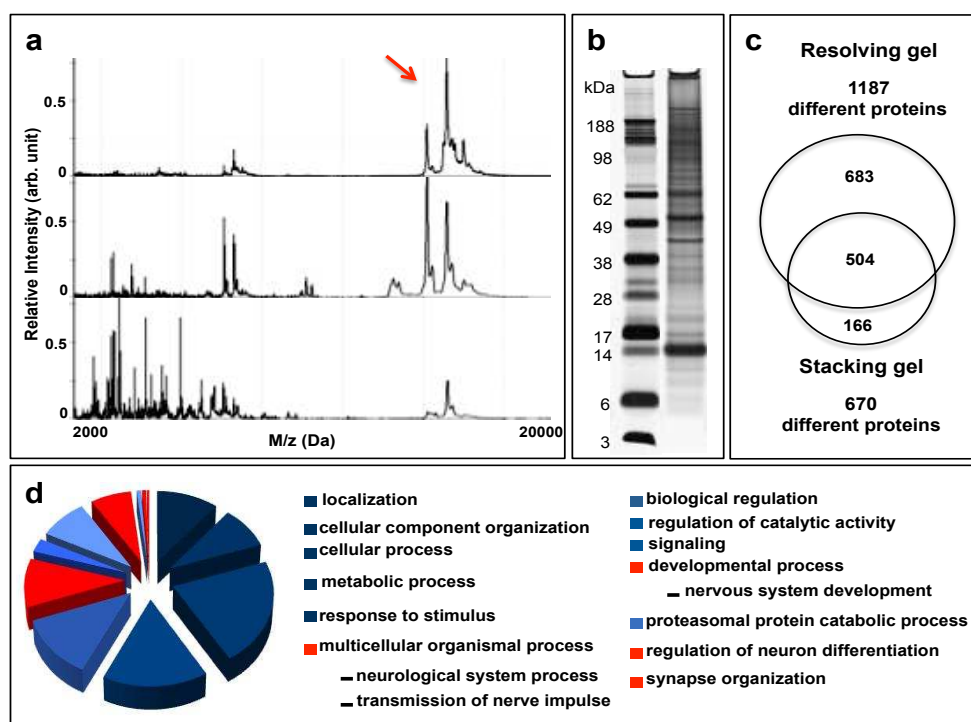


Figure 2: Proteomic analysis of the tissue fingerprint.(a) Mass spectrometry profiles of blood sample and proteins extracts from the tissue fingerprint before and after washing in saline buffer (from top to bottom). Relative intensity (arbitrary unit) and M/z (Da) correspond to y-axis and x-axis respectively. The MS profiling data shows the significant diminution of hemoglobin signals (red arrow) and the detection enrichment the sample pre-washed in saline. (b) SDS-PAGE separation of fingerprint protein extract. (c) Venn diagram presenting the number of proteins detected by LC MS/MS after stacking gel and resolving gel methods. (d) Biological processes repartition of the brain tissue fingerprint proteome identified after gel separation. Enriched brain-specific biological functions are colored in red. All proteins identified by nano-LC- MS/MS were classified according to the GO terms using gprofiler annotation tool.

were also identified in the other sample demonstrating the good reproducibility of our strategy. Together, 1353 different proteins were identified from STN fingerprints (Figure 2c). The detailed lists of proteins are accessible on PRIDE database. The quality of the biological information obtained from the fingerprint samples was comparable to those usually obtained with standard tissue samples originating from larger biopsies.

Within this proteomic dataset, the presence of astrocytes, neurons, or oligodendrocytes proteins such as Glial Fibrillary Acidic Protein, Neuronal Pentraxin 1 and Myelin-Oligodendrocyte Glycoprotein confirmed the cerebral origin of the tissue fingerprint samples. Functional annotation of the identified proteins using gprofiler tool [17] permitted to reveal a wide range of biological processes including metabolic process and ubiquitin proteasome system which are known to affect several neurological disorders. We also detected proteins associated with CNS specific processes

such as synapse organization, nervous system development and synaptic transmission (Figure 2d).

In order to investigate the biological mechanisms associated to the proteins identified from these brain fingerprints, proteomic data were analyzed through the use of Ingenuity Pathway Analysis software [18] (IPA, Ingenuity®Systems, Redwood City, CA). The datasets from stacking and resolving gels approaches were submitted to the software. Although the pre-fractionation method identified a significantly higher number of proteins, both datasets identified the same primary enriched processes including neurological disorder and psychiatric disorder (Figure 3a). More than 35 % of proteins identified in both samples have already been described as implicated in neurological diseases (Figure 3b). These results illustrated the cerebral origin of the samples. Furthermore, we detected several molecular actors associated with specific neuropathological diseases such as Huntington’s disease, Parkinson’s disease, or Alzheimer’s

disease (Figure 3b). These evidences illustrated the potential impact of molecular analysis in a neuropathological context. For example, proteomic exploration of the tissue fingerprint permitted to detect key molecules involved in Parkinson's signaling pathway such as α -synuclein, Sept5, p38 MAPK, Park7 and UCHL1. Other pertinent processes such as Glutamate receptor signaling and GABA receptor signaling were also significantly enriched, with the detection of key proteins such as GRM3 and GRIA glutamate receptors, postsynaptic protein PSD-95, GABA transporter GAT, or GABA receptor B.

In summary, our fingerprint approach provides fresh tissue samples from human brain functional regions and constitutes an unprecedented source of information in neurological diseases. The ability to dig out key actors of brain molecular processes taking place in the immediate environment of the pathology demonstrates the major interest of our fingerprint approach to greatly enhance the understanding of the complex networks and interactions underlying many psychiatric and neurodegenerative disorders. Extending the deep brain fingerprint procedure to the other different DBS treated disorders and the comparative analysis of the molecular modifications occurring in the same-targeted brain nuclei (for example in the STN for PD and OCD) will permit to identify the biological mechanisms specifically involved in each pathological situation.

As a perspective to this work, the next objective will be to implement an improved fingerprint technology enabling a spatially organized brain tissue harvesting and potentially improving the biocapture capacity using surface affinity development. Giving the extension of DBS indications and stimulation locations, the deep brain fingerprint will provide unique access to molecular and cellular information involved in a large set of neurological disorders such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, dystonia, essential tremor, epilepsy, OCD, and depression [19-24]. The fingerprint procedure is simple, low cost and readily translatable in

routine neurosurgery. It will improve the field of brain tissue biobanking, complementing the traditional postmortem tissue banks with original brain fingerprint banking. The widespread application of this deep brain molecular exploration could provide a great boost to the development of targeted therapies in neurodegenerative diseases, and offers perspectives for personalized therapy.

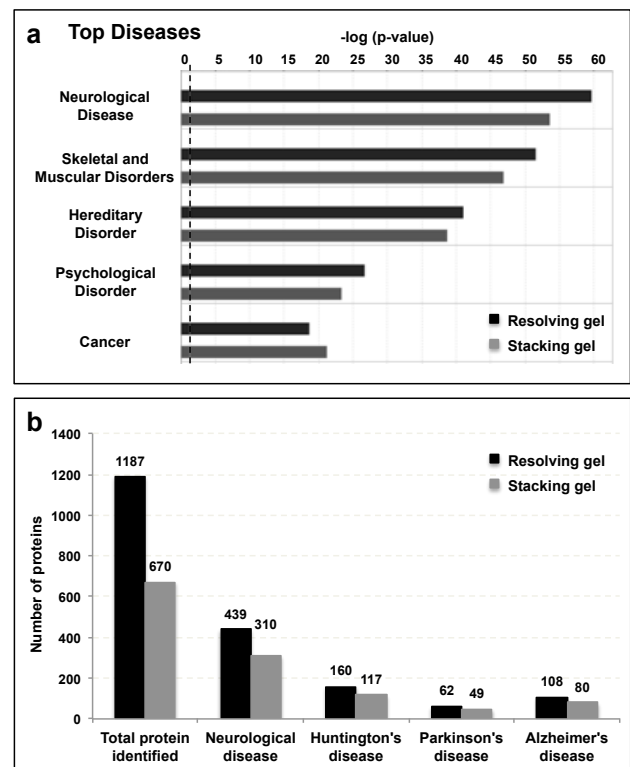


Figure 3: Functional annotation of proteomic data. (a) Top five diseases identified by the IPA software across the proteomic data sets. The IPA software allowed the identification of the biological functions and/or diseases that were enriched in our data sets. It also permitted to highlight the most significant pathways according to the proprietary knowledge database (The Ingenuity Knowledge Base). 1187 and 670 proteins IDs were mapped in the software database for the resolving gel and the staking gel methods respectively. The probability that a biological function assigned to the dataset is because of chance alone is determined by the Fisher's exact test P-value. The dashed line represents the threshold above which there are statistically more genes/proteins in a biological function than expected by chance. (b) Bar graph presenting the number of identified proteins associated with specific neuropathological diseases using IPA software. The number of molecules involved in each identified function is presented.

Acknowledgements: The authors thank the Department of Neurosurgery and the Biological Resource Centre at the Grenoble University Hospital. This work was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer, the Région

Rhône-Alpes, the Lyon Auvergne Rhône-Alpes Cancéropole and the Innabiosanté Foundation.

Authors Contributions

AZ, AB, FB conceived and designed the experiments. AZ, AB performed the experiments and analyzed the data. YC, CB, JG performed proteomic identifications and validation. ES, SC, ALB are the participating neurosurgeons. AZ, AB, FB wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Zhang, J.; Keene, C. D.; Pan, C.; Montine, K. S.; Montine, T. J., Proteomics of human neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* **2008**, *67* (10), 923-32.
2. Drabik, A.; Bierzynska-Krzysik, A.; Bodzon-Kulakowska, A.; Suder, P. et al, Proteomics in neurosciences. *Mass Spectrom Rev* **2007**, *26* (3), 432-50.
3. Caudle, W. M.; Pan, S.; Shi, M.; Quinn, T. et al, Proteomic identification of proteins in the human brain: Towards a more comprehensive understanding of neurodegenerative disease. *Proteomics Clin Appl* **2008**, *2* (10-11), 1484-97.
4. Basso, M.; Giraudo, S.; Corpillo, D.; Bergamasco, B. et al, Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics* **2004**, *4* (12), 3943-52.
5. Kitsou, E.; Pan, S.; Zhang, J.; Shi, M. et al, Identification of proteins in human substantia nigra. *Proteomics Clin Appl* **2008**, *2* (5), 776-82.
6. Schonberger, S. J.; Edgar, P. F.; Kydd, R.; Faull, R. L.; Cooper, G. J., Proteomic analysis of the brain in Alzheimer's disease: molecular phenotype of a complex disease process. *Proteomics* **2001**, *1* (12), 1519-28.
7. Sorolla, M. A.; Reverter-Branchat, G.; Tamarit, J.; Ferrer, I. et al, Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med* **2008**, *45* (5), 667-78.
8. Licker, V.; Cote, M.; Lobrinus, J. A.; Rodrigo, N. et al, Proteomic profiling of the substantia nigra demonstrates CNDP2 overexpression in Parkinson's disease. *J Proteomics* **2012**, *75* (15), 4656-67.
9. Hynd, M. R.; Lewohl, J. M.; Scott, H. L.; Dodd, P. R., Biochemical and molecular studies using human autopsy brain tissue. *J Neurochem* **2003**, *85* (3), 543-62.
10. Crecelius, A.; Gotz, A.; Arzberger, T.; Frohlich, T. et al, Assessing quantitative post-mortem changes in the gray matter of the human frontal cortex proteome by 2-D DIGE. *Proteomics* **2008**, *8* (6), 1276-91.
11. Tomita, H.; Vawter, M. P.; Walsh, D. M.; Evans, S. J. et al, Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol Psychiatry* **2004**, *55* (4), 346-52.
12. Benabid, A. L., Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* **2003**, *13* (6), 696-706.
13. Awan, N. R.; Lozano, A.; Hamani, C., Deep brain stimulation: current and future perspectives. *Neurosurg Focus* **2009**, *27* (1), E2.
14. Piallat, B.; Polosan, M.; Fraix, V.; Goetz, L. et al, Subthalamic neuronal firing in obsessive-compulsive disorder and Parkinson disease. *Ann Neurol* **2011**, *69* (5), 793-802.
15. Ferraye, M. U.; Debu, B.; Fraix, V.; Goetz, L. et al, Effects of pedunculo-pontine nucleus area stimulation on gait disorders in Parkinson's disease. *Brain* **2010**, *133* (Pt 1), 205-14.
16. Sanghera, M. K.; Grossman, R. G.; Kalhorn, C. G.; Hamilton, W. J. et al, Basal ganglia neuronal discharge in primary and secondary dystonia in patients undergoing pallidotomy. *Neurosurgery* **2003**, *52* (6), 1358-70; discussion 1370-3.
17. Reimand, J.; Arak, T.; Vilo, J., g:Profiler--a web server for functional interpretation of gene lists (2011 update). *Nucleic Acids Res* **2011**, *39* (Web Server issue), W307-15.
18. Jimenez-Marin, A.; Collado-Romero, M.; Ramirez-Boo, M.; Arce, C.; Garrido, J. J., Biological pathway analysis by ArrayUnlock and Ingenuity Pathway Analysis. *BMC Proc* **2009**, *3 Suppl 4*, S6.
19. Benabid, A. L.; Chabardes, S.; Mitrofanis, J.; Pollak, P., Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* **2009**, *8* (1), 67-81.
20. Vidailhet, M.; Vercueil, L.; Houeto, J. L.; Krystkowiak, P. et al, Bilateral deep-brain stimulation of the globus pallidus in primary generalized dystonia. *N Engl J Med* **2005**, *352* (5), 459-67.
21. Mallet, L.; Polosan, M.; Jaafari, N.; Baup, N. et al, Subthalamic nucleus stimulation in severe obsessive-compulsive disorder. *N Engl J Med* **2008**, *359* (20), 2121-34.
22. Kahane, P.; Depaulis, A., Deep brain stimulation in epilepsy: what is next? *Curr Opin Neurol* **2010**, *23* (2), 177-82.
23. Porta, M.; Brambilla, A.; Cavanna, A. E.; Servello, D. et al., Thalamic deep brain stimulation for treatment-refractory Tourette syndrome: two-year outcome. *Neurology* **2009**, *73* (17), 1375-80.
24. Laxton, A. W.; Lozano, A. M., Deep Brain Stimulation for the Treatment of Alzheimer Disease and Dementias. *World Neurosurg* **2012**.

3. Conclusions et Perspectives.

Dans cette étude, nous avons profité de l'accès temporaire au tissu cérébral durant l'implantation d'électrodes de stimulation pour obtenir une information moléculaire du cerveau chez le patient vivant et éveillé. Grâce au bref contact d'un stylet de guidage avec le noyau implanté, ici le STN, et à la mise au point d'un protocole d'extraction, des protéines fixées à l'extrémité du stylet, nous avons pu récupérer environ 20 µg de protéines, et identifier plus de 1300 protéines différentes. Cette approche est unique à ce jour et a été possible grâce à l'étroite collaboration avec les neurochirurgiens et neurologues du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble. Parmi ces 1353 protéines, la présence de protéines spécifiques au tissu cérébral et de protéines précédemment décrites dans les maladies neurodégénératives a confirmé l'intérêt d'une telle stratégie en vue d'explorer le protéome d'autres noyaux. En effet, l'efficacité de la stimulation électrique s'est étendue à d'autres pathologies et/ou d'autres régions telles que le STN dans les TOC (Mallet, Polosan et al. 2008) et l'épilepsie (Chabardes, Kahane et al. 2002), le noyau ventro-médian du thalamus (Benabid, Pollak et al. 1993) et le noyau pédonculo-pontin (Stefani, Lozano et al. 2007) dans la MP, le globus pallidus interne (GPi) dans les dystonies (Vidailhet, Vercueil et al. 2005) et la MP (Pahwa, Wilkinson et al. 1997)) ou plus récemment le fornix (Laxton, Tang-Wai et al. 2010) dans la maladie d'Alzheimer. La possibilité d'obtenir une empreinte moléculaire de chacun de ces noyaux permettrait d'établir une liste exhaustive des protéines présentes dans chacun d'entre eux et de souligner la spécificité protéique de ces derniers. De plus l'efficacité de la stimulation électrique du STN à la fois dans la MP, les troubles obsessionnels compulsifs (TOC) et certaines formes d'épilepsies nous offre l'opportunité d'obtenir le profil protéique d'un même noyau dans des pathologies différentes. Ces profils protéiques viendraient ainsi compléter les profils électrophysiologiques obtenus par Piallat et *al.* (Piallat, Polosan et al. 2011). Les modifications d'activité électrique pourraient être ainsi associées et corrélées aux modifications d'expression de certaines protéines permettant ainsi de souligner les mécanismes moléculaires associés à ces changements d'activité électrophysiologique. Alors que jusqu'à présent, l'analyse protéomique du tissu cérébral humain dans la MP était limitée à des échantillons post-mortem, nous sommes les premiers à avoir identifié des protéines du STN chez le patient parkinsonien vivant. L'avantage majeur de cette stratégie est de pouvoir disposer d'une information moléculaire à un stade moins

avancé de la MP et dans un contexte où les facteurs pouvant biaiser l'expression des protéines, comme l'état de médication ou l'intervalle post-mortem sont contrôlés ou absents. Aujourd'hui nous disposons d'une trentaine de prélèvements réalisés au cours d'implantation d'électrodes dans trois pathologies (MP, TOC et dystonie) et deux noyaux différents (STN et GPi). Nous envisageons de réaliser l'analyse protéomique de ces échantillons en collaboration avec le laboratoire du Dr Jérôme Garin au CEA de Grenoble. Bien entendu, une meilleure compréhension de la MP passe par l'analyse protéomique de la SNc à un stade plus précoce ; la localisation de la SNc sur la trajectoire ciblant le STN nous offre l'opportunité d'obtenir une information moléculaire de ce noyau à un stade moins avancé de la maladie. Nous réaliserons très prochainement les premières empreintes *in vivo* dans la SNc de patients parkinsoniens. Des empreintes dans la SNc non dégénérée de patients atteints de TOC et implantés dans le STN constitueront les échantillons contrôles, offrant ainsi la possibilité d'identifier des protéines potentiellement associées à la dégénérescence de la SNc dans la MP, via des approches de protéomique quantitative. Un projet en collaboration avec l'hôpital universitaire de Genève en collaboration avec le Pr Pierre Burkhard, spécialisé dans l'analyse protéomique de la SNc, devrait démarrer en Mai 2013. Les résultats préliminaires de ces projets pourraient aboutir sur un projet multicentrique au sein duquel la collecte d'échantillons provenant de différents patients, différents noyaux et différentes pathologies constituerait une banque d'empreinte moléculaire précieuse et unique à ce jour, ayant pour objectif la compréhension des mécanismes moléculaires dans les maladies neurologiques pour lesquelles la stimulation cérébrale est appliquée. Enfin, afin de faciliter et de standardiser la récupération de ces empreintes au bloc opératoire, nous développons actuellement des stylets de guidage dont l'extrémité sera directement sécable, dans des tubes contenant le tampon d'extraction protéique.

II. Validation de l'efficacité et de l'effet non lésionnel d'un nouvel outil pour la capture *in vivo* de tissu cérébral.

1. Introduction

1) Présentation de l'outil

Afin d'optimiser l'information moléculaire obtenue *in vivo* pendant l'implantation d'électrodes de stimulation, nous avons développé et breveté, en collaboration avec le CEA-LETI de Grenoble un nouvel outil, plus adapté à la micro-capture tissulaire. En effet, le stylet chirurgical, utilisé à l'origine pour faciliter l'introduction de l'électrode définitive dans le tube guide, ne garantit pas une capture reproductible et homogène. De plus, nous ne pouvons exclure une contamination par des micro-fragments tissulaires présents dans le tube guide et provenant des différents noyaux traversés avant d'atteindre le STN. Nous avons donc besoin d'un outil disposant d'une surface plus adaptée permettant une empreinte tissulaire reproductible et spécifique des noyaux ciblés. Notre collaboration avec le CEA-LETI nous a permis de déterminer le matériau approprié : le silicium, un matériau inerte que l'on peut micro-structurer à façon et fonctionnaliser chimiquement. Nous avons donc découpé du silicium sous forme de puces (Figure 20A). Dans ce travail de thèse, les puces utilisées avaient une longueur de 7 mm, une largeur de 0,6 mm et une épaisseur de 0,3 mm. Sur ces puces, un groupement anionique carboxylate a été fonctionnalisé (Figure 20B et annexe 1). Afin d'augmenter la surface de contact, des picots octogonaux de 80 μm de diamètre et 50 μm de hauteur séparés de 240 μm ont été réalisés par photo-lithographie (Figure 20C).

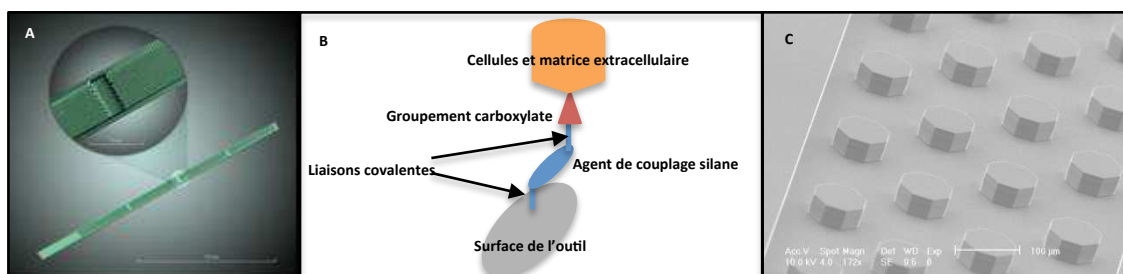


Figure 20: Puce en silicium modifiée chimiquement et micro-structurée. (A) Représentation schématique de la puce. (B) Principe de la fonctionnalisation chimique. (C) Microscopie électronique à balayage des micro-picots.

Des tests réalisés *ex vivo* sur du tissu tumoral ont mis en évidence l'adhésion à la puce en silicium, d'une multicouche tissulaire contenant les cellules et la matrice extracellulaire (MEC)(Figure 21). Nous avons aussi montré *ex vivo* que les modifications de surface implémentées sur le silicium permettaient une capture différentielle du protéome augmentant qualitativement et quantitativement les protéines détectées en spectrométrie de masse, par rapport à une puce similaire en inox chirurgical.

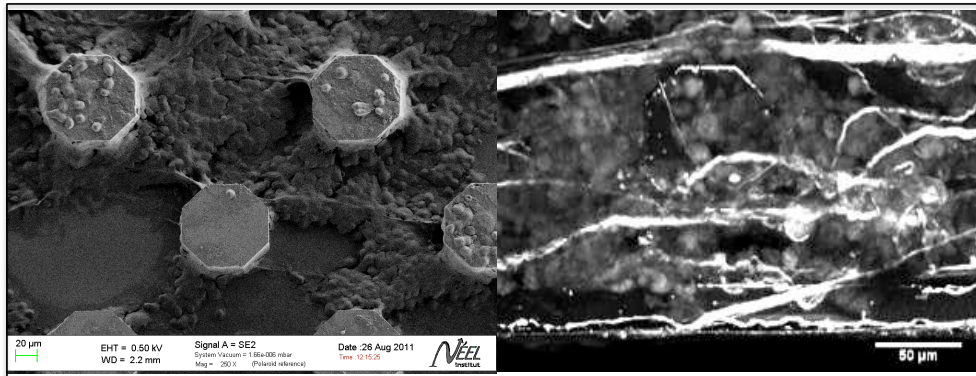


Figure 21 : Observation du tissu tumoral récupéré sur une puce en silicium, par microscopie électronique à balayage (gauche) et bi photonique (droite). Les fibres blanches (droite) sont des fibres de collagène de la MEC.

Afin d'assurer une capture tissulaire spécifique de la région ciblée, la puce en silicium a été associée à un outil chirurgical lui empêchant toute interaction avec les différents noyaux traversés jusqu'à la cible. La figure 22 présente l'outil dans sa version complète : la puce en silicium a été fixée à une tige métallique. Cette tige est insérée dans un tube guide avec une fenêtre d'exposition latérale qui va permettre l'exposition de la puce en silicium et son contact avec le cerveau. Par simple rotation de 180° de la tige métallique sur laquelle la puce est fixée, nous pouvons exposer ou masquer le silicium et donc réaliser une empreinte tissulaire à l'endroit et au moment voulu. Au cours de la descente jusqu'à la cible, le silicium est masqué. Arrivé dans le noyau d'intérêt, il est exposé le temps de l'empreinte tissulaire. Puis, il est de nouveau masqué pendant le retrait de l'outil du cerveau.

Un intérêt de notre outil est sa capacité à conserver la spatialité du noyau sur la puce. Par chirurgie stéréotaxique, on peut réaliser des empreintes tissulaires sur toute la hauteur d'un noyau ou même réaliser une empreinte chevauchant deux noyaux bien distincts. La puce est ensuite facilement détachée de l'outil et traitée selon les besoins de l'analyse.

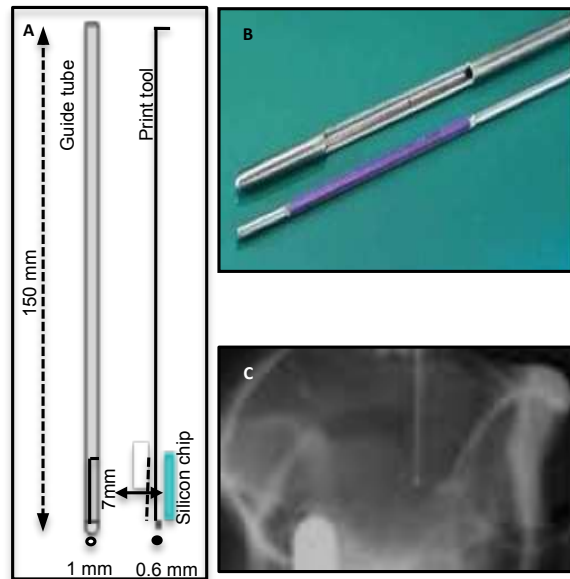


Figure 22: L'outil d'empreinte tissulaire. (A) Schéma et (B) photo de l'outil d'empreinte tissulaire. (C) Radiographie réalisée durant la réalisation d'une empreinte *in vivo* chez le primate.

L'utilisation d'un tel outil chez l'humain durant les interventions neurochirurgicales nécessitait avant tout une validation de son efficacité de capture tissulaire *in vivo* chez l'animal. Afin d'évaluer aussi l'effet lésionnel de notre outil dont les dimensions ont été choisies pour le cerveau humain, le choix du primate s'est rapidement imposé. De plus, dans l'optique d'études futures sur le primate ayant pour objectif l'analyse moléculaire du tissu cérébral, la possibilité de réaliser des empreintes *in vivo* dans différents noyaux est un enjeu majeur pour l'identification des mécanismes moléculaires associés à une pathologie ou aux effets d'un traitement.

Nous avons donc évalué l'efficacité de capture et l'effet lésionnel de notre outil chez le primate et démontré l'intérêt d'une telle stratégie dans les études précliniques s'intéressant aux modifications moléculaires au niveau cérébral.

2. Article 2

A micro silicon chip for *in vivo* cerebral imprint in monkey.

Affif Zaccaria, Ali Bouamrani, Laurent Selek, Michelle El Atifi, Anne Marie Hesse, Aurélie Juhem, David Ratel, Herve Mathieu, Yohann Coute, Christophe Bruley, Jerome Garin, Alim L Benabid, Stephan Chabardes, Brigitte Piallat and François Berger. **ACS Chemical Neurosciences**, 2012.

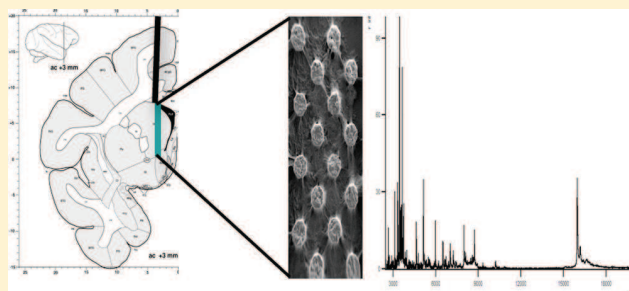
Suppl data: <https://docs.google.com/folder/d/0B1GhVE-38pVBTZMU1Ffy3BCM0k/edit>

A Micro-Silicon Chip for *in Vivo* Cerebral Imprint in MonkeyAffif Zaccaria,^{*,†} Ali Bouamrani,[‡] Laurent Selek,^{†,▽} Michelle El Atifi,[†] Anne Marie Hesse,[§] Aurélie Juhem,[⊥] David Ratel,[‡] Herve Mathieu,[#] Yohann Coute,[§] Christophe Bruley,[§] Jerome Garin,[§] Alim L Benabid,[‡] Stephan Chabardes,^{||,▽} Brigitte Piallat,^{||} and François Berger^{†,‡}[†]Institut des Neurosciences Team 7 Brain Nanomedicine, INSERM U836, UJF, CHU, Grenoble, France[‡]Clinatec, CEA-LETI, Grenoble, France[§]Biologie à Grande Echelle, IRTSV, CEA, Grenoble, France, and INSERM, U1038, Grenoble, France.[⊥]Ecrins therapeutics, BIOPOLIS, 38700 La Tronche, France^{||}Institut des Neurosciences Team 11 Brain Function and Modulation, INSERM U836, UJF, CHU, Grenoble, France[▽]Department of Neurosurgery, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France[#]Institut des Neurosciences Team 5 Functional and Metabolic Neuroimaging, INSERM U836, UJF, CHU, Grenoble, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Access to cerebral tissue is essential to better understand the molecular mechanisms associated with neurodegenerative diseases. In this study, we present, for the first time, a new tool designed to obtain molecular and cellular cerebral imprints in the striatum of anesthetized monkeys. The imprint is obtained during a spatially controlled interaction of a chemically modified micro-silicon chip with the brain tissue. Scanning electron and immunofluorescence microscopies showed homogeneous capture of cerebral tissue. Nano-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (nano-LC-MS/MS) analysis of proteins harvested on the chip allowed the identification of 1158 different species of proteins. The gene expression profiles of mRNA extracted from the imprint tool showed great similarity to those obtained via the gold standard approach, which is based on post-mortem sections of the same nucleus. Functional analysis of the harvested molecules confirmed the spatially controlled capture of striatal proteins implicated in dopaminergic regulation. Finally, the behavioral monitoring and histological results establish the safety of obtaining repeated cerebral imprints in striatal regions. These results demonstrate the ability of our imprint tool to explore the molecular content of deep brain regions *in vivo*. They open the way to the molecular exploration of brain in animal models of neurological diseases and will provide complementary information to current data mainly restricted to post-mortem samples.

KEYWORDS: Neurodegenerative diseases, cerebral imprints, *in vivo*, tissue harvesting, proteomics, transcriptomics



With the demographic aging and the augmentation of the life expectancy, age-related neurodegenerative disorders are an increasing public health problem. Until now, the exact pathogenetic mechanisms underlying the degenerative process in neurological diseases are still not understood.¹ In fact, the relative inaccessibility of cerebral tissue impedes the molecular analysis of pathological brain regions in the early postdiagnostic stage. Although genomic expression studies^{2–5} or proteomic analyses^{6–8} of human cerebral tissues permit correlation of some biological pathways, including mitochondrial and proteasomal dysfunctions or oxidative stress, to neurological diseases, all of these results have been restricted to post-mortem samples and are generally derived during advanced disease stages. With the development of animal models of neurodegenerative diseases in primates,⁹ accessibility to and analysis of the brain at different stages of degeneration is now conceivable.¹⁰ However, this requires the sacrifice of the animal, rendering impossible brain molecular follow-up in the same

animal.¹¹ In fact, performing several biopsies in the same brain regions is unthinkable because of the lesion effects caused by current biopsy tools.¹² We recently developed a new tool specifically adapted for brain tissue imprints. The harvesting surface is based on a silicon chip, which harbors chemical and structural modifications. During a surgical approach less traumatic than biopsy, we demonstrated that this microchemically modified surface, when exposed to the specific investigated brain area, provides local cellular capture. As a result of anionic capture, both cells and extracellular matrices are harvested providing a unique opportunity for *in situ*, spatially oriented bioharvesting. On the basis of this concept, we have developed a specific device for primate research. In this study, we assessed

Received: August 4, 2012

Accepted: December 8, 2012

(i) the capacity of our tool to harvest brain molecules in the putamen and caudate nucleus (i.e., striatum) of a healthy monkey and (ii) the lesional effects induced by repeated targeting in basal ganglia. Molecular investigations on the tissue captured by the silicon chip demonstrated the compatibility of our strategy with large-scale transcriptomic and proteomic studies. Furthermore, the behavioral monitoring of the animals following repeated brain tissue imprints did not reveal any obvious modification. Finally, both the postmortem imaging and histological analyses confirmed the minimal lesion-effect induced by our tool.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, we present a new tool developed by our group and designed to obtain cerebral imprints in the basal ganglia of monkeys (Figure 1). This tool is based on a silicon chip, which

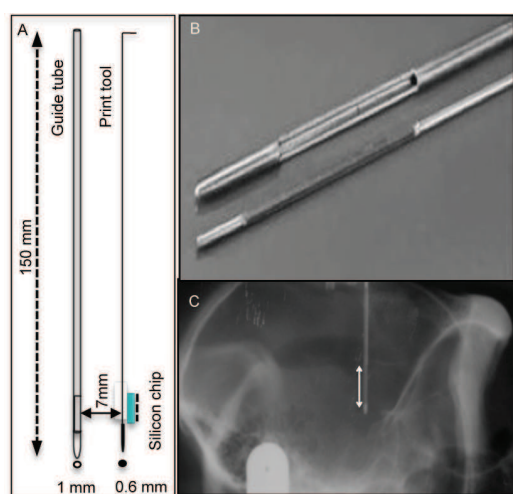


Figure 1. Tool design and X-ray scan of a cerebral imprint (A) Schematic representation of the imprint tool. The guide tube prevents the capture of nonspecific tissue during the descent. The exposure of the silicon chip by a 180° rotation of the inner tool allows harvesting of the desired tissue. (B) Picture of the imprint tool. (C) X-ray scan of the monkey skull during the execution of a cerebral imprint in the caudate nucleus. The window of exposure (white arrow) is easily seen.

has been chemically and structurally modified. To prevent the capture of tissue in nonspecific regions, the silicon chip is hidden during the insertion and removal of the tool. Once the tool is inserted into the targeted region, the silicon chip is exposed via the window of the guide tube, allowing the tissue imprint to be obtained. The main aims of this study were to confirm (i) the capacity to perform multimolecular analysis from *in vivo* cerebral imprints and (ii) the safety of repeated cerebral imprints in the basal ganglia. Five different cerebral imprints were performed at different times in both caudate nucleus and putamen of two different monkeys. We performed 10 different cerebral imprints in two monkeys, and only 8 imprints have been displayed in this study.

After each cerebral imprint, motor and finger-skill tests were performed to monitor potential behavior modifications of each monkey. Baseline assessment of the distances moved (Figure 2A) and the velocities of movement (Figure 2B) were significantly different between the two monkeys (Mann–Whitney test; distance moved, p value = 0.0089; velocity, p value = 0.0091). However, for each monkey, repeated cerebral

imprints in the putamen and caudate nucleus had no significant effect on the distances moved and the velocities of movement, compared with their individual baseline values (Mann–Whitney test; p value > 0.05). From the first to the fifth imprint, behavior assessments were not progressively worsened, confirming there is no cumulative effect induced by repeated tool insertion (Figure 2C). The same results were obtained with finger-skill tests (Figure 2D); the time required to pick up rewards in three different wells was significantly different between the two monkeys at baseline (p value = 0.0002), while for each monkey, no difference was observed before and after cerebral imprints (p < 0.05). These results suggest that our tool may allow repeated cerebral imprints in basal ganglia without functional lesion-induced effects.

To confirm the *in vivo* capture of tissue on the silicon chip, we performed scanning electron microscopy (SEM). As shown in Figure 3A, the cerebral imprint permitted homogeneous capture of a thin layer of putamen tissue on the silicon chip (left picture). A focus on the micropillar surface showed the presence of a variety of cells (middle), including elongated and adherent cells with extensive processes (right). To identify the cell subtypes captured on the chip, immunofluorescence labeling was performed using antibodies against GFAP and NeuN. As shown in Figure 3A, apart from blood contamination, putamen tissue fixed on the chip was identified as neurons (NeuN positive nuclei) and astrocytes (GFAP positive cells). These results demonstrate the ability of the tool to harvest a homogeneous, thin layer of brain tissue. Thus, a spatial cellular fingerprint is obtained providing a unique tridimensional spatially oriented biocapture.

To further characterize the molecular content of the freshly harvested tissue, we used nano-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (nano-LC-MS/MS) to identify the captured proteins.

We first quantified the total protein amount present on the chip. Four different cerebral imprints performed in putamen and caudate nucleus of both monkeys revealed an average capture of $16.3 \pm 4.8 \mu\text{g}$ of proteins. The qualitative capture of different proteins by the chip was assessed by both MS profiling and 1D sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) migration (Figure 4A). Both techniques revealed the harvesting of many different mass proteins despite the presence of hemoglobin around 15 kDa. In addition to these approaches, we performed an extensive proteomic characterization of the tissue harvested on the chip. The amount of recovered material, approximately $16 \mu\text{g}$ of total proteins, permitted analysis of the sample by nano-LC-MS/MS and a total of 1158 different proteins were identified and considered for further analysis.

The presence of brain associated proteins such as glial fibrillary acidic protein (GFAP), neuronal specific septin 3, synapsin 1, or neural cell adhesion molecules 1 and 2 (NCAM 1/2) confirmed the harvesting of cerebral parenchyma. The submission of these 1158 different species to Ingenuity Pathway Analysis¹³ for functional characterization highlighted 347 and 91 different proteins, which have been described as implicated in neurological and psychological disorders, respectively (Figure 4C). These proteins are significantly implicated in brain specific signaling pathways such as axonal guidance and synaptic long-term potentiation or depression but also in neurological disease associated pathways such as Huntington or Parkinson's diseases (Table 1).

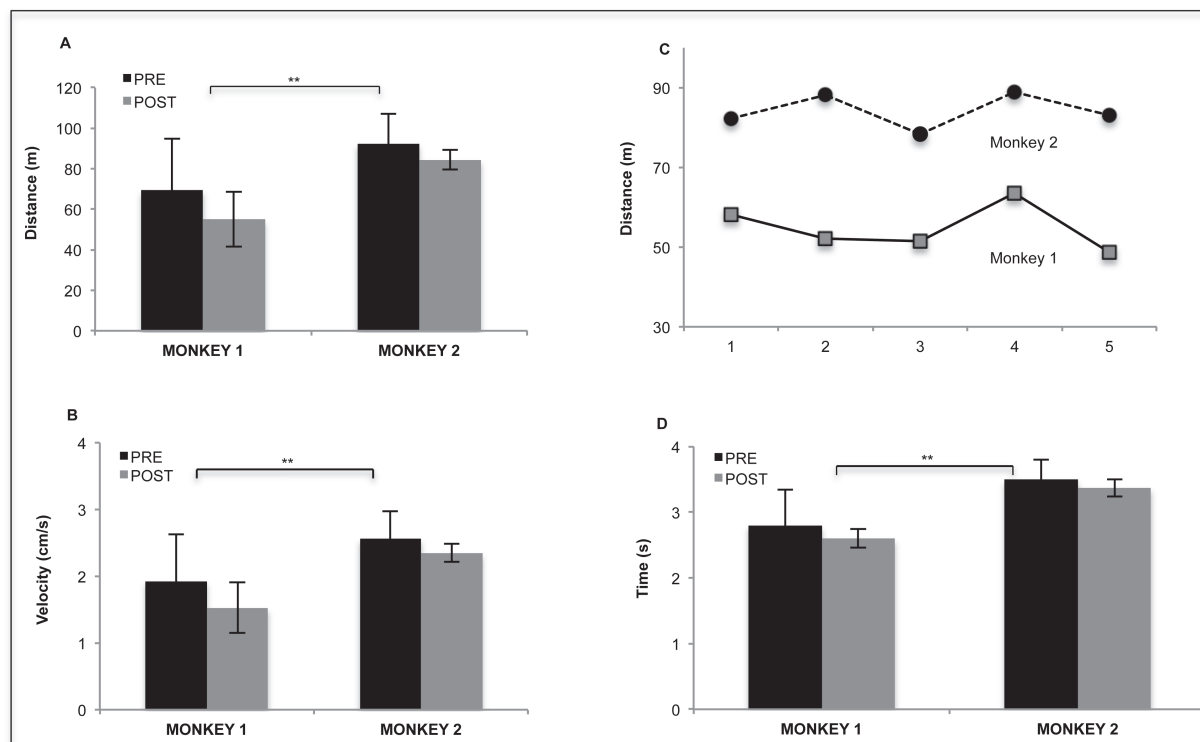


Figure 2. Motor activities of monkeys after repeated cerebral imprints. Distance moved (A) and velocity of movement (B). Animals were assessed by the video system for 60 min before the first cerebral imprint (PRE, $n = 5$) and after each imprint (POST, $n = 5$). Evolution of the distance moved after each cerebral imprint ($n = 5$) for both monkeys (C). Finger skill tests (D). Animals were assessed by the time required to pick up three peanuts in 1 cm wells before the first (PRE, $n = 15$) and after each cerebral imprint (POST, $n = 15$). Data are presented as the means \pm SD ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Mann–Whitney test.

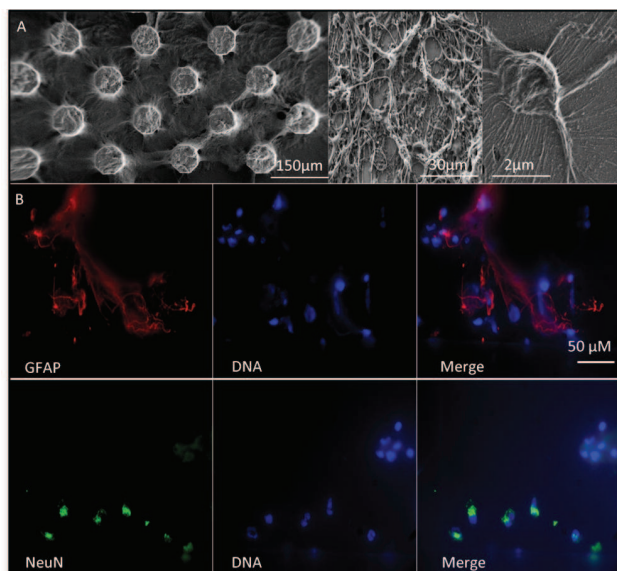


Figure 3. Microscopic observation of a cerebral imprint (A) Scanning electron micrograph showing (left) the homogeneous capture of tissue on the silicon chip, (middle) a variety of cells on the micropillar, and (right) an elongated cell with extensive processes. (B) Immunostaining of glial fibrillary acid protein (GFAP) and neuronal nuclei (NeuN) on the captured cerebral imprint. Astrocytes were identified as GFAP-positive and NeuN-negative cells (top) and neurons showed NeuN-positive nuclei without GFAP labeling (bottom). The chip was stained for GFAP (red), NeuN (green), and Hoechst (blue).

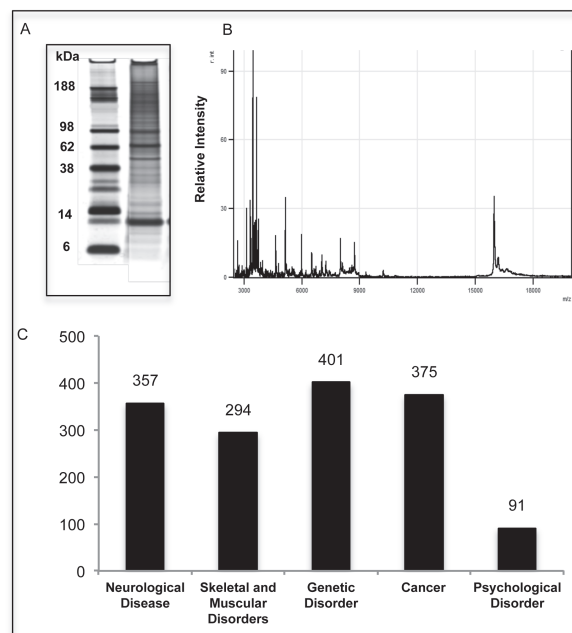


Figure 4. Proteomic analysis of the cerebral imprint. Analysis of proteins extracted from a cerebral imprint by 1D SDS-PAGE (A) and mass spectrometry profiling (B). (C) Functional annotation of the cerebral imprint proteome identified by nano-LC-MS/MS. The bar graph represents the number of identified proteins in each disease or disorder signaling pathways classified as the most significant using the Ingenuity Pathway Analysis software.

Table 1. Functional Analysis by Ingenuity Pathway Analysis^a

Ingenuity canonical pathways	<i>p</i> -value	IPA DataBase	cerebral imprint	ratio (%)
Parkinson's signaling	1.00×10^{-3}	18	5	27.8
Huntington's disease signaling	3.16×10^{-14}	238	40	16.8
glioma invasiveness signaling	9.77×10^{-4}	60	9	15.0
synaptic long-term potentiation	1.74×10^{-5}	114	16	14.0
dopamine receptor signaling	3.39×10^{-5}	95	13	13.7
amyotrophic lateral sclerosis signaling	9.12×10^{-6}	119	16	13.4
glutamate receptor signaling	9.77×10^{-4}	69	9	13.0
axonal guidance signaling	2.00×10^{-14}	433	56	12.9
dopamine–DARPP32 feedback in cAMP signaling	3.24×10^{-3}	187	16	8.6
synaptic long-term depression	1.29×10^{-2}	147	12	8.1

^aSignaling pathways significantly represented by the identified proteins from a putamen-targeted cerebral imprint. Pathways displayed in bold are associated with Parkinson's disease and putamen signaling. The ratio is calculated as the number of proteins from the cerebral imprint that map to the pathway divided by the total number of proteins described as associated with the pathway (IPA DataBase).

Moreover, the identification of α -synuclein,¹⁴ DJ-1,¹⁵ UCHL-1,¹⁶ monoamine oxidase B,¹⁷ superoxide dismutase,^{18,19} and tyrosine hydroxylase²⁰ indicates that the cerebral expression of relevant proteins for PD studies could be determined by our approach in a living monkey. Finally, the identification of tyrosine hydroxylase and the significant expression of both dopamine receptor signaling and dopamine–DARPP32 feedback in cAMP signaling with IPA strongly suggest that the cerebral imprint had been performed in a brain region with dopaminergic activity, such as the putamen or caudate nucleus.^{21–24} These results demonstrate the capacity of our tool to harvest and identify relevant proteins in specific brain regions.

Complementary to proteomics studies, microarray analysis provides considerable information about molecular pathways deregulated in neurodegenerative diseases,^{25–26} particularly in PD.^{27–29} This technology measures the mRNA levels of all known genes coding for proteins in a given sample simultaneously.³⁰ Because RNA is labile and subject to rapid degradation, extraction and quality control are critical to ensure a relevant analysis.³¹ In general, microarray analyses are performed from post-mortem extracted RNA; here, we analyzed expression levels of RNA extracted from the caudate nucleus of a living primate. Two cerebral imprints were successively performed in the same caudate nucleus, and total RNA was extracted. We aimed to compare their similarity with RNA extracted from post-mortem sections of the same caudate nucleus, which is the gold standard method, used here as control samples. First, quality was controlled; the quality of the RNA extracted from the imprint tool was satisfactory and similar to the post-mortem sample (rRNA 28S/18S ratio = 1.1). The analysis of the cerebral imprints revealed 27% detected probe sets in common (i.e., 14691 out of 54675) with 95% reproducibility between the two imprints (Figure 5A) and a high correlation (Figure 5B) between their expression in imprint 1 (*y*) and 2 (*x*) ($y = 1.0002x$; $r = 0.994$). The control sections showed a detection ratio of 28% and 85%

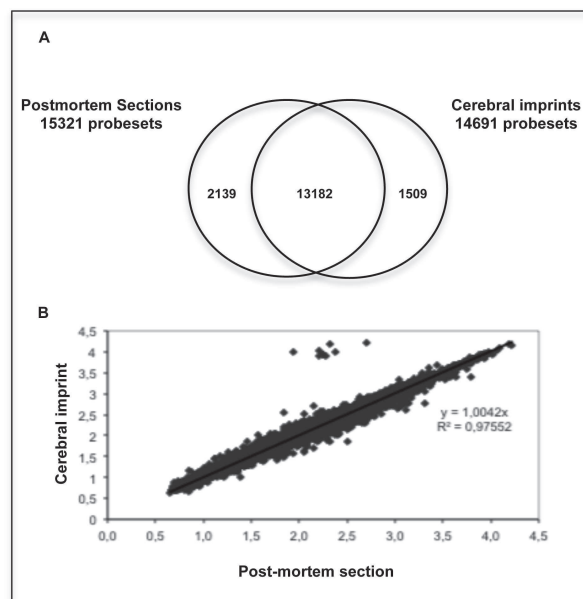


Figure 5. Assessment of RNAs from the cerebral imprint in comparison with RNAs from the corresponding post-mortem sections. (A) Venn diagram representing the extent of overlap of probe sets detected from RNA extracted from cerebral imprint and post-mortem sections. (B) Linear regression curve representing the intensity of expression of the common probe sets between cerebral imprints and post-mortem sections.

reproducibility between the two post-mortem sections (data not shown). The comparison of cerebral imprints and post-mortem sections revealed 89% detected probe sets in common (Figure 5A), and the linear regression curve (Figure 5B) revealed a great correlation between their expressions in imprints (*y*) and control samples (*x*) ($y = 1.0032x$; $r = 0.987$). These results revealed (i) the gene expression reproducibility of two consecutive cerebral imprints and (ii) similarity with gene expression of the gold standard post-mortem sections. Functionally, the capture by our tool of mRNA previously described by Bossers et al.²⁸ as differently expressed in a PD post-mortem caudate confirmed our ability to reach relevant transcriptomic information from our cerebral imprints.

The post-mortem MRI of one dissected brain confirmed the proper trajectories of our imprints (Figure 6B). GFAP staining was used to visualize astrocytes around the imprint tool tracks, because insertion of probes into the brain parenchyma induces a glial reaction. An increase in the density of glial cells and the length of glial cell processes is seen. Gliosis around imprint tool tracks was investigated using qualitative analysis at light and laser scanning microscopic levels of sections stained with the astroglial marker GFAP and the pan-microglia marker Iba-1. In the brain examined at 1 month after acute probe implantation, large, strongly stained “reactive astroglial cells” were observed around the probe tracks (Figure 6D). Increased GFAP staining up to 300 μ m was observed at the imprint tool implantation site. In parallel, the Iba-1 staining was used to visualize microglia composition in the brain tissue around the tools acutely implanted with the imprint tool 1 month following implantation. We did not observe any microglia activation around the tracks; however, some macrophages were visualized in the tracks, possibly related to localized microbleeding (data not shown).

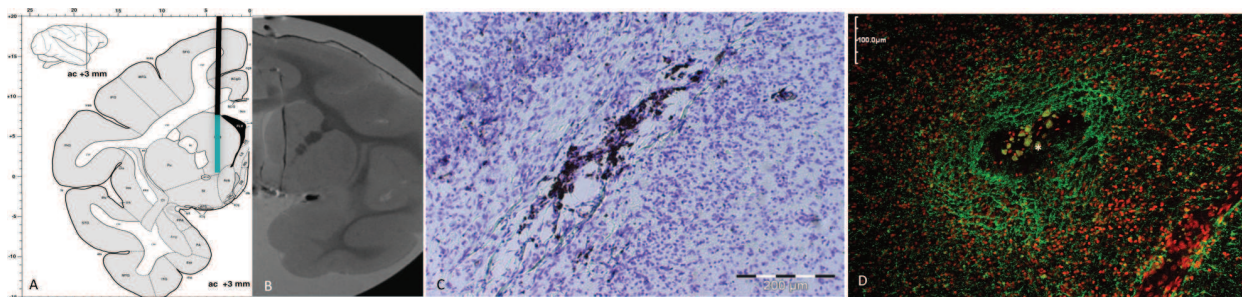


Figure 6. Brain tissue imprinting in monkey: A combined MRI and histological analysis. (A) A coronal plane of the Rhesus monkey brain atlas with the imprint tool trajectory. (B) Coronal MRI view of an imprint tool track in monkey caudate nucleus. (C) Photomicrograph showing cresyl violet staining around an imprint tool track. Calibration bar = 200 μm . (D) Photomicrograph showing astrocytes (GFAP staining, green) and counterstained cells (PI staining, red) around one imprint tool track (asterisk) following acute implantation in monkey caudate nucleus. Calibration bar = 100 μm .

CONCLUSIONS

The ability to access cerebral tissue is mandatory to better understand molecular mechanisms associated with neurodegeneration. The development of animal models such as the MPTP-monkey for PD provided the possibility to access brain tissue at different stages of neurodegeneration. However, the absence of an adapted tool for brain tissue harvesting limited studies to post-mortem samples.

This work introduces a new tool that could inform about *in vivo* molecular and cellular content of brain regions in monkey, through the harvesting of a thin layer of tissue. Repeated cerebral imprints in deep nucleus did not induce motor impairments and provided specific proteomic and transcriptomic information. In fact, one technical advance of this tool resides in its ability to expose the capture surface once in the targeted nucleus, preventing molecular contamination from other tissues. The capacity to perform several imprints on the same monkey at different times in different brain regions opens the way to a personalized molecular follow-up of brain. Different nuclei could be simultaneously or successively explored by proteomic or transcriptomic approaches to map the living brain and to complete information provided from post-mortem analyses. As classically observed after the introduction of microsurgical tools in the human brain, cerebral imprints also activated astrogliosis and induced microbleeding. We should be aware about the tissue damages induced by the tool introduction, which may affect protein and mRNA expression in targeted nuclei. In a context to understand molecular modifications induced by neurodegenerative diseases, imprint-induced modifications should be well characterized and distinguished from those induced by a pathological process through the use of unilateral model. Our approach could also be helpful in experiments assessing the molecular effects of strategies such as high-frequency stimulation³² or gene therapy.³³

MATERIAL AND METHODS

Animals. Experiments were conducted on two cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*; CRP Port Louis, Mauritius): age 8 years old, weight 8 kg (monkey 1), and 10 years old, 11 kg (monkey 2). All experiments were carried out in accordance with the recommendations of the European Community Council Directives of 1986 (86/609/EEC), the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The Ethics Committee of Region Rhône-Alpes approved the experimental protocol. Animals were kept with other congeners in an air-conditioned room under

standard conditions of temperature (23 ± 1 °C), humidity (65% \pm 4%), light (12 h light/dark cycle), and food/water available ad libitum.

Surgical Procedure. After induction under general anesthesia with ketamine–xylazine (10 mg–1 mg/kg, im, Imalgene, Centravet, France), the monkey's head was fixed in a Kopf stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). All operations were performed under sterile conditions. Ventriculography was performed by injecting a contrast medium into the anterior horn of the lateral ventricle at 27 mm anterior to the interaural line and 2 mm lateral to the midline with an angle of 20° anteroposteriorly. Positions of anterior (AC) and posterior (PC) commissures were identified on a sagittal radiograph. Cannulae were fixed on the skull bone above the right putamen at 3 mm posterior to AC and 11 mm lateral to the midline, and above the right caudate nucleus at 3 mm anterior to AC and 4.5 mm lateral to the midline, according to the stereotaxic atlas of *Macaca fascicularis* (BrainInfo, University of Washington, <http://braininfo.rprc.washington.edu/>). Analgesic/anti-inflammatory therapies (ketoprofen 2 mg/kg, im) and antibiotics (amoxicillin/clavulanic acid, 10 mg/kg, im) were administered during the postoperative period.

The Imprint Tool. The imprint tool is composed of three independent parts (Figure 1A,B). (1) A guide tube of 1-mm external diameter with a window of 7-mm. The length of the window has been chosen in accordance with the height of putamen and caudate nucleus at the coordinates of the cannula location. (2) A tool of 0.6-mm diameter with a dedicated space to support the silicon chip. (3) The silicon chip of 7-mm with an anionic surface and micropillar design to increase the interaction surface. Once inserted in the guide tube, rotation of the tool by 180° exposes or hides the chip in the window.

Behavioral Monitoring. To assess the potential lesions induced by brain imprints, cage activity levels were assessed in 1 h intervals (each Tuesday 10:00), before the first cerebral tissue imprint (control phase; $n = 5$) and 4 days after each imprint ($n = 5$). Behavioral measures, including distance traveled (m) and movement speed (cm/s) were quantified from videotape recordings using an automated video-tracking system, Ethovision (Noldus Information Technologies, The Netherlands).³⁴ The calibration of the software permitted determination of the position of the animal based on x and y coordinates, which were then used to calculate the different motor parameters.

At the end of each session, finger skill was also tested objectively by measuring the mean time required to pick up peanuts in three 1 cm diameter wells. The measure was included only if the monkey kept focus on the wells until all the peanuts had been collected. Mann–Whitney tests were performed using GraphPad InStat version 3.00 (GraphPad software, San Diego, California, USA).

Experimental Protocol. Every 15 days, under the same general anesthesia and sterile conditions, the monkey's head was fixed in a Kopf stereotaxic apparatus. The imprint tool was fixed to the stereotaxic manipulator. It was slowly inserted via the cannula so the window was exclusively in the putamen (i.e., 23 mm below the dura)

or the caudate nucleus (i.e., 20 mm below the dura). The silicon chip remained unexposed to the window during insertion of the cannula to prevent nonspecific molecular fixation. Once the cannula was inserted into the target, the tool supporting the silicon chip was rotated by 180° to expose the chip for 2 min, thus allowing the cerebral tissue to imprint. The chip was then hidden by a new rotation of the inner tool and the imprint tool was slowly removed from brain (Figure 1C). Overall, 10 tissue imprints (5 in each nucleus) were performed for both monkeys. Animals were sacrificed by sodium pentobarbital (150 mg/kg, iv) administration, and the brains were removed quickly after death. One brain was immediately frozen by immersion in isopentane (−45 °C) and then stored at −80 °C until molecular analysis. The other brain was immersion-fixed in 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer for 1 week and cryoprotected in 30% buffered sucrose until it sank. A post-mortem MRI was performed on the brain to confirm the trajectory of the cannulae. The brain was imaged in a Bruker Biospec USR AV III 4.7 T/400 mm scanner with a 600 mT/m field gradient interfaced with ParaVision 5.1 software (Bruker Biospec, Wiessembourg, Germany). Images were acquired in the coronal plane.

Histology. The brain, after MR imaging, was then rinsed in 0.9% NaCl solution and frozen. Horizontal sections (50 μm) were collected from the imprint sites using a cryostat (Leica Microsystems, Nussloch GmbH). Some sections were processed to detect the implantation sites using cresyl violet staining. Antibodies used were raised against GFAP (rabbit polyclonal, diluted 1:1000, Dakocytomation, Glostrup, Denmark) as a marker for astrocytes, and Iba-1 (rabbit polyclonal, diluted 1:1000, Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany) was used as a pan-microglia marker. Incubations for primary antibodies were maintained overnight at 4 °C. After washing, the sections were incubated in Alexa 488 secondary antibodies (diluted 1:1000, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) for 1 h at room temperature. Counterstaining cells for confocal laser scanning microscopy was done with propidium iodide (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). After additional rinsing, the sections were mounted with Fluorsave (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and bound primary antibodies were visualized on a confocal microscope (Olympus, Hamburg, Germany).

Cerebral Imprint Microscopy. Two different chips from putamen were used for microscopy; one for scanning electron microscopy and one for immunofluorescence.

Scanning electron microscopy (SEM) was carried out to observe the distribution of the tissue harvested by the silicon chip. Immunofluorescence was used to confirm the presence of neurons and astrocytes on the chip in contact with putamen tissue.

To fix the tissue, the silicon chip was immersed into 1 mL of 4% PFA in PBS buffer for 30 min.

For SEM, the chip was then dehydrated through an ascending series of ethanol and critical point dried using CO₂. The chip was examined in an FEI Quanta 200 scanning electron microscope (FEI, Eindhoven, The Netherlands).

Immunofluorescence. After three washes in PBS, neurons and astrocytes were stained using NeuN (mouse antibody clone A60, Millipore) and GFAP antibodies (rabbit antibody, ab7260, abcam), respectively, diluted at 1:200 in PBST (PBS buffer and 0.5% Triton-X-100) for 1 h at RT. After three washes in PBST, the silicon chip was incubated with secondary polyclonal antibodies conjugated to Alexa 488 (anti-mouse) and Alexa 568 (anti-rabbit) (1:1000 dilution, Molecular Probes), and Hoechst 33258 at 2 μg/mL in PBST for 30 min at RT. After washes in PBST, the chip was mounted on glass slides and observed with a Zeiss Axiovert 200 M inverted microscope. Images were acquired using CoolSnap HQ (Photometrics) and a plan-apochromat 63× oil objective (Zeiss) with a black and white camera driven by the Metamorph software (Universal Imaging).

Proteomic Analysis. Two different cerebral imprints performed in putamen and two performed in caudate nucleus were used for proteomic analysis. Once the cerebral imprint was performed, the silicon chip was removed from the tool and rinsed 5 min in saline buffer to minimize blood contamination prior to protein extraction in 8 M urea buffer for 30 min under agitation. The total protein amount recovered from the tissue imprint was quantified by Bradford protein

assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). We performed MS profiling using cationic ProteinChip arrays (CM10, Biorad). The ProteinChips were equilibrated for 5 min with 150 μL of binding buffer (100 mM sodium acetate at pH 4). Two micrograms of total proteins was applied to each ProteinChip and incubated for 60 min at room temperature. The arrays were washed three times with the adequate binding buffer then rinsed with deionized water. After air-drying, 0.8 μL of saturated sinapinic acid matrix (50% acetonitrile, 0.5% trifluoroacetic acid) was added twice to each array spot. Profiling was performed on a MALDI mass spectrometer (Autoflex, Bruker) in a linear mode; 5400 laser shots were acquired for each sample with a laser intensity of 55 and a matrix attenuation of 1000 Da. An extensive examination of the protein extract was also performed from one imprint by nano-LC-MS/MS. Fifteen micrograms of proteins was diluted in Laemli buffer and loaded in duplicate on SDS-PAGE gel (BioRad Laboratories) for protein electrophoresis migration. The gel was stained with Coomassie blue and sliced in 12 bands prior to iodoacetamide alkylation and in-gel digestion using trypsin. Peptides were extracted from gel bands and dried in a SpeedVac. Peptides were resuspended in 2% acetonitrile/0.2% formic acid buffer and injected into a nano-liquid chromatography system (Ultimate 3000, Dionex) coupled to an LTQ Orbitrap Velos (Thermo). Peptides were separated using a micro-precolumn cartridge (C18 Pepmap 100, LC Packings) and then separated using a 90 min RP gradient on a C18 column (Gemini C18 3 μm 100A, 75 μm × 150 mm).

Data were processed using Mascot server 2.3.0 (Matrix Science) using following parameters: Enzyme=Trypsin/P with a maximum of two missed cleavages, a mass tolerance of 10 ppm for MS and 1 Da for MS/MS, with a fixed modification of carbamidomethyl (C), and two variable modifications of acetyl (protein N-term) and oxidation (M). Validation and false-positive rate assessment were performed using IRMA and hEIDI softwares. Protein groups identified with a minimum of two different peptides were validated.

Our data set was further submitted to Ingenuity Pathway Analysis software (Ingenuity Systems, Redwood City, CA) to perform the functional characterization of the proteins recovered from the imprint tool. This automatic annotation tool uses a knowledge database and assigns proteins to functional classes or specific canonical pathways (CP) related to various biological processes.¹³

Transcriptomic Analysis. Two different cerebral imprints from the same caudate nucleus were used for transcriptomic comparison. Once the cerebral imprint was performed, the silicon chip was removed and quickly immersed in 500 μL of the lysis buffer from the mirVana isolation kit (Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA). Then, total RNAs were extracted from the cerebral imprint using the mirVana isolation kit, and their concentration was determined with the measure of absorbance at 260 nm. Their quality and RNA integrity were controlled by capillary electrophoresis migration using RNA Nano 6000 kit and the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). For microarray analysis, 200 ng of total RNA were amplified with the GeneChip 3' IVT Express Kit. First, total RNA was reverse-transcribed using primers polydT-T7 promoter sequence; cDNA was double-stranded synthesized and finally amplified with biotinylated dNTP by the T7 RNA polymerase. Microarrays experiments were carried out in accordance with the protocol GeneChip Expression Wash, Stain and Scan from Affymetrix. Briefly, 15 μg of labeled cRNA was hybridized for 16 h at 45 °C on GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix) corresponding to 54675 unique gene probe sets. The arrays were washed and stained with streptavidin-phycoerythrin before scanning. The fluorescence values of each probe set signal, reported in arbitrary units, were processed with MASS statistical algorithm to validate the probe set signal “absent” or “present”, and finally they were normalized between all the arrays using the Robust Multichip Analysis (RMA) algorithm. These algorithms are included in Affymetrix expression console.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

A complete list of all proteins identified. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Mailing address: Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U836, Batiment Edmond J. Safra, Université Joseph Fourier, 38042 Grenoble cedex 9, France. E-mail: zaccaria.affif@gmail.com. Phone number: +33 (0)4 56 52 06 43.

Author Contributions

A.Z. designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the paper. A.B. designed proteomic experiments and wrote the paper. L.S. performed experiments on animals. M.E.A. performed transcriptomic analysis. A.M.H., Y.C., C.B., and J.G. performed proteomic analysis. A.J. performed microscopy and wrote the paper. H.M. performed post-mortem MRI. D.R. performed histology and wrote the paper. A.L.B. contributed to the study design. S.C. performed surgical procedures and supervised *in vivo* experiments. B.P. supervised and performed *in vivo* experiments. F.B. supervised the study and wrote the paper.

Funding

The Region Rhone Alpes and the Foundation InnabioSanté supported this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Vincente Di Calogero and Michallat Sandrine for their assistance with the preoperative and postoperative care of the primates. We thank DRT/DTBS from CEA-LETI Grenoble, particularly Marie-Line Cosnier, for the manufacturing and the chemical functionalization of the silicon chips. We are also grateful to Dr Darlène Lobel for discussion and manuscript revisions.

■ REFERENCES

- (1) Moore, D. J., West, A. B., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2005) Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 57–87.
- (2) Duke, D. C., Moran, L. B., Kalaitzakis, M. E., Deprez, M., Dexter, D. T., Pearce, R. K., and Graeber, M. B. (2006) Transcriptome analysis reveals link between proteasomal and mitochondrial pathways in Parkinson's disease. *Neurogenetics* 7, 139–148.
- (3) Moran, L. B., Duke, D. C., Deprez, M., Dexter, D. T., Pearce, R. K., and Graeber, M. B. (2006) Whole genome expression profiling of the medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurogenetics* 7, 1–11.
- (4) Simunovic, F., Yi, M., Wang, Y., Macey, L., Brown, L. T., Krichevsky, A. M., Andersen, S. L., Stephens, R. M., Benes, F. M., and Sonntag, K. C. (2009) Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: Further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain* 132, 1795–1809.
- (5) Mandel, S., Grunblatt, E., Riederer, P., Amariglio, N., Jacob-Hirsch, J., Rechavi, G., and Youdim, M. B. (2005) Gene expression profiling of sporadic Parkinson's disease substantia nigra pars compacta reveals impairment of ubiquitin-proteasome subunits, SKP1A, aldehyde dehydrogenase, and chaperone HSC-70. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1053, 356–375.
- (6) Basso, M., Giraud, S., Corpillo, D., Bergamasco, B., Lopiano, L., and Fasano, M. (2004) Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics* 4, 3943–3952.
- (7) Kitsou, E., Pan, S., Zhang, J., Shi, M., Zabeti, A., Dickson, D. W., Albin, R., Gearing, M., Kashima, D. T., Wang, Y., Beyer, R. P., Zhou, Y., Pan, C., and Caudle, W. M. (2008) Identification of proteins in human substantia nigra. *Proteomics: Clin. Appl.* 2, 776–782.
- (8) Licker, V., Cote, M., Lobrinus, J. A., Rodrigo, N., Kovari, E., Hochstrasser, D. F., Turck, N., Sanchez, J. C., and Burkhard, P. R. (2012) Proteomic profiling of the substantia nigra demonstrates CNDP2 overexpression in Parkinson's disease. *J. Proteomics* 75, 4656–4667.
- (9) Emborg, M. E. (2007) Nonhuman primate models of Parkinson's disease. *ILAR J.* 48, 339–355.
- (10) Bezdard, E., Imbert, C., Deloire, X., Bioulac, B., and Gross, C. E. (1997) A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the monkey. *Brain Res.* 766, 107–112.
- (11) Bezdard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalou, S., Guilloteau, D., Crossman, A. R., Bioulac, B., Brotchie, J. M., and Gross, C. E. (2001) Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 21, 6853–6861.
- (12) Bernstein, M., and Parent, A. G. (1994) Complications of CT-guided stereotactic biopsy of intra-axial brain lesions. *J. Neurosurg.* 81, 165–168.
- (13) Jimenez-Marin, A., Collado-Romero, M., Ramirez-Boo, M., Arce, C., and Garrido, J. J. (2009) Biological pathway analysis by ArrayUnlock and Ingenuity Pathway Analysis. *BMC Proc.* 3 (Suppl 4), No. S6.
- (14) Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840.
- (15) Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., Dekker, M. C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., van Dongen, J. W., Vanacore, N., van Swieten, J. C., Brice, A., Meco, G., van Duijn, C. M., Oostra, B. A., and Heutink, P. (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299, 256–259.
- (16) Maraganore, D. M., Lesnick, T. G., Elbaz, A., Chartier-Harlin, M. C., Gasser, T., Kruger, R., Hattori, N., Mellick, G. D., Quattrone, A., Satoh, J., Toda, T., Wang, J., Ioannidis, J. P., de Andrade, M., and Rocca, W. A. (2004) UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann. Neurol.* 55, 512–521.
- (17) Kurth, J. H., Kurth, M. C., Poduslo, S. E., and Schwankhaus, J. D. (1993) Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 33, 368–372.
- (18) Marttila, R. J., Lorentz, H., and Rinne, U. K. (1988) Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. Increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basal nucleus. *J. Neurol. Sci.* 86, 321–331.
- (19) Saggau, H., Cooksey, J., Dexter, D., Wells, F. R., Lees, A., Jenner, P., and Marsden, C. D. (1989) A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J. Neurochem.* 53, 692–697.
- (20) Javoy-Agid, F., Hirsch, E. C., Dumas, S., Duyckaerts, C., Mallet, J., and Agid, Y. (1990) Decreased tyrosine hydroxylase messenger RNA in the surviving dopamine neurons of the substantia nigra in Parkinson's disease: An *in situ* hybridization study. *Neuroscience* 38, 245–253.
- (21) Graybiel, A. M. (1995) The basal ganglia. *Trends Neurosci.* 18, 60–62.
- (22) Fienberg, A. A., Hiroi, N., Mermelstein, P. G., Song, W., Snyder, G. L., Nishi, A., Cheramy, A., O'Callaghan, J. P., Miller, D. B., Cole, D. G., Corbett, R., Haile, C. N., Cooper, D. C., Onn, S. P., Grace, A. A., Ouimet, C. C., White, F. J., Hyman, S. E., Surmeier, D. J., Girault, J., Nestler, E. J., and Greengard, P. (1998) DARPP-32: Regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 281, 838–842.
- (23) Greengard, P., Allen, P. B., and Nairn, A. C. (1999) Beyond the dopamine receptor: The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23, 435–447.

(24) Hemmings, H. C., Jr., Nairn, A. C., Aswad, D. W., and Greengard, P. (1984) DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. II. Purification and characterization of the phosphoprotein from bovine caudate nucleus. *J. Neurosci.* *4*, 99–110.

(25) Hodges, A., Strand, A. D., Aragaki, A. K., Kuhn, A., Sengstag, T., Hughes, G., Elliston, L. A., Hartog, C., Goldstein, D. R., Thu, D., Hollingsworth, Z. R., Collin, F., Synek, B., Holmans, P. A., Young, A. B., Wexler, N. S., Delorenzi, M., Kooperberg, C., Augood, S. J., Faull, R. L., Olson, J. M., Jones, L., and Luthi-Carter, R. (2006) Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 965–977.

(26) Caudle, W. M., Bammler, T. K., Lin, Y., Pan, S., and Zhang, J. (2010) Using 'omics' to define pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease. *Expert Rev. Neurother.* *10*, 925–942.

(27) Sutherland, G. T., Matigian, N. A., Chalk, A. M., Anderson, M. J., Silburn, P. A., Mackay-Sim, A., Wells, C. A., and Mellick, G. D. (2009) A cross-study transcriptional analysis of Parkinson's disease. *PLoS One* *4*, No. e4955.

(28) Bossers, K., Meerhoff, G., Balesar, R., van Dongen, J. W., Kruse, C. G., Swaab, D. F., and Verhaagen, J. (2009) Analysis of gene expression in Parkinson's disease: Possible involvement of neurotrophic support and axon guidance in dopaminergic cell death. *Brain Pathol.* *19*, 91–107.

(29) Miller, R. M., Kiser, G. L., Kaysser-Kranich, T. M., Lockner, R. J., Palaniappan, C., and Federoff, H. J. (2006) Robust dysregulation of gene expression in substantia nigra and striatum in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* *21*, 305–313.

(30) Geschwind, D. H. (2003) DNA microarrays: Translation of the genome from laboratory to clinic. *Lancet Neurol.* *2*, 275–282.

(31) Imbeaud, S., Graudens, E., Boulanger, V., Barlet, X., Zaborski, P., Eveno, E., Mueller, O., Schroeder, A., and Auffray, C. (2005) Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.* *33*, No. e56.

(32) Benabid, A. L. (2003) Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13*, 696–706.

(33) Kordower, J. H., Emborg, M. E., Bloch, J., Ma, S. Y., Chu, Y., Leventhal, L., McBride, J., Chen, E. Y., Palfi, S., Roitberg, B. Z., Brown, W. D., Holden, J. E., Pyzalski, R., Taylor, M. D., Carvey, P., Ling, Z., Trono, D., Hantraye, P., Deglon, N., and Aebischer, P. (2000) Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* *290*, 767–773.

(34) Noldus, L. P., Spink, A. J., and Tegelenbosch, R. A. (2001) EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behav. Res. Methods, Instrum., Comput.* *33*, 398–414.

3. Conclusions et Perspectives.

Grâce au développement de ce nouvel outil chirurgical, nous avons pu réaliser plusieurs empreintes tissulaires dans le noyau caudé et le putamen, à différents temps chez le primate sain, sans engendrer de lésions fonctionnelles. Les analyses protéomiques et transcriptomiques du tissu récupéré sur le silicium ont clairement montré la possibilité d'obtenir des informations moléculaires représentatives des noyaux ciblés. En effet, la possibilité d'exposer et de masquer le silicium permet une capture spécifique de nos cibles, éliminant ainsi les risques de contamination par les différents noyaux traversés au cours de la trajectoire. Cette validation d'efficacité de capture *in vivo* chez le primate était indispensable avant d'envisager l'utilisation de notre outil en clinique en lieu et place du stylet chirurgical utilisé au cours de l'implantation d'électrodes de stimulation. En parallèle, différents tests, de toxicité, de sensibilisation et d'irritation ont été réalisés par un laboratoire extérieur afin d'évaluer les risques d'un contact aigu ou chronique du cerveau avec le silicium modifié ; les résultats de ces tests sont fournis en annexe et confirment la non toxicité de notre outil. L'utilisation de notre outil en clinique ouvrirait la porte à d'autres pathologies cérébrales qui requièrent une intervention neurochirurgicale. En plus de l'intérêt certain de disposer de matériel biologique analysable provenant de tissus cérébraux impliqués dans les pathologies neurodégénératives, l'outil d'empreinte tissulaire peut avoir des applications potentielles majeures dans l'étude des pathologies cancéreuses. La biologie moléculaire des tumeurs se fait actuellement sur des tissus obtenus lors d'exérèses ou de biopsies. Cependant, dans la majorité des cas, la récurrence tumorale survient dans les zones péri-tumorales, où les cellules tumorales envahissent le tissu sain. Notre outil permettrait de réaliser des empreintes au niveau des différentes structures abordées au cours de l'intervention chirurgicale permettant ainsi d'effectuer un prélèvement moléculaire non destructif dans l'environnement sain et péri-tumoral infiltré, et fournissant un complément à l'analyse anatomopathologique. Avec la conservation de la spatialité tissulaire sur le silicium, nous pourrions distinguer histologiquement mais aussi moléculairement la tumeur, la zone péri-tumorale et le tissu sain. Ces données viendraient compléter les informations fournies par l'IRM afin de délimiter les berges tumorales. De plus avec l'émergence de l'IRM per-opératoire et des systèmes de neuro-navigation, l'utilisation de notre outil dans ce nouvel environnement chirurgical serait la condition idéale pour l'obtention d'une information

moléculaire spécifique d'une région cérébrale particulière. Nous avons donc élaboré un prototype de notre outil d'empreinte à partir d'un matériau « IRM compatible » : le polyétheréthercétone (PEEK). Des premiers tests réalisés en IRM sur un kiwi (Figure 23) ne montrent pas de distorsions du signal et permettent de distinguer clairement les différents constituants du fruit (cœur, grain et chair). D'autres tests n'ont révélé aucun échauffement du matériau ni de micro-mouvements durant les acquisitions de séquences.



Figure 23: IRM d'un outil d'empreinte en PEEK dans un kiwi

Afin de conserver la spatialité de l'information moléculaire présente sur les empreintes, nous développons actuellement une approche d'imagerie protéique directement sur les puces en silicium. La superposition des profils protéiques obtenus, avec l'imagerie anatomique du site d'empreinte permettrait une cartographie protéique *in vivo*, unique à ce jour, de la structure ciblée. En parallèle, nous travaillons aussi au développement de surfaces en silicium nano-poreux qui permettrait l'étude du peptidome et du métabolome cérébral.

Enfin, bien que notre étude chez le primate eût pour objectif de valider *in vivo* l'efficacité de la capture tissulaire et le caractère peu lésionnel de notre outil, la réalisation d'empreinte tissulaire aurait un intérêt dans les modèles animaux exposés au MPTP ou aux pesticides et reproduisant la dégénérescence dopaminergique de la SNc observée dans la MP (Emborg 2007). En effet, l'analyse protéomique de la SNc et d'autres noyaux cérébraux, via des empreintes réalisées à différents temps de la neurodégénérescence permettrait de décrypter les modifications moléculaires induites par une exposition au MPTP ou aux pesticides. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la stimulation cérébrale profonde, on peut aussi utiliser notre outil pour comparer le contenu protéique d'un STN stimulé et d'un STN contrôle. Ces différentes études seront certainement initiées à Clinatéc durant l'année 2013.

RESULTATS

Partie II

**Développement d'une stratégie pour l'analyse
protéomique des fluides biologiques en clinique.**

I. L'utilisation de nanoparticules pour l'analyse protéomique du LCR.

1. Introduction

1) Du tissu pathologique aux fluides biologiques

Bien que le tissu pathologique soit la meilleure source d'échantillon pour le diagnostic et la compréhension des mécanismes moléculaires associés à la MP, la difficulté d'accès au cerveau, couplée à l'invasivité lésionnelle des biopsies a naturellement ouvert la voie à l'analyse protéomique des fluides biologiques (Eller and Williams 2009) dans le but d'établir des marqueurs moléculaires plus accessibles, moins coûteux et moins invasifs pour une utilisation en routine clinique. De plus avec l'arrivée du SELDI-TOF-MS et du profilage haut débit, l'espoir de mettre en évidence des profils protéiques spécifiques d'une pathologie a encouragé l'analyse de ces fluides (Constantinescu, Andreasson et al. 2010). Cette quête de marqueurs moléculaires circulants émane du paradigme que chaque tissu informe de son état physiopathologique au travers des protéines que ce tissu libère dans les fluides biologiques les plus proches (Ahn and Simpson 2007). Ainsi, ce qui pouvait être considéré comme de simples déchets moléculaires, constituerait en réalité une véritable mine d'or diagnostique. Dans la première phase de découverte d'un marqueur protéique circulant, la sélection du fluide biologique le plus approprié, où ces protéines tissulaires seraient suffisamment concentrées, est une étape cruciale.

2) Le liquide céphalo-rachidien.

Dans le contexte des maladies neurodégénératives, le liquide céphalo-rachidien (LCR) qui baigne le cerveau et la moelle épinière pourrait ainsi refléter l'état physiopathologique du tissu cérébral et représenterait donc un réservoir potentiel de marqueurs protéiques pertinents (Huhmer, Biringier et al. 2006). Le LCR (Johanson, Duncan et al. 2008) est un liquide biologique transparent. Sa concentration en protéines est de l'ordre de 0,2 à 0,5 mg/ml. 80 % de cette concentration est représentée par des protéines en provenance du sang, et seulement 20 % par des protéines en provenance du tissu cérébral (Reiber 2001). Il est produit essentiellement par les plexus choroïdes et circule dans les ventricules cérébraux

et l'espace sous arachnoïdien. Son volume chez l'adulte est d'environ 150 ml et sa production de l'ordre de 500 à 750 ml par jour, soit un renouvellement toutes les 6 à 8 heures. Le LCR assure plusieurs fonctions dont la protection mécanique et immunologique du cerveau, la régulation de la pression intracrânienne, le transport des nutriments et l'excrétion des substances toxiques (Zhang 2007). Il est accessible via la ponction lombaire qui est un geste chirurgical relativement sûr et peu invasif, et qui consiste à introduire une aiguille dans l'espace sous arachnoïdien entre les vertèbres L4 et L5 et à recueillir le liquide qui goutte à la sortie de l'aiguille.

3) L'analyse protéomique du LCR

Depuis plusieurs années, de nombreux essais cliniques ont ciblé l'expression de protéines candidates dans le LCR pour le diagnostic de certaines maladies neurodégénératives (Sunderland, Linker et al. 2003), (Shi, Bradner et al. 2011), (Zerr, Bodemer et al. 1998). Ces études principalement basées sur des approches « protéine-anticorps » ont révélé des marqueurs diagnostics potentiels qu'il faudrait confirmer à plus grande échelle et dans différents centres. A travers la quantification de ces protéines cibles, ces études ont aussi soulevé le problème de la gamme de concentration des protéines du LCR. En effet, à l'instar du plasma sanguin, la gamme de concentration des protéines dans le LCR est très importante : l'albumine majoritaire dans ce fluide est présente à hauteur de 0,1 à 0,3 mg/ml alors que les protéines minoritaires comme la protéine tau à hauteur du pg/ml (Shi, Bradner et al. 2011). Cet écart de concentration de 8 à 9 ordres de grandeur est l'obstacle majeur à l'identification et à la quantification des protéines les moins concentrées par les approches nano-LC-MS/MS ou 2DE-MS/MS, dont la gamme de détection est seulement de 4-5 ordres de grandeur.

Bien que de nombreuses études aient contribué individuellement à l'identification de plusieurs centaines de protéines dans le LCR par nano-LC-MS/MS (Mouton-Barbosa, Roux-Dalvai et al. 2010), (Pan, Zhu et al. 2007), et révélé, par des approches de protéomique quantitative, des différences d'expression protéique dans les maladies neurodégénératives (Abdi, Quinn et al. 2006), elles ont nécessité de larges volumes d'échantillons et/ ou de longues étapes de fractionnement et de séparation, à la fois sur gel SDS-PAGE au niveau protéique, mais aussi sur colonne chromatographique au niveau peptidique. D'un point de vue qualitatif, ces études sont indispensables à l'identification du protéome minoritaire du

LCR. Mais elles sont clairement incompatibles avec des études quantitatives, sur un grand nombre d'échantillons individuels, en vue d'identifier et valider des marqueurs moléculaires en protéomique clinique. Avec le développement des approches de quantification sans marquage (ou « label free »), basées sur la comparaison directe des signaux MS des peptides élués des colonnes de nano-LC, il est possible d'envisager des études de profilage quantitatif sur un grand nombre de patients. Cependant, il demeure indispensable de réduire la gamme de concentration dans l'échantillon en amont, avant l'analyse par spectrométrie de masse. Cette étape doit être reproductible, rapide et automatisée afin de permettre le pré-traitement de centaines d'échantillons simultanément. Elle doit aussi être efficace sur de faibles volumes d'échantillons (inférieur à 1 ml) afin de traiter le LCR de chaque patient individuellement en triplicats, et de confirmer les résultats par d'autres approches.

4) L'utilisation de micro/nanoparticules pour l'analyse protéomique haut débit du LCR.

a. Le Proteominer®.

En 2008, une nouvelle technologie développée par Biorad a introduit le concept d'égalisation des concentrations protéiques d'un échantillon. Cette technologie nommée Proteominer® est basée sur l'utilisation de microbilles, chacune porteuse d'un hexapeptide différent obtenu par combinaison aléatoire (Guerrier, Righetti et al. 2008; Righetti and Boschetti 2008). Incubées avec ces microbilles, les protéines de l'échantillon se retrouvent en contact avec des millions d'hexapeptides différents permettant théoriquement à chaque protéine de trouver un site de fixation. Une fois leurs sites saturés, les protéines en excès sont éliminées avec le surnageant, permettant ainsi de réduire les différences de concentration dans l'échantillon (Figure 24).

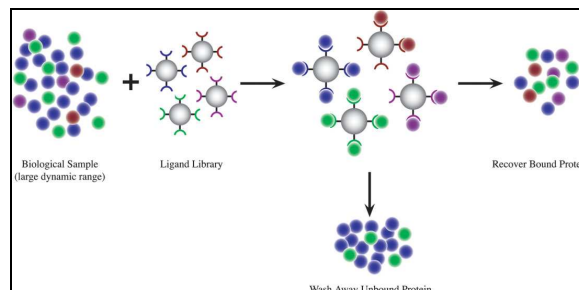


Figure 24: Principe de l'égalisation des concentrations protéiques par le Proteominer®

L'utilisation de Proteominer® a révélé son efficacité dans de nombreux types d'échantillons (Castagna, Cecconi et al. 2005), (Sennels, Salek et al. 2007), (Roux-Dalvai, Gonzalez de Peredo et al. 2008) dont le LCR (Mouton-Barbosa, Roux-Dalvai et al. 2010). En 2010, Mouton-Barbosa et al. ont identifié plus de 1200 protéines différentes par analyse nano-LC-MS/MS à partir d'un pool d'un litre d'échantillon et au prix d'un fractionnement extensif. L'utilisation du Proteominer® dans des conditions plus compatibles avec les conditions cliniques a permis d'identifier par nano-LC-MS/MS, et de quantifier par une approche « label free », environ 250 protéines à partir de 2 ml de LCR. Ces premiers résultats laissent envisager l'utilisation de cette stratégie dans des études cliniques d'autant plus que la préparation des échantillons est automatisable sur plaque 96 puits. Il faudrait néanmoins confirmer l'efficacité du Proteominer® sur des volumes plus faibles étant donné les difficultés à disposer de 2 ml de LCR pour chaque patient dans un contexte de maladies neurodégénératives.

b. Les nanoparticules magnétiques fonctionnalisées.

Avec l'association des nanotechnologies à la protéomique (Johnson, Zhukovsky et al. 2008), (Ray, Reddy et al. 2011), l'utilisation en spectrométrie de masse de nanoparticules (NPs) magnétiques et fonctionnalisées chimiquement s'est rapidement révélée intéressante. Leur incubation avec des fluides biologiques a permis un enrichissement considérable des profils protéiques en MS (Fiedler, Baumann et al. 2007), (Baumann, Ceglarek et al. 2005), (Villanueva, Philip et al. 2004). Inspirées des surfaces SELDI, les différentes chimies greffées sur les NPs vont permettre la capture d'un sous protéome particulier. La forme sphérique et la taille nanométrique des particules leur confèrent un rapport « surface de contact-volume occupé » très important permettant une concentration des protéines à leur surface. Leur propriété magnétique facilite leur manipulation pour les différentes étapes de lavage et d'élution, permettant d'éliminer les sels et d'éluer les protéines dans des tampons compatibles avec la spectrométrie de masse. Cette propriété a aussi permis de développer une plate forme comme celle décrite par Villanueva et al (Villanueva, Lawlor et al. 2006) qui permet d'automatiser intégralement les expériences.

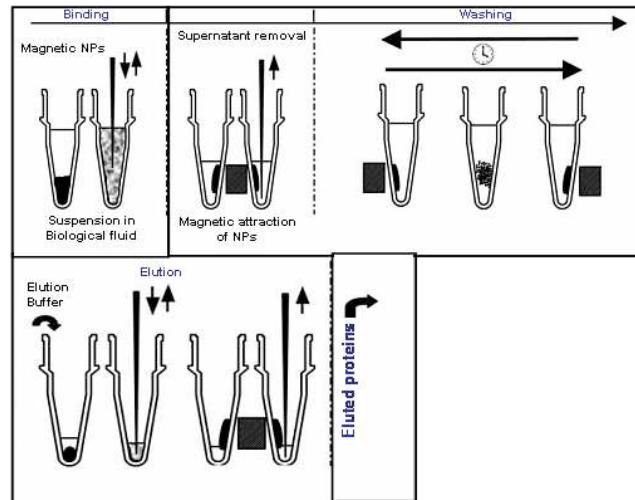


Figure 25: Principales étapes de l'utilisation de NPs magnétiques pour la capture protéique dans les fluides biologiques d'après Villanueva et al.

Jusqu'à présent, la plupart des études utilisant des NPs se sont limitées au profilage protéique du fluide étudié sans réellement caractériser l'identité des protéines, ni même valider la reproductibilité de capture des NPs. Concernant le LCR, l'unique référence traite de l'utilisation de NPs fonctionnalisées avec un anticorps dirigé contre les ligands diffusibles dérivés de l'amyloïde beta (Georganopoulou, Chang et al. 2005).

En collaboration avec le laboratoire du Dr Bernard Monsarrat à Toulouse, qui a publié l'étude du LCR avec Proteominer® (Mouton-Barbosa, Roux-Dalvai et al. 2010) et qui fut très intéressé par nos premiers résultats, nous avons décidé de caractériser en détail les capacités de ces NPs, à travers l'identification par nano-LC-MS/MS des protéines captées, et l'évaluation de leur reproductibilité de capture par une quantification sans marquage des protéines identifiées. Nous avons choisi empiriquement les 2 types de NPs les plus complémentaires d'après les profils MS obtenus par MALDI-TOF afin d'extraire le maximum d'information du protéome du LCR.

2. Article 3

A nanoparticle-assisted strategy for CSF biomarker research in clinical proteomics.

Affif Zaccaria, Florence Roux-Dalvai, Ali Bouamrani, Bernard Monsarrat, François Berger.
Journal of Proteome Research.

Suppl data : <https://docs.google.com/folder/d/0B1GhVE-38pVBVXVJVER2MGlxYUk/edit>

A nanoparticle-assisted strategy for CSF biomarker research in clinical proteomics.

Affif Zaccaria¹, Florence Roux-Dalvai², Ali Bouamrani³, Bernard Monsarrat², François Berger^{1,3}

¹*Institut des Neurosciences Team 7 Brain Nanomedicine, INSERM U836, UJF, CHU, Grenoble, France.*

²*Institute of Pharmacology and Structural Biology, CNRS, University of Toulouse, 31077 Toulouse, France.*

³*Clinatec CEA-LETI, Grenoble, France.*

Abstract

Ahead of the relative inaccessibility of brain tissue, identification of molecular markers in cerebrospinal fluid is a priority in clinical neuroproteomics. However, the large concentration range of proteins and the low volume of cerebrospinal fluid (CSF) generally available for proteomics studies are the main barriers for a larger access to the CSF proteome in clinical studies. Our aim was to demonstrate the interest of chemically modified magnetic nanoparticles (NPs) as a harvesting surface to reduce the range of protein concentrations and to allow a wider exploration of the proteome in low volume of human CSF.

In this study, 2 different types of chemically modified magnetic NPs were respectively incubated with 200 μ l of CSF; the proteins harvested were identified by nano-LC-MS/MS and quantified by label free approach.

NP treatment greatly decreased the proportion of albumin, the most abundant protein in CSF, allowing the detection of more m/z peaks on MS-profiles. Nano-LC-MS/MS identification of NP-treated CSF confirmed this observation and revealed 409 different proteins, versus 156 for untreated CSF. Both qualitative and quantitative reproducibility of NP-harvesting were demonstrated using a dedicated bioinformatics analytical workflow.

The high throughput potentiality, the reproducibility and the minimal amount of sample required make our strategy perfectly compatible with CSF biomarker research in clinical context.

Introduction

Identification of new molecular markers is a priority in clinical proteomics and a key issue for nanomedicine and personalized disease monitoring. Ahead of the relative

inaccessibility of pathological tissue and invasive biopsies in neurological disorders, many research groups focus on proteomic analysis of biological fluids for establishment of peripheral biomarkers^{1,2,3}. Due to its proximity to the brain tissue, the cerebrospinal fluid (CSF), clinically accessible through standard, relatively safe and uncomplicated lumbar puncture could reflect the metabolite state of the central nervous system under physiological and pathological states⁴, and represents an ideal source of potential clinically relevant biomarkers for neurological diseases^{5,6,7,8,9}. Nevertheless, the high dynamic range of protein concentration is the major barrier to a global view of CSF proteome. In fact, albumin the most abundant protein in CSF is concentrated at 130-350 mg/ liter and represents 45 % of total protein quantity while cytokines are concentrated around ng/ liter. Moreover, disposing of more than 1 ml of CSF for each patient in proteomic studies is difficult. In that context, identification of low abundant proteins for research of neurological-disease biomarkers is a major challenge. Studies based on two-dimensional gel were the first to provide CSF maps but the low dynamic range of the technique limited the number of proteins identified to the 50 more abundant species^{10,11,12}. More recently, development of nano-LC-MS/MS technology increased to several hundreds the number of proteins identified in CSF^{13,14,15} but required high volume samples and extensive fractionations, incompatible with high throughput clinical studies. With the emergence of nanotechnologies, magnetic nanoparticles (NPs) could provide adequate solution for sample fractionation prior to identification by nano-LC-MS/MS. In fact, the combination of different chemical functions with a high surface to volume ratio would give access to various and more concentrated sub-proteomes. Moreover the comparable size to biomolecules endows NPs with unique physicochemical properties that are not observed in their bulk forms; making them very attractive for low abundant biomarker harvesting. With the development of MS-associated label-free approaches¹⁶, proteins harvested by NPs and identified by nano-LC-MS/MS could accurately be quantified by the direct comparison of their MS peptide signals.

In this study, we assessed the capacity and the reproducibility of NPs for protein harvesting in low volume of CSF. SDS-PAGE and MS approaches revealed enriched protein profiles and a clear diminution of albumin proportion in NP-treated CSF. The exhaustive identification by nano-LC-MS/MS revealed 409 different proteins, and label-free quantification of replicates

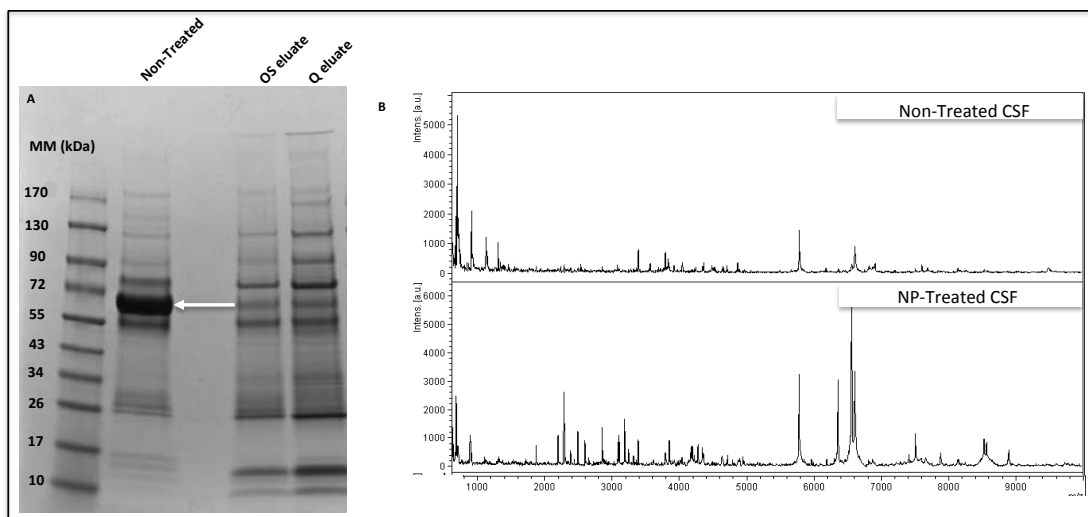


Figure 1: Protein profiles of non-treated and NP-treated CSF. A) 1D SDS-PAGE - the white arrow shows the position of the albumin protein and (B) MALDI-TOF-MS showing efficiency of the NP-treatment for enriched protein detection compared to non-treated CSF extract. The same quantity of proteins was loaded on gel and on chip for the different samples.

confirmed the reproducibility of NPs. Such strategy only required 400 μ l of CSF and could be applied to clinical studies for the rapid and in-depth profiling of large series of samples, which is mandatory for CSF biomarker discovery in neurological diseases.

Materials and Methods

Materials

Magnetic nanoparticles of 100 nm in aqueous suspension were obtained from Chemicell GmbH (Berlin, Germany). Their magnetite core gives them a superparamagnetic behavior, and they are grafted with different matrices and functional groups. They have a multi-domain core allowing a fast and easy magnetic isolation by an external magnet (MagnetopURE, Chemicell GmbH, Berlin, Germany).

Two different kinds of nanoparticles were used in our study, fluidMAG-OS and fluidMAG-Q. Detailed features are available on <http://www.chemicell.com/>.

Sequencing grade trypsin was from Promega (Madison, WI). Acetonitrile and trifluoroacetic acid were from Sigma-Aldrich. Equipment and reagents for 1D-SDS PAGE were from Bio-Rad.

CSF collection and treatment of CSF with NP strategy

Human CSF used in this study was obtained from various pooled samples collected in University Hospital of Grenoble following lumbar puncture of patients with headache and/ or suspicion of neurological disease. This collection followed the French regulation and was approved at the national level.

200 μ l of CSF was added to 500 μ g of Q or OS-NPs in triplicate conditions and slightly agitated for 45 min at room temperature. NPs were attracted to one side of the sample tube by an external magnet and CSF was removed. NPs were washed 3 times in PBS and the proteins captured by NPs were eluted with acetonitrile / TFA 1% (50 % / 20 %) in distilled water. The protein concentration of each eluted solution and crude CSF was determined by a Bradford protein assay from Bio-Rad.

Analysis of CSF by 1D SDS-PAGE

10 μ g of proteins from NP-treated CSF, and crude CSF were mixed with Laemli buffer (4 % SDS, 20 % glycerol, 10 % 2-mercaptoethanol, 0.004 % bromophenol blue, 0.125 M Tris HCl). The mixture was heated and loaded on a precast 4 % to 15 % polyacrylamide gel for 1D-migration. Staining and destaining were performed with Coomassie blue and 30 % ethanol/ 7 % acetic acid in water respectively.

Analysis of CSF by MALDI-TOF-MS

Peptide and protein profiles were analyzed with a Microflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). 2 μ l of crude CSF or NP-eluate (i.e 0.5 μ g/ μ l) were mixed with 2 μ l of premade α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA) or sinapinic acid (SPA), and 1 μ l was deposited for MALDI-TOF-MS. Separate spectra were obtained for two different mass-to-charge (m/z) ranges corresponding to proteins with molecular mass of 0.8-15 kDa and 15-100 kDa (assuming $z=1$). Spectra were recorded in the positive linear mode (laser frequency 200 Hz; ion source voltage, 20 kV). For

each spectrum, 200 shots in 50-shot steps from different positions on the target spot (automatic mode) were collected using FlexControl software (version 3.0, Bruker Daltonik).

Nano-LC-MS/MS analysis of CSF proteins harvested by NP-strategy

10 µg of each eluate and crude CSF were diluted in Laemli buffer and stacked in one band after a short and low voltage electrophoretic migration on SDS PAGE gel. After trypsin digestion, the resulting peptides were extracted from the gel and analyzed by nano-LC-MS/MS using an ultimate3000 system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany). The LTQ-Orbitrap was operated in data-dependent acquisition mode with the Xcalibur software. Survey scan MS spectra were acquired in the Orbitrap on the 300-2000 m/z range with the resolution set to a value of 60,000. The five most intense ions per survey were selected for CID fragmentation, and the resulting fragments were analyzed in the linear trap (LTQ).

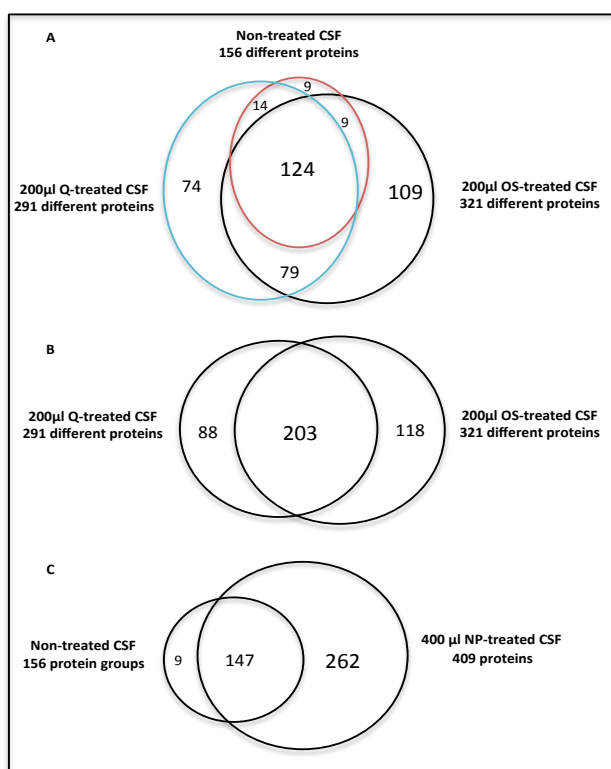


Figure 2: Venn diagrams representing the extent of overlap of proteins identified by LC-MS/MS analysis. A, comparison made between the crude CSF (156 proteins) OS-NPs treated CSF (321 proteins) and Q-NPS treated CSF (291 proteins). B, comparison among the two NP-treated samples (Q-NP, 291 proteins; OS-NP, 321 proteins). C, comparison between crude CSF (156 proteins) and all NP-treated samples (409 proteins).

Database Search and Data Analysis

The Mascot Daemon software (version 2.3.0, Matrix Science, London, UK) was used to perform database searches against homo sapiens entries in Uniprot protein database (release 2010_09 – Sep 21, 2010; 1215533 sequences). Mascot results were parsed with the in-house developed software Mascot File parsing and Quantification (MFPaQ) version 4.0.0 (<http://mfpaq.sourceforge.net/>), and protein hits were automatically validated.

Label-free Quantification

Quantification of proteins was performed using the label-free module implemented in the MFPaQ v4.0.0 software (<http://mfpaq.sourceforge.net/>). For each sample, the software uses the validated identification results and extracted ion chromatogram (XIC) of the identified peptides in the corresponding raw nano-LC-MS files based on their experimentally measured retention time (RT) and monoisotopic m/z values. Quantification of peptide ions was performed based on calculated XIC areas values. To compare abundance of different proteins or to represent the abundance profile of one protein in different samples, a protein abundance index (PAI) was calculated defined as the average of XIC area values for three intense reference tryptic peptides identified for this protein.

Results and Discussion

In this study, 200 µl of CSF containing around 130 µg of proteins were separately incubated with 2 different types of chemically modified magnetic NPs, and NPs were eluted with acetonitrile/TFA solution to collect the harvested proteins. Each NP-eluted solution contained around 20 µg of proteins, representing 15 % of the initial protein input.

Protein profiles of NP-treated CSF

10 µg of NP-treated samples were loaded in the same way that 10 µg of crude CSF on 1D SDS-PAGE gel. NP-treated CSF revealed different protein patterns than crude CSF. As shown in Fig 1 A, a very intense band of albumin is observed in crude CSF lane. It was considerably diminished in the two treated samples allowing distinction of many new protein bands on a mass interval from 10 to 200 kDa. MALDI-TOF-MS analysis confirmed these observations. Protein profile of NP-treated sample showed the presence of a large number of m/z peaks that were absent from the profile of crude CSF (Fig 1 B). This enrichment impacts more on small masses between 2 to 10 kDa with appearance of

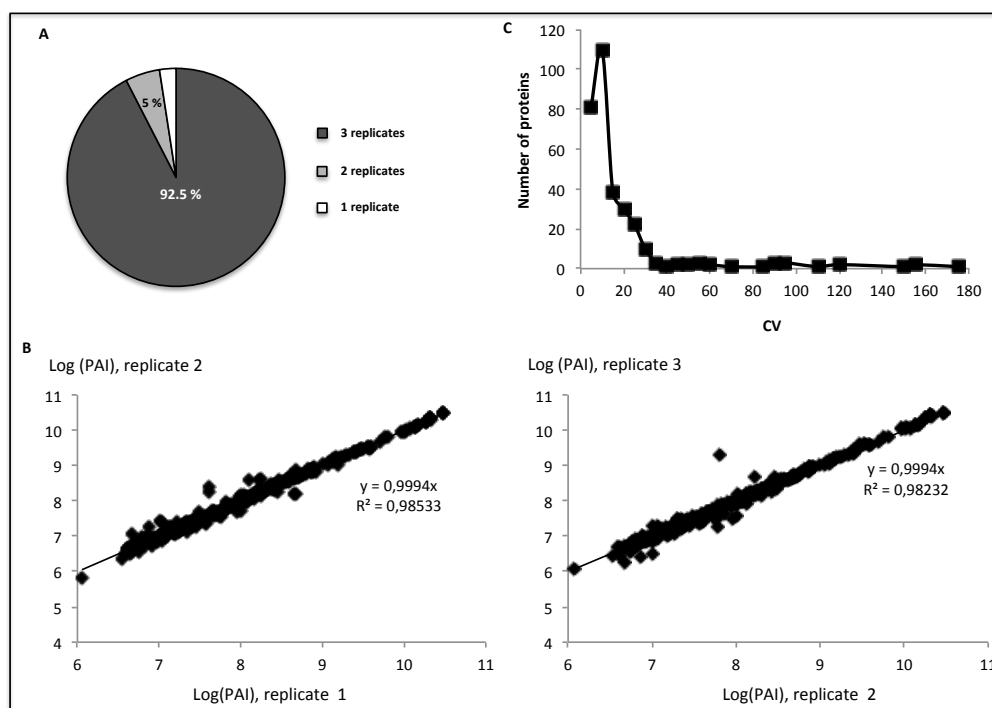


Figure 3: Qualitative and quantitative reproducibility in protein harvesting by NPs. A, Pie chart representing the proportion of proteins identified in 3 (dark grey), 2 (light grey) or 1 (white) replicates from OS-NPs. Label-free quantification of CSF proteins harvested by NPs using MFPaQ. Reproducibility and accuracy of peptide quantification over triplicate LC-MS/MS analyses of NP treated CSF. B, correlation of log (PAI) values in pairwise LC-MS run comparisons for NPs. C, distribution of quantified proteins from NPs according to their coefficient of variation (CV) for the three replicate measurements.

new m/z peaks and increased intensity detection for peaks present in both conditions. Similarly to SDS-PAGE gel, albumin m/z peak intensity at 66 kDa was considerably decreased on spectrum of NP-treated CSF, confirming the reduction of albumin concentration in NP-eluted solution (data not shown).

Protein Identification by Nano-LC-MS/MS

To assess the enrichment of protein harvesting by NP strategy, a deeper characterization of the CSF proteome was performed by one nano-LC-MS/MS run after concentration of proteins into a unique gel band on SDS-PAGE gel. Each sample was analyzed separately to maximize the number of proteins identified and to estimate the complementary feature of each kind of NPs in protein capture. To validate that NP-treatment of CSF increased the number of identified proteins, analysis of untreated CSF was also performed.

The analysis of untreated CSF only revealed 156 different proteins. On the other hand, the identification of proteins harvested, from 200 μ l of CSF, by Q and OS NPs respectively revealed 291 and 321 different species (Figure 2A). Together, these 2 types of NPs revealed 409 different identified proteins from a total volume of 400 μ l of CSF; only 50 % i.e. 203 proteins were identified in both samples whereas 118 and 88 were selectively

identified on OS and Q sample respectively (figure 2B). Among these 409 proteins, 147 of the 156 proteins identified in crude CSF were present (figure 2C). These results demonstrated the efficiency of NPs to concentrate enough a large number of different proteins on its surface, thus allowing their identification by nano-LC-MS/MS. They also revealed the selective capture of proteins according to the chemical groups grafted on NP-surfaces.

To validate the qualitative reproducibility of each type of NPs in protein harvesting, we controlled the presence of the MS signals of each protein in all triplicates. For each type of NPs, the MS signal of each protein was present in around 90 % of cases in all triplicates (Figure 3A and suppl data).

Protein quantification by label free approach

To evaluate the quantitative reproducibility of NP treatment, we used the MFPaQ software, which was designed to parse and validate protein identifications from Mascot result files and quantify the identified proteins. The quantification module of MFPaQ version 4.0 was upgraded so that it could handle label-free quantification as described by Mouton Barbosa *et al*¹⁵. Although not all of these proteins were identified by MS/MS in every run, MS signal could be extracted for all

of them in the triplicates for both conditions. As shown in Fig. 3B, the PAI profiles for all the proteins quantified from NP-treated CSF were constant over the three replicates with a mean log (PAI) ratio close to the expected value of 1 between replicate. Moreover, the median of the coefficient of variation for all peptide intensity values over three replicates was around 8 %, showing a good reproducibility of the NP treatment (Figure 3C). These data confirm NPs' qualitative and quantitative reproducibility in protein harvesting and indicate that several hundred of proteins can be accurately quantified by using our strategy.

Functional analysis of identified proteins by Ingenuity Pathway

To determine the functional role of proteins identified in CSF by NPs, we submitted our complete list to Ingenuity Pathway Analysis software¹⁷. The significance of the association between identified proteins and their functional role was given by a Fischer's exact test that calculate a p-value determining the probability that the association between the protein list and the functional role is explained by chance alone. Submission of untreated and treated CSF protein lists to functional analysis highlighted 3 similar top functions (Figure 4A). Nevertheless, each one was more significantly represented in NP-treated samples, according to the p-values and to the number of proteins in our samples related to these functions. In fact, untreated CSF list identified 68, 79 and 71 different proteins respectively related to inflammatory response, cancer and neurological diseases. For the 3 same functions, treated CSF list assigned respectively 134, 179 and 131 different proteins. Focusing on neurological diseases, NP-treatment enabled to identify at least 50 % more proteins associated to Alzheimer's disease, Huntington's disease, dementia and movement disorders than untreated sample (Figure 4B).

These results confirm the great potential of chemically modified NPs to provide a wider access to the CSF proteome, thus opening the way to the research of relevant molecular markers in neurological diseases. In fact, NP treatment permits the detection of proteins previously described as implicated in neurological disorders and crucial signalling pathways that could not be detected in non-treated CSF. For example, Neuropilin-1 and -2, which play a role in cell migration and axonal guidance^{18,19}, S100 protein and neuron-specific enolase increased in CSF after traumatic brain damage^{20,21,22}, Pentraxin-1 a secreted protein involved in synaptic

activity and synapse remodelling^{23,24} and neuroserpins described in Alzheimer's disease and Lewy body dementia²⁵ were identified from CSF only after NP treatment. Detection of these proteins may be of particular interest when studying brain pathologies.

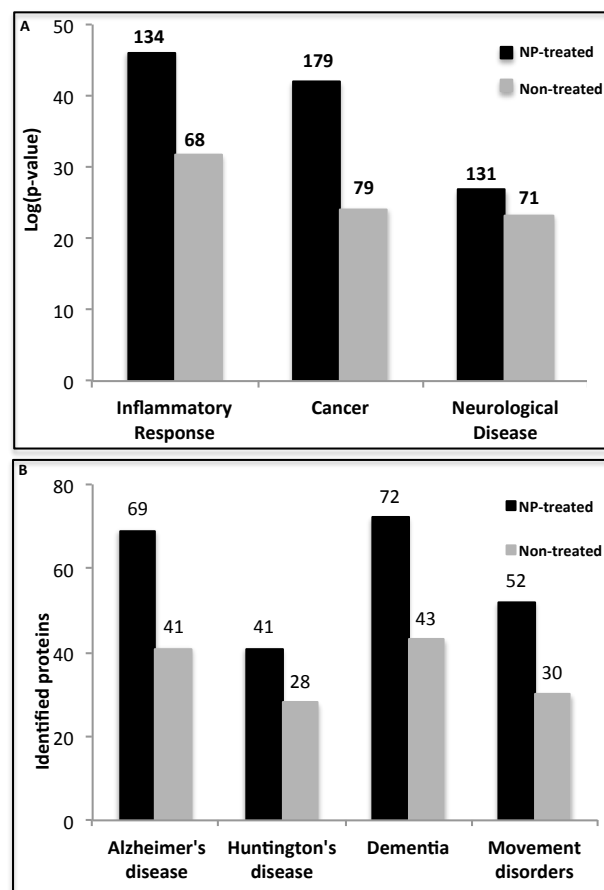


Figure 4: Functional annotation by Ingenuity Pathway Analysis (IPA) of proteins identified by nano-LC-MS/MS. A. 3 more significantly represented pathological processes according to proteins identified from NP-treated (black bar) and crude CSF (grey bar). Each bar represents the log (p-value) for each condition and the numbers in bold corresponds to the different proteins identified in each condition and associated to these pathological processes. B. Number of different proteins associated to Alzheimer's disease, Huntington's disease, dementia and movement disorders in NP-treated (black bar) and crude CSF (grey bar).

Conclusion

By this study, we provide a new strategy based on chemically modified NPs to explore the CSF proteome. In order to be close to conditions frequently encountered in CSF clinical proteomics studies, we evaluated the efficiency of our approach in less than 0.5 ml of sample. From 400 µl of CSF and through the use of two kinds of chemically modified NPs, we have increased by 162 % the number of different identified proteins. This great result can mainly be explained by the relative weak

capture of albumin on NP-surface, thus decreasing the range of protein concentration in NP-eluted samples. Moreover, the affinity of each kind of NPs for specific CSF proteins has enabled the capture of different sub-proteomes, thus extending the total number of identified proteins. Finally, the demonstrated qualitative and quantitative reproducibility of protein harvesting for both kinds of NPs has confirmed the interest of our strategy in quantitative proteomic studies.

In conclusion, NP strategy associated to nano-LC-MS profiling of proteins using label-free quantification on high-resolution mass spectrometers is a well-suited analytical method for biomarker research in clinical proteomic studies. It allows the detection of a large number of proteins, their quantification with a good accuracy and the analysis of a large number of patient samples through the use of automated platform using NPs^{26,27}. It could represent a useful approach for clinical studies in order to highlight new neurodegenerative-associated biomarkers from CSF.

Conflict of Interest Disclosure

The authors declare no competing financial interest

References

1. Eller, M.; Williams, D. R., Biological fluid biomarkers in neurodegenerative parkinsonism. *Nat Rev Neurol* 2009, 5 (10), 561-70.
2. Good, D. M.; Thongboonkerd, V.; Novak, J.; Bascands, J. L.; Schanstra, J. P.; Coon, J. J.; Dominiczak, A.; Mischak, H., Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. *J Proteome Res* 2007, 6 (12), 4549-55.
3. Hu, S.; Loo, J. A.; Wong, D. T., Human body fluid proteome analysis. *Proteomics* 2006, 6 (23), 6326-53.
4. Huhmer, A. F.; Biringer, R. G.; Amato, H.; Fonteh, A. N.; Harrington, M. G., Protein analysis in human cerebrospinal fluid: Physiological aspects, current progress and future challenges. *Dis Markers* 2006, 22 (1-2), 3-26.
5. Persson, L.; Hardemark, H. G.; Gustafsson, J.; Rundstrom, G.; Mendel-Hartvig, I.; Esscher, T.; Pahlman, S., S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke* 1987, 18 (5), 911-8.
6. Zerr, I.; Bodemer, M.; Gefeller, O.; Otto, M.; Poser, S.; Wiltfang, J.; Windl, O.; Kretschmar, H. A.; Weber, T., Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1998, 43 (1), 32-40.
7. Guillaume, E.; Zimmermann, C.; Burkhard, P. R.; Hochstrasser, D. F.; Sanchez, J. C., A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* 2003, 3 (8), 1495-9.
8. Hong, Z.; Shi, M.; Chung, K. A.; Quinn, J. F.; Peskind, E. R.; Galasko, D.; Jankovic, J.; Zabetian, C. P.; Leverenz, J. B.; Baird, G.; Montine, T. J.; Hancock, A. M.; Hwang, H.; Pan, C.; Bradner, J.; Kang, U. J.; Jensen, P. H.; Zhang, J., DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain* 2010, 133 (Pt 3), 713-26.
9. Shi, M.; Bradner, J.; Hancock, A. M.; Chung, K. A.; Quinn, J. F.; Peskind, E. R.; Galasko, D.; Jankovic, J.; Zabetian, C. P.; Kim, H. M.; Leverenz, J. B.; Montine, T. J.; Ghingina, C.; Kang, U. J.; Cain, K. C.; Wang, Y.; Aasly, J.; Goldstein, D.; Zhang, J., Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Ann Neurol* 2011, 69 (3), 570-80.
10. Goldman, D.; Merrill, C. R.; Ebert, M. H., Two-dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins. *Clin Chem* 1980, 26 (9), 1317-22.
11. Sickmann, A.; Dormeyer, W.; Wortelkamp, S.; Woitalla, D.; Kuhn, W.; Meyer, H. E., Identification of proteins from human cerebrospinal fluid, separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 2000, 21 (13), 2721-8.
12. Yuan, X.; Russell, T.; Wood, G.; Desiderio, D. M., Analysis of the human lumbar cerebrospinal fluid proteome. *Electrophoresis* 2002, 23 (7-8), 1185-96.
13. Pan, S.; Zhu, D.; Quinn, J. F.; Peskind, E. R.; Montine, T. J.; Lin, B.; Goodlett, D. R.; Taylor, G.; Eng, J.; Zhang, J., A combined dataset of human cerebrospinal fluid proteins identified by multi-dimensional chromatography and tandem mass spectrometry. *Proteomics* 2007, 7 (3), 469-73.
14. Sickmann, A.; Dormeyer, W.; Wortelkamp, S.; Woitalla, D.; Kuhn, W.; Meyer, H. E., Towards a high resolution separation of human cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002, 771 (1-2), 167-96.
15. Mouton-Barbosa, E.; Roux-Dalvai, F.; Bouyssie, D.; Berger, F.; Schmidt, E.; Righetti, P. G.; Guerrier, L.; Boschetti, E.; Burlet-Schiltz, O.; Monsarrat, B.; Gonzalez de Peredo, A., In-depth exploration of cerebrospinal fluid by combining peptide ligand library treatment and label-free protein quantification. *Mol Cell Proteomics* 2010, 9 (5), 1006-21.
16. Huang, J. T.; McKenna, T.; Hughes, C.; Leweke, F. M.; Schwarz, E.; Bahn, S., CSF biomarker discovery using

label-free nano-LC-MS based proteomic profiling: technical aspects. *J Sep Sci* 2007, 30 (2), 214-25.

17. Jimenez-Marin, A.; Collado-Romero, M.; Ramirez-Boo, M.; Arce, C.; Garrido, J. J., Biological pathway analysis by ArrayUnlock and Ingenuity Pathway Analysis. *BMC Proc* 2009, 3 Suppl 4, S6.

18. Favier, B.; Alam, A.; Barron, P.; Bonnin, J.; Laboudie, P.; Fons, P.; Mandron, M.; Herault, J. P.; Neufeld, G.; Savi, P.; Herbert, J. M.; Bono, F., Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* 2006, 108 (4), 1243-50.

19. Giger, R. J.; Cloutier, J. F.; Sahay, A.; Prinjha, R. K.; Levengood, D. V.; Moore, S. E.; Pickering, S.; Simmons, D.; Rastan, S.; Walsh, F. S.; Kolodkin, A. L.; Ginty, D. D.; Geppert, M., Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 2000, 25 (1), 29-41.

20. Hardemark, H. G.; Ericsson, N.; Kotwica, Z.; Rundstrom, G.; Mendel-Hartvig, I.; Olsson, Y.; Pahlman, S.; Persson, L., S-100 protein and neuron-specific enolase in CSF after experimental traumatic or focal ischemic brain damage. *J Neurosurg* 1989, 71 (5 Pt 1), 727-31.

21. Hardemark, H. G.; Almqvist, O.; Johansson, T.; Pahlman, S.; Persson, L., S-100 protein in cerebrospinal fluid after aneurysmal subarachnoid haemorrhage: relation to functional outcome, late CT and SPECT changes, and signs of higher cortical dysfunction. *Acta Neurochir (Wien)* 1989, 99 (3-4), 135-44.

22. Reiber, H., Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 2001, 310 (2), 173-86.

23. Tsui, C. C.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Barnes, C.; Worley, P. F., Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. *J Neurosci* 1996, 16 (8), 2463-78.

24. Abad, M. A.; Enguita, M.; DeGregorio-Rocasolano, N.; Ferrer, I.; Trullas, R., Neuronal pentraxin 1 contributes to the neuronal damage evoked by amyloid-beta and is overexpressed in dystrophic neurites in Alzheimer's brain. *J Neurosci* 2006, 26 (49), 12735-47.

25. Nielsen, H. M.; Minthon, L.; Londos, E.; Blennow, K.; Miranda, E.; Perez, J.; Crowther, D. C.; Lomas, D. A.; Janciauskiene, S. M., Plasma and CSF serpins in Alzheimer disease and dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2007, 69 (16), 1569-79.

26. Villanueva, J.; Lawlor, K.; Toledo-Crow, R.; Tempst, P., Automated serum peptide profiling. *Nat Protoc* 2006, 1 (2), 880-91.

27. Villanueva, J.; Philip, J.; Entenberg, D.; Chaparro, C. A.; Tanwar, M. K.; Holland, E. C.; Tempst, P., Serum peptide

profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 2004, 76 (6), 1560-70.

3. Conclusions et Perspectives.

L'accès au protéome minoritaire du LCR est un enjeu majeur pour la découverte de marqueurs moléculaires des maladies neurodégénératives en protéomique clinique. Actuellement, les limites technologiques des spectromètres de masse, dont la gamme de détection est limitée à 5 ordres de grandeur, requièrent de réduire les différences de concentration des protéines de l'échantillon dans l'espoir de détecter ces marqueurs. Dans cette étude, nous avons démontré les capacités de NPs magnétiques fonctionnalisées à réduire la gamme de concentration des protéines du LCR. Les profils MALDI et SDS-PAGE des protéines éluées de la surface des NPs ont clairement mis en évidence

-la diminution considérable de la proportion d'albumine

-l'augmentation de la proportion de nombreuses autres protéines,

par rapport au profil de LCR non traité avec les NPs. Cette modification de la gamme de concentration a permis d'identifier 409 protéines différentes à partir de 400 µl de LCR total incubé sur 2 types différents de NPs. Les comparaisons qualitative des protéines identifiées dans les réplicats, et quantitative déterminée par une approche « label free » ont confirmé la reproductibilité de capture des NPs. L'identification de nombreuses protéines cérébrales et/ou connues pour être impliquées dans des pathologies du système nerveux ont finalement validé les capacités de notre stratégie à accéder à un protéome représentatif du cerveau.

Cette étude est la première à démontrer l'intérêt des NPs pour l'analyse protéomique du LCR. Elle est aussi la première à permettre l'identification de plus de 400 protéines à partir de 400 µl d'échantillon. Etant donné les faibles volumes de LCR disponible par patient dans les études de protéomique, notre stratégie propose ainsi une solution adaptée aux conditions cliniques. La possibilité d'automatiser la préparation de l'échantillon avec la mise en place d'une plateforme comme celle décrite par Villanueva et al (Villanueva, Lawlor et al. 2006) ouvrirait la voie au profilage protéique haut débit du LCR pour la recherche de biomarqueurs dans les maladies neurodégénératives. Nous travaillons actuellement à la mise en place de cette plateforme afin de pouvoir collaborer avec des équipes disposant de nombreux échantillons de LCR dans différentes pathologies et souhaitant mettre en place une stratégie de profilage quantitatif à des fins diagnostiques. Nous continuons aussi notre

collaboration avec le Dr Bernard Monsarrat et comparerons prochainement notre stratégie à Proteominer® sur un même pool de LCR dans des conditions strictement identiques.

II. L'utilisation de NPs pour l'analyse protéomique du globule rouge (GR).

1. Introduction

A l'instar du Protéominer, dont l'efficacité a été démontrée pour différents types d'échantillons (Castagna, Cecconi et al. 2005), (Sennels, Salek et al. 2007), (Roux-Dalvai, Gonzalez de Peredo et al. 2008), nous étions curieux d'évaluer le comportement des NPs dans un autre environnement que le LCR. Nous recherchions un type d'échantillon pour lequel l'accès à son protéome minoritaire était difficile en raison de l'hyper abondance de certaines protéines. L'érythrocyte, plus communément appelé globule rouge remplissait cette condition.

1) L'érythrocyte ou globule rouge.

La différenciation du réticulocyte en érythrocyte est la dernière étape de l'érythropoïèse. Au cours de ce processus, débutant dans la moelle osseuse et se terminant dans la circulation sanguine, les cellules vont réduire leur taille, se charger en hémoglobine pour finalement donner un GR mature dépourvu de noyau et d'organelles. La perte de ces organites, combiné à l'élasticité de sa membrane plasmique (Goodman and Shiffer 1983) permet au GR de se déformer pour se frayer un chemin dans les capillaires les plus étroits et ainsi exercer sa fonction principale : le transport de l'oxygène.

2) L'analyse protéomique du GR

Cette perte de noyau signifie aussi que le GR est incapable de réguler son contenu protéique ; un dysfonctionnement de l'expression de certaines protéines n'est donc pas compensé et peut être responsable d'hémopathies sévères (Weatherall and Provan 2000), (Provan and Weatherall 2000),(Delaunay 2007). C'est pourquoi l'accès au protéome érythrocytaire est un enjeu majeur pour l'étude de ces pathologies. Malheureusement la présence majoritaire de l'hémoglobine dont la quantité représente 98 % des protéines solubles du GR rend difficile l'identification des 2% restant, représentées par les protéines minoritaires. Depuis plusieurs années différentes stratégies ont été développées afin

d'identifier ces protéines (Kakhniashvili, Bulla et al. 2004), (Pasini, Kirkegaard et al. 2006). En 2008, Ringrose et al (Ringrose, van Solinge et al. 2008) a profité de l'affinité de l'hémoglobine pour le Nickel, pour la déléter sur colonne et identifier 700 protéines différentes dans la fraction non retenue. La même année, Roux Dalvai et al (Roux-Dalvai, Gonzalez de Peredo et al. 2008) du laboratoire du Dr Bernard Monsarrat a utilisé Proteominer et identifié 1578 protéines. Actuellement près de 2000 protéines différentes ont pu être identifiées dans le GR (D'Alessandro, Righetti et al. 2010). Bien qu'efficaces pour identifier un grand nombre de protéines, ces stratégies ont nécessité une séparation intensive des protéines sur gel SDS-PAGE et une grande quantité d'échantillon. Elles sont incompatibles avec du profilage protéique haut débit pour la recherche de marqueurs moléculaires associées aux pathologies du GR. Jusqu'à présent aucune étude ne s'est intéressée à l'utilisation de NPs pour l'analyse protéomique du GR.

En collaboration avec le Pr Pascal Mossuz, hématologue au CHU de Grenoble, nous avons évalué les capacités des NPs à accéder au protéome minoritaire érythrocytaire. Comme pour l'étude sur le LCR, l'analyse nano-LC-MS/MS a été réalisée par la Dr Florence Roux-Dalvai au laboratoire du Dr Bernard Monsarrat.

2. Article 4 :

A nanoparticle-assisted strategy to explore the human red blood cell deep proteome.

Affif Zaccaria, Florence Roux-Dalvai, Ali Bouamrani, Pascal Mossuz, Bernard Monsarrat, François Berger. *Analytical Chemistry* 2013

Suppl data : <https://docs.google.com/folder/d/0B1GhVE-38pVBZ28temJpalcxN2c/edit>

A nanoparticle-assisted strategy to explore the human red blood cell deep proteome.

Affif.Zaccaria^{1*}, Florence.Roux-Dalvai^{2,3*},
Ali.Bouamrani^{1,5}, Pascal.Mossuz⁴, Bernard.Monsarrat^{2,3},
François.Berger^{1,5}.

¹ Grenoble Institute of Neurosciences Team 7 Brain Nanomedicine, INSERM U836, UJF, CHU, Grenoble, France.

² CNRS, IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France

³ Université de Toulouse, UPS, IPBS, F-31077 Toulouse, France.

⁴ TIMC-THEREX UMR 5525 CNRS, UJF, CHU Grenoble, France.

⁵ Cinatec CEA-LETI, Grenoble, France.

*These authors contributed equally to this work.

Abstract

Background: Red blood cell (RBC) proteome remains poorly explored because of the difficult to circumvent the abundance of hemoglobin representing 98 % of the total protein amount. A deeper access to RBC proteome is essential to better understand molecular mechanisms implicated in hematological disorders.

Methods: Here we used three different types of chemically modified magnetic nanoparticles (NPs) as a harvesting surface to increase the detection of low concentrated proteins from low volumes of human RBCs. 200 µl of RBC lysate were incubated with 500 µg of NPs and the proteins harvested were analyzed by MALDI-TOF-MS and identified by Nano-LC-MS/MS.

Results: Nano-LC-MS/MS analysis validated the enrichment efficacy of this NP-harvesting method, allowing the identification of 909 different proteins from 1 mg of initial RBC proteins. Replicated sample analysis and label free quantification demonstrated (i) a qualitative and quantitative reproducibility and (ii) a relative selectivity of the NP-surface in protein harvesting, for each type of NPs. This increased number of identified proteins allowed an extensive exploration of RBC molecular processes, highlighting several signaling pathways implicated in blood disorders such as JAK/Stat or mTOR signaling.

Discussion: Our data revealed the complexity of the RBC proteome, opening the way to a deeper comprehension of RBC functions. High-throughput potentiality, qualitative and quantitative reproducibility and the minimal amount of sample needed demonstrate the strong compatibility of our strategy with biomarker research in clinical studies.

Introduction

Erythrocyte or red blood cell (RBC) has a life span of approximately 4 months and its main function is oxygen transport. Since RBCs are the main oxygen transporter, genetics and acquired defects can be particularly severe; leading to hematological disorders frequently associated to the lack or altered expression of an RBC protein (1-3). To improve our understanding of such disorders, it is important to explore the RBC proteome to determine proteins potentially implicated in hematological diseases. Mass spectrometry technology currently allows protein content comparison of hundred of samples and has become a powerful tool to correlate a disease with specific changes in the proteome (4-6). But this exploration is a challenging analytical task because of the presence of highly abundant hemoglobin (Hb). It represents 98% of the total RBC soluble protein content and masks the 2% of biologically interesting low abundant proteins. During the last decade, technical advances in proteomic field greatly contributed to new RBC protein identifications. In 2004, Kakhniashvili *et al.* (7) identified 181 unique proteins separated by reverse phase HPLC and analyzed by tandem mass spectrometry. In 2006, Pasini *et al.* (8) identified 566 proteins by combining quadrupole time of flight mass spectrometry with selected biochemical procedures for sample preparation. More recently, Ringrose *et al.* (9) identified 700 unique proteins after selective depletion of Hb and carbonic anhydrase-1. Roux-Dalvai *et al.* (10), through the refinement of the ProteominerTM equalization technology and the utilization of the fast and high-throughput Orbitrap MS analysis revealed 1,578 RBC cytosolic proteins, clearly demonstrating that the 2% RBC proteome is constituted by an extraordinary array of unique gene products (11). Although these approaches allowed the identification of new proteins, they are time consuming and they require large volumes of sample to be really efficient, thus limiting the clinical translation of such technologies for large-scale studies.

With the emergence of nanotechnology over the past decade, engineering and introduction of magnetic nanoparticles (NPs) in biomedical research has offered exciting opportunities (12-15).

Their magnetic feature enables an easier piloting and manipulation, facilitating sample preparation and handling for ex vivo experimental settings (16). Moreover, their tunable surface functionalization plus their comparable size to biomolecules endow them with unique physicochemical properties that are not observed

in their bulk forms (17); making them particularly attractive for low abundant protein harvesting. Finally, NPs have a very large surface-to-volume ratio, so that even small amounts of particles present extremely large surface areas available for protein binding. This should decrease the amount of pathological fluids indispensable for proteomic investigations that is mandatory for translation at the bedside of proteomic technologies.

In the present study, we applied magnetic NP technology to the mining of the minority RBC proteome and demonstrated that incubation of low volume hemolysates with different NPs unmasked numerous proteins and greatly reduced the concentration of Hb. The LTQ-Orbitrap analysis of captured proteins revealed 909 different protein species in clinical study suitable conditions. Functional analysis of the proteins identified highlighted important signaling pathways that could be helpful in the understanding of RBC disorders. Moreover the synergistic features of the different NPs and the qualitative and quantitative reproducibility indicated that NP technology could be used in clinical biomarker research.

Materials and Methods

Materials

Magnetic nanoparticles of 100 nm in aqueous suspension were obtained from Chemicell GmbH (Berlin, Germany). Their magnetite core gives them a superparamagnetic behavior, and they are grafted with different matrices and functional groups. They have a multi-domain core allowing a fast and easy magnetic isolation by an external magnet (MagnetoPURE, Chemicell GmbH, Berlin, Germany).

Three different kinds of nanoparticles were used in our study. fluidMAG-OS, fluidMAG-PAA and fluidMAG-Q. Detailed features are available on <http://www.chemicell.com/>

RBC preparation and lysis

Blood samples were collected from healthy consenting donors by venipuncture in EDTA vacutainer tubes. Samples were centrifuged at 1000g at +4°C for 10 minutes to eliminate plasma and buffy coat. To further eliminate leucocytes a gradient separation using ficcol was performed. After removal of mononuclear cells and top RBC layer, erythrocytes were carefully collected, avoiding polynuclear cells collected in the pellet. Erythrocytes were then washed 3 times with PBS + PMSF (154 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4

containing 0.1 mM PMSF). At each step supernatant was removed.

The lysis of RBC was operated by hypotonic shock. Red cells were diluted to a 1:3 ratio with lysis buffer (5mM phosphate buffer, pH 7.4 containing 1 mM EDTA and 0.5 mM PMSF) containing protease inhibitor and left in ice for 30 minutes. After freezing red cells were thawed at 37°C. The procedure of freezing/thawing was repeated twice for each sample. At the end of the lysis step, after a centrifugation at 36000 x g for 10 minutes at +4°C, the clear supernatant was collected and stored at -80°C until use.

RBC proteins-nanoparticles incubation

200 µl of hemolysate containing 1 mg of proteins were slightly agitated for 45 min with 500 µg of NPs in NaCl 150 mM/Imidazole 10mM. NPs were attracted to the bottom of the sample tube by an external magnet and supernatant was removed. NPs were washed 3 times in NaCl 150 mM/Imidazole 10 mM. Finally, the proteins were desorbed using a solution of 8 M urea-2 % CHAPS and the concentration of eluted solution from each kind of NP was determined by a Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Analysis of RBC lysate fractions by SDS-PAGE

10 µg of each sample were mixed with Laemli buffer (4% SDS, 20 % glycerol, 10 % 2-mercaptoethanol, 0.004 % bromophenol blue, 0.125 M Tris HCl) from Bio-Rad. The mixture was heated in boiling water for 5 min and loaded on a precast 4 % to 15 % polyacrylamide gel from Bio-Rad. The electrophoretic run was performed by setting a voltage of 130 V until the dye front reached the bottom of the gel. Staining and destaining were performed with Coomassie blue and 30 % ethanol/ 7 % acetic acid in water respectively.

Analysis of RBC lysate fractions by proteomic profiling

Protein fractions at appropriate concentration i.e 0.02 µg/µl were deposited on a CM10 ProteinChip® array (weak cation exchange surface). After applying the samples, the chip surfaces were washed to remove unbound proteins. After drying, 1 µl of energy-adsorbing matrix solution (composed of a saturated solution of sinapinic acid in 50 % acetonitrile and 0.5 % trifluoroacetic acid) was deposited on the spot surface. Proteomic profiling was performed on a MALDI mass spectrometer (Autoflex, Bruker) in a linear mode. 5400 laser shots were acquired for each sample with a laser intensity of 55 and a matrix attenuation of 1000 Da. The mass range investigated was from 3 to 100 kDa.

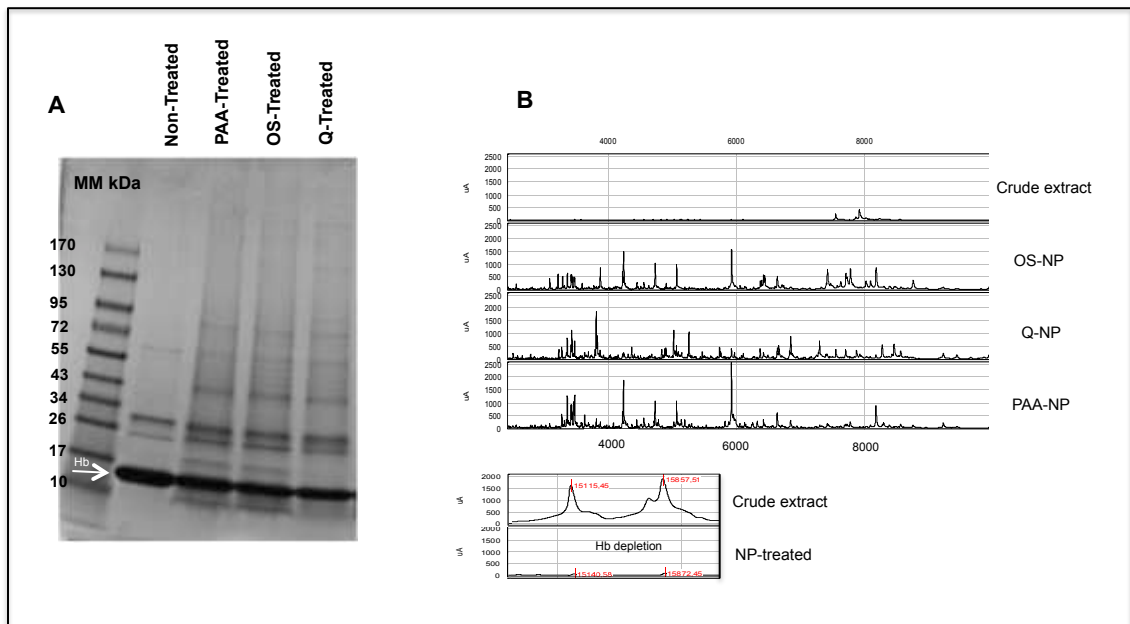


Figure 1: Protein profiles of non-treated and NP-treated RBC lysates. (A) 1D SDS-PAGE - the white arrow shows the position of the hemoglobin protein and (B) SELDI-TOF-MS showing efficiency of 3 different NP-treatments for enriched protein detection and hemoglobin depletion compared to non-treated RBC extract. The same quantity of proteins was loaded on gel and on chip for the different samples.

LC-MS/MS analysis of RBC proteins

The supplemental data provides a detailed description of LC-MS/MS identification.

Briefly, 10 μg of each eluate and crude RBC lysates were diluted in Laemli buffer and stacked in one band after a short and low voltage electrophoretic migration on SDS PAGE gel. After trypsin digestion, the resulting peptides were extracted from the gel and analyzed by nano-LC-MS/MS using an ultimate3000 system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany). The LTQ-Orbitrap was operated in data-dependent acquisition mode with the Xcalibur software. Survey scan MS spectra were acquired in the Orbitrap on the 300-2000 m/z range with the resolution set to a value of 60,000. The five most intense ions per survey were selected for CID fragmentation, and the resulting fragments were analyzed in the linear trap (LTQ).

Database Search and Data Analysis

The Mascot Daemon software (version 2.3.0, Matrix Science, London, UK) was used to perform database searches against homo sapiens entries in Uniprot protein database (release 2010_09 - Sep 21, 2010; 1215533 sequences). Mascot results were parsed with the in-house developed software Mascot File parsing and Quantification (MFPaQ) version 4.0.0

(<http://mfpaq.sourceforge.net/>), and protein hits were automatically validated.

Label-free Quantification

Quantification of proteins was performed using the label-free module implemented in the MFPaQ v4.0.0 software (<http://mfpaq.sourceforge.net/>). For each sample, the software uses the validated identification results and extracted ion chromatogram (XIC) of the identified peptides in the corresponding raw nano-LC-MS files based on their experimentally measured retention time (RT) and monoisotopic m/z values. Quantification of peptide ions was performed based on calculated XIC areas values. To compare abundance of different proteins or to represent the abundance profile of one protein in different samples, a protein abundance index (PAI) was calculated defined as the average of XIC area values for three intense reference tryptic peptides identified for this protein. To compare the relative selectivity in protein harvesting, of each kind of NPs, the PAI obtained in each NP-sample for each protein were standardized by its highest value. Standardized PAI were submitted to software R for protein hierarchical clustering (20).

Results

SDS PAGE analysis

200 μl of RBC lysates containing 1 mg of proteins were incubated with 500 μg of magnetic NPs, and NPs were

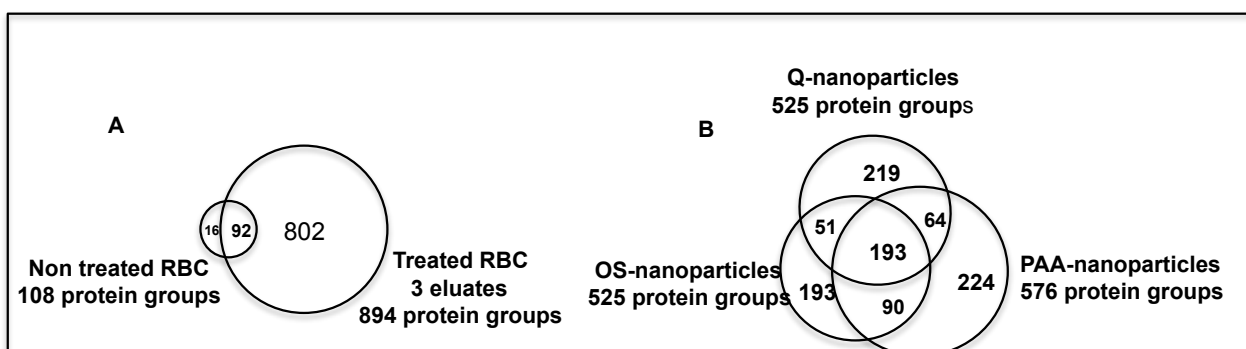


Figure 2: Venn diagrams representing the extent of overlap of proteins identified by LC-MS/MS analysis. A, comparison made between the crude RBC extract (108 proteins) and all NP-treated samples (894 proteins). B, comparison among the three NP-treated samples (PAA-NP, 576 proteins; OS-NP, 525 proteins; Q-NP, 525 proteins)

eluted with Urea 8 M-CHAPS 2 % to collect the proteins harvested. From each of the three NP eluates (each one corresponding to one kind of NPs), approximately 30 μ g of proteins were collected, representing 3 % of the initial protein input.

For the three eluates and the crude RBC lysate, 10 μ g of proteins were loaded on the SDS-PAGE gel. SDS-PAGE analysis of the eluate revealed a pattern of proteins obviously different of non-treated sample. Indeed, the protein profile of the NP-treated samples showed a diminution of Hb-band intensity and the appearance of many others bands ranging from 10 to 250 kDa which were not detected in the control condition (Fig 1A).

Analysis of RBC proteins by MS profiling

This first observation was confirmed by MS profiling analysis of 5 μ g of proteins from each eluate and crude RBC on CM10 ProteinChip array (Fig 1B). Compared to crude extract spectrum, spectra of the NP-eluates were greatly enriched in m/z peaks from 2.5 to 10 kDa. Indeed, m/z peaks that probably correspond to hemoglobin subunits (around 15 kDa) were obviously decreased for all treated samples, confirming SDS-PAGE observation. Using the same detection parameters and compared to untreated sample, the number of different detected m/z between 2.5 and 10 kDa was increased twice on treated sample and 3 times when we combined all the different m/z peaks detected on the 3 treated samples (data not shown). This observation suggested the complementary properties and thus the relative selectivity of each kind of NPs for protein capture, each surface chemistry providing the bioharvesting of different subproteomes.

Protein identification by Nano-LC-MS/MS

To assess this enrichment, a deeper characterization of the RBC proteome was performed by one nano-LC-MS/MS run on both NP-treated and crude RBC lysates after concentration of proteins into a unique gel band on SDS PAGE gel. Figure 2 sums up the results obtained for

each sample and gives an insight of the harvesting capacity for each condition. Identification on the crude RBC lysate revealed 108 proteins whereas analysis of the 3 different NPs eluates identified 894 different proteins (figure 2A). Among these 894 proteins, 802 were exclusively identified on NP-eluates and 92 were shared with crude RBC lysate. The list of the 909 different proteins identified in the study is detailed in supplementary data. A focus on the 3 NP-eluates revealed a similar number of identified proteins varying from 525 for OS and Q-NPs to 576 for PAA-NP; only 193 proteins were shared by the three types of NPs (figure 2B). The comparison of the proteins identified from replicated samples revealed on average 92 % of similar proteins, highlighting the qualitative reproducibility of each type of NPs in protein harvesting. To evaluate the quantitative reproducibility of NPs treatment, we used the MFPaQ software, which was designed to parse and validate protein identifications from Mascot result files and quantify the identified proteins. The quantification module of MFPaQ version 4.0 was upgraded so that it could handle label-free quantification as described by Mouton Barbosa *et al* (18). The analyses of duplicates for each NP-sample were performed and identified proteins were quantified using this tool. As shown in figure 3A quantitative reproducibility of NPs was found to be good between the duplicates. In fact, the majority of quantified proteins on each kind of NPs revealed a PAI ratio close to the expected value of 1 (Figure 3). Based on these quantification results, we normalized the PAI obtained for each protein in each sample and submitted them to hierarchical clustering with the software R. The aim was to determine if each kind of NPs has a selective protein harvesting. The clustering revealed 10 groups of differentially quantified proteins, according to the kind of NPs (suppl data). Among them, 3 groups revealed proteins mainly quantified by only one kind of NPs

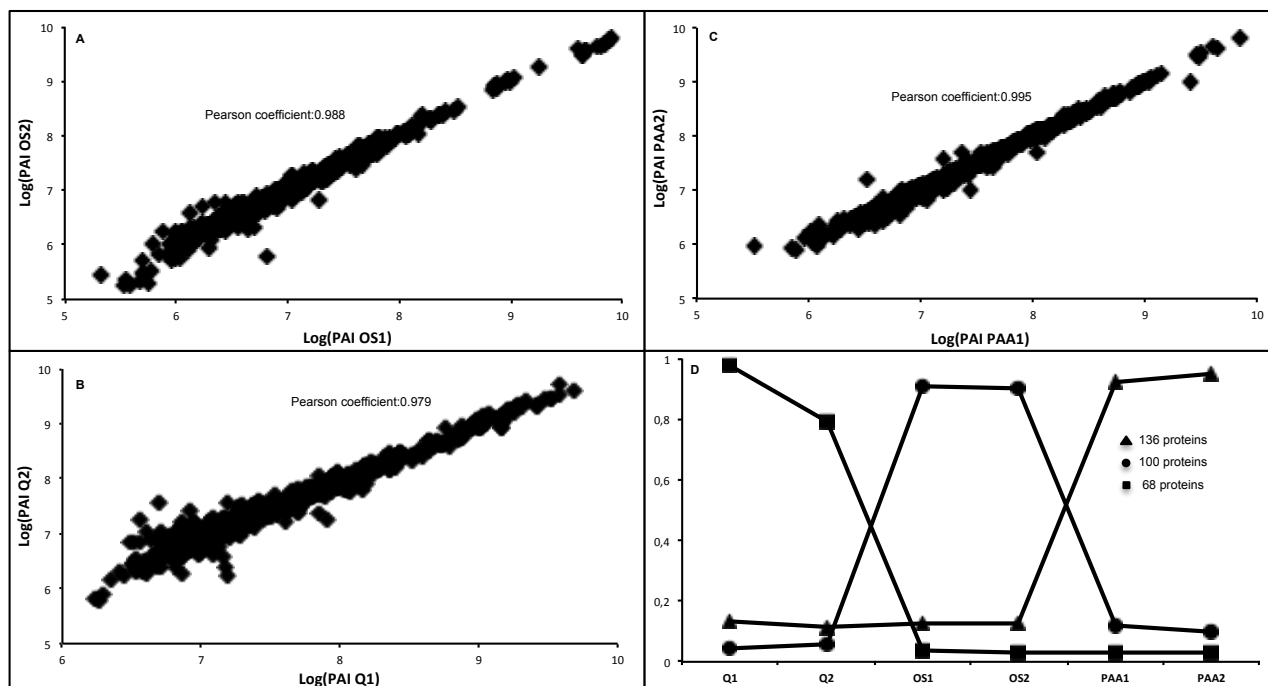


Figure 3: Reproducibility and Selectivity of NPs for protein harvesting evaluated by LC-MS/MS identification and label free quantification. A-C, reproducibility of protein quantification over duplicates for OS (A), Q (B) and PAA-NPs (C): correlation of log (PAI) values for all quantified protein. D, selectivity of NPs-surface for protein harvesting: mean PAI ratio of 3 different groups of proteins (obtained by hierarchical clustering software R) for each NP-treated sample.

(Figure 3D). In fact, group 4, 5 and 8 highlighted 68, 136 and 100 different proteins principally and abundantly quantified from Q, PAA and OS-NPs respectively. These results showed that the chemically modified surfaces of NPs impact on the identity of captured proteins.

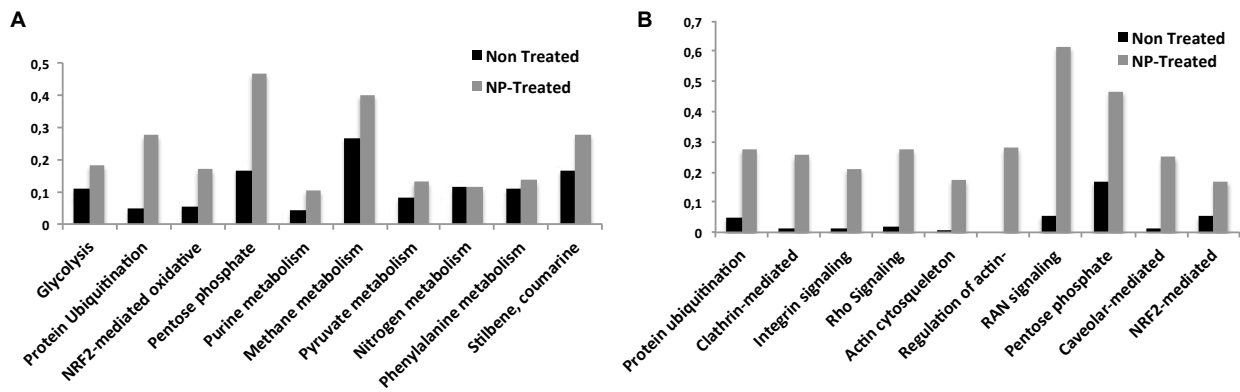
Functional analysis of RBC proteins

We further submitted our data set to Ingenuity Pathway Analysis software (Ingenuity Systems, Redwood City, CA) to perform the functional characterization of the RBC proteome and identify the main molecular pathways and networks. This automatic annotation tool uses a knowledge database and assigns proteins to functional classes or specific canonical pathways (CPs) related to various biological processes (21). According to the functional analysis, the 894 proteins identified in NP-treated samples had been associated to 140 different CPs and revealed 98 species related to hematological diseases; the 109 proteins from the crude extract only highlighted 40 different CPs and 31 proteins previously described in hematological diseases. The 10 more significant CPs for crude RBC lysat were related to the cellular origin and known functions of RBC. Most of them involved protein and nucleic acid degradation (protein ubiquitination pathway, purine and pyrimidine metabolisms), anaerobic glycolysis (glycolysis and pentose phosphate pathways), and response to oxidative stress (NRF2-mediated oxidative stress pathway).

Although these 10 CPs were not the most significant in NP-treated lysates, they were more represented in these samples than crude extract. Figure 4A shows the ratio of proteins identified in these 10 CPs for crude and NP-treated RBC extracts. This ratio matches to the number of proteins from our data set that map to the pathway divided by the total number of proteins referenced in this pathway by the software. We noticed in all CPs that these ratios were higher for the NP-treated samples, intending that NP increased the number of identified proteins related to these CPs. On the other hand, the 10 more significant CPs highlighted by NP-treated samples were related to cellular assembly and organization of cytoskeleton, which play an important role in RBC (Figure 4B). These pathways related to important RBC functions were almost absent from the set of proteins identified in the crude RBC sample, illustrating the impact of the enrichment following proteins harvesting using NP technology.

Discussion

In this study, we used chemically modified magnetic NPs to analyze the proteome of highly purified RBCs. The objective was to validate a new technology compatible with large translational biomarker studies and providing access to the deep RBC proteome. This kind of NPs provides great advantages for ex vivo experiments; their functionalized surfaces, their nanometer size and their



Ingenuity Pathways Analysis

Figure 4: Functional annotation of RBC proteins identified by nano-LC-MS/MS. Top 10 out of 40 and 140 significant canonical pathways (CPs) for untreated (A) and treated (B) RBC extract respectively. For each CP, the bars show the ratio between the number of identified proteins classified in that pathway and the total number of proteins referenced in this pathway by the software for untreated (black bar) and treated RBC extract (grey bar).

great surface to volume ratio endow them with unique physicochemical properties that are not observed on micrometer surfaces (17, 22, 23); making them very attractive for low abundant protein harvesting.

The three different kinds of NPs evaluated in our study allowed the identification of 894 unique proteins by nano-LC-MS/MS on an LTQ-Orbitrap mass spectrometer confirming the capacity to decrease Hb in NP-treated samples and thus to access the RBC low concentrated proteome. Each type of NPs enabled the identification of more than 500 proteins, increasing by 400 % the number of identified species compared to an untreated proteins extract of RBC (108 proteins). Among the enriched proteins, some have been previously identified in others studies and are known to be poorly expressed in RBC. For instance the μ globin chain detected by Goh *et al* (24). at a level of 0.1% compared to α globin and identified by Pasini *et al* (7). and Roux-Dalvai *et al* (10). is also present in our list. Transferrin receptor, a key protein in reticulocytes (25) but not found in mature RBCs is also detected by our strategy. Because reticulocytes represent less than 1 % of the total red cell population, the identification of such proteins validates the capacity to concentrate minor proteins on NPs. To assess whether this technology could be applied to differential proteomic studies, it was important to confirm qualitative and quantitative reproducibility of the replicates. Reproducibility of the protein lists obtained was about 92 %, a percentage relatively higher than typical values found for analysis of complex proteomes by nano-LC-MS/MS. Label free quantification of the global population of peptides and proteins identified in duplicate samples shows here that the NP-treatment of RBC is very reproducible as indicated by the

PAI measurements (26). NPs chosen for the study possess complementary functions (cationic, anionic and hydrophobic surfaces) to increase the probability to capture different sets of proteins; the label free quantification clearly demonstrated the selective protein capture of the NP surfaces.

Compared to crude RBC extract, the use of NPs allowed the identification of a higher number of proteins implicated in main RBC functions such as oxygen transport, glycolysis and protection against oxidative stress. This access to a larger proteome could be helpful to better understand mechanisms responsible for dysfunctions of these key functional pathways. The number of significantly represented CPs was 3 fold higher than in functional analysis of the crude extract. NP-treated samples specifically highlighted CPs like RhoA, Rac (27) and cdc 42 (28) signaling that have essential functions in morphology and deformability regulations of the erythrocyte cytoskeleton. The maintenance of normal deformability is crucial to permit RBC to enter in narrow capillaries. Dysfunctions of these pathways have been associated with hemolytic anemia (27). Access to such mandatory pathways for erythrocyte functions, obtained with very low quantity of initial proteins will greatly improve investigations on erythrocyte disorders.

NP technology also identified CPs implicated in hematological disorder that may not still be present in mature RBCs. For instance, JAK/STAT signaling pathway has been shown to be involved in polycythemia vera due to a mutation in JAK2 gene of hematopoietic stem cell (29); leading to altered phosphorylation activity of the corresponding kinase. MAPK has been reported phosphorylated in 40 % of acute myeloid leukemia (AML)

patients (30). PI3K/AKT mTOR and p70 S6 kinase are phosphorylated in primary cells from patient with AML (31). All these signaling pathways could be explored using our NP approach. Therefore, these results suggest that erythrocyte proteome could reflect oncogenic events of communitary hematopoietic stem cells, providing a new field of research for malignant hemopathies, completing DNA/RNA analysis on nucleated progenitors (32, 33).

The great advantage of the NP strategy is its capacity to work with low volumes, which are more compatible with automated high-throughput clinical studies. Indeed, Villanueva *et al.* (34, 35) demonstrated the reproducibility of NP using an automated platform, suggesting the ability of NP technology to simultaneously process hundreds of different samples in reproducible and clinically adapted conditions.

In conclusion, magnetic NPs coupled to nano-LC-MS/MS technology have been used to explore the RBC proteome. The NP reproducibility and the use of low volume sample were confirmed, providing a new strategy to concentrate low abundant proteins and paving the way to high-throughput clinical trials for biomarker research in hematological disorders. The efficiency of NP strategy should be evaluated on other fluids containing potential biomarkers and for which non-harvesting of high abundant proteins and the limited sample available constitute the major issues for clinical proteomic (36-39).

Acknowledgments:

This study was supported by research funding from the Region Rhone-Alpes and Innabiosanté Foundation.

Authorship contributions:

* Both authors contribute equally to this work

Affif.Zaccaria designed and performed experiments, analyzed data and wrote the paper. Florence.Roux-Dalvai designed nano LC-MS/MS experiments and analyzed data. Ali Bouamrani designed experiments and wrote the paper. Pascal Mossuz provided red blood cell lysates and wrote the paper. Bernard Monsarrat supervised the study. François Berger supervised the study and wrote the paper.

Conflict of Interest Disclosures

The authors declare that they have no competing financial interest

References:

1. Delaunay J. Molecular basis of red cell membrane disorders. *Acta Haematol* 2002;4:210-8.

2. Iolascon A, Perrotta S, Stewart G.W. Red blood cell membrane defects. *Rev Clin Exp Hematol*;7:22-56.

3. Wilson J.G, Wong W.W, Murphy E.E, Schur P.H, Fearon D.T. Deficiency of the C3b/C4b receptor (CR1) of erythrocytes in systemic lupus erythematosus: analysis of the stability of the defect and of a restriction fragment length polymorphism of the CR1 gene. *J Immunol*. 1987;138:2708-2710.

4. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*;422:198-207.

5. Hanash SM, Pitteri SJ, Faca VM. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature*. 2008;452:571-579.

6. Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. Clinical proteomics: written in blood. *Nature*. 2003;425:905.

7. Kakhniashvili DG, Bulla LA, Jr., Goodman SR. The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3:501-509.

8. Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, Lutz HU, Thomas AW, Mann M. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood*. 2006;108:791-801.

9. Ringrose JH, van Solinge WW, Mohammed S, et al. Highly efficient depletion strategy for the two most abundant erythrocyte soluble proteins improves proteome coverage dramatically. *J Proteome Res*. 2008;7:3060-3063.

10. Roux-Dalvai F, Gonzalez de Peredo A, Simo C, et al. Extensive analysis of the cytoplasmic proteome of human erythrocytes using the peptide ligand library technology and advanced mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7:2254-2269.

11. D'Alessandro A, Righetti PG, Zolla L. The red blood cell proteome and interactome: an update. *J Proteome Res*. 2010;9:144-163.

12. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:161-171.

13. Geho DH, Jones CD, Petricoin EF, Liotta LA. Nanoparticles: potential biomarker harvesters. *Curr Opin Chem Biol*. 2006;10:56-61.

14. Lee JH, Huh YM, Jun YW, et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat Med*. 2007;13:95-99.

15. Xie J, Huang J, Li X, Sun S, Chen X. Iron oxide nanoparticle platform for biomedical applications. *Curr Med Chem*. 2009;16:1278-1294.

16. Chang SY, Zheng NY, Chen CS, Chen CD, Chen YY, Wang CR. Analysis of peptides and proteins affinity-bound to iron oxide nanoparticles by MALDI MS. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2007;18:910-918.

17. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications

- for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:14265-14270.
18. Mouton-Barbosa E, Roux-Dalvai F, Bouyssié D, Berger F, Schmidt E, Righetti P.G et al. In-depth exploration of cerebrospinal fluid by combining peptide ligand library treatment and label-free protein quantification. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9:1006-21.
19. Bouyssié D, Gonzalez de Peredo A, Mouton E, et al. Mascot file parsing and quantification (MFPaQ), a new software to parse, validate, and quantify proteomics data generated by ICAT and SILAC mass spectrometric analyses: application to the proteomics study of membrane proteins from primary human endothelial cells. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6:1621-1637.
20. Suzuki R, Shimodaira H. Pvclust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*. 2006;22:1540-1542.
21. Jimenez-Marin A, Collado-Romero M, Ramirez-Boo M, Arce C, Garrido J.J. Biological pathway analysis by Arrayunlock and Ingenuity Pathway Analysis. 2009;3 Suppl4;S6.
22. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:2050-2055.
23. Klein J. Probing the interactions of proteins and nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:2029-2030.
24. Goh SH, Lee YT, Bhanu NV, et al. A newly discovered human alpha-globin gene. *Blood*. 2005;106:1466-1472.
25. Mathew A, Bell A, Johnstone RM. Hsp-70 is closely associated with the transferrin receptor in exosomes from maturing reticulocytes. *Biochem J*. 1995;308 (Pt 3):823-830.
26. Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, Geromanos SJ. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5:144-156.
27. Kalfa TA, Pushkaran S, Mohandas N, et al. Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton. *Blood*. 2006;108:3637-3645.
28. Wang L, Yang L, Filippi MD, Williams DA, Zheng Y. Genetic deletion of Cdc42GAP reveals a role of Cdc42 in erythropoiesis and hematopoietic stem/progenitor cell survival, adhesion, and engraftment. *Blood*. 2006;107:98-105.
29. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-1148.
30. Towatari M, Iida H, Tanimoto M, Iwata H, Hamaguchi M, Saito H. Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathway in acute leukemia cells. *Leukemia*. 1997;11:479-484.
31. Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*. 2003;102:972-980.
32. el-Kassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: advantages of studying T lymphocytes and platelets. *Blood*. 1997;89:128-134.
33. Yoder MC, Mead LE, Prater D, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109:1801-1809.
34. Villanueva J, Lawlor K, Toledo-Crow R, Tempst P. Automated serum peptide profiling. *Nat Protoc*. 2006;1:880-891.
35. Villanueva J, Philip J, Entenberg D, et al. Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem*. 2004;76:1560-1570.
36. Huhmer AF, Biringier RG, Amato H, Fonteh AN, Harrington MG. Protein analysis in human cerebrospinal fluid: Physiological aspects, current progress and future challenges. *Dis Markers*. 2006;22:3-26.
37. Jacobs JM, Adkins JN, Qian WJ, et al. Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery. *J Proteome Res*. 2005;4:1073-1085.
38. Kim HJ, Kim PK, Yoo HS, Kim CW. Comparison of tear proteins between healthy and early diabetic retinopathy patients. *Clin Biochem*. 2012;45:60-67.
39. Xiao H, Zhang L, Zhou H, Lee JM, Garon EB, Wong DT. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11:M111 012112.

3. Conclusions et Perspectives.

Dans cet article, nous démontrons pour la première fois l'intérêt de l'utilisation de NPs modifiées chimiquement pour l'étude du protéome érythrocytaire. Contrairement aux stratégies déjà décrites dans la littérature, notre approche nécessite peu de fractionnement et peu de volume d'échantillon rendant possible l'étude de nombreuses séries de patients en protéomique clinique. L'augmentation du nombre de protéines détectées sur les spectres MS, puis identifiées et quantifiées en MS/MS confirme notre capacité à accéder au protéome minoritaire dans un échantillon où la protéine majoritaire représente 98 % de la masse protéique totale. Ces résultats ouvrent naturellement la voie au profilage protéique du GR dans des pathologies qui affectent directement les fonctions érythrocytaires telles que les anémies ou les polycythémies (Weatherall and Provan 2000) (Provan and Weatherall 2000). Grâce aux approches de protéomique quantitative, nous pourrions ainsi mettre en évidence des différences d'expression afin d'identifier les protéines associées à ces hémopathies.

De manière plus surprenante, l'analyse fonctionnelle des protéines identifiées dans le GR a mis en évidence des voies de signalisation normalement inactives dans les GR matures anucléés, telles que les voies JAK/STAT, mTOR ou PI3K/AKT. La phosphorylation révélée de certaines protéines de ces voies, dans les cellules souches hématopoïétiques, est responsable de polycythémies (James, Ugo et al. 2005) ou de leucémies myéloïdes aiguës (Towatari, Iida et al. 1997) (Xu, Simpson et al. 2003). Il semblerait donc qu'au stade final de l'érythropoïèse, le GR accessible par une simple prise de sang contienne encore les protéines de ses progéniteurs présents eux dans la moelle osseuse. Il est donc envisageable d'identifier des dysfonctionnements protéiques associés aux cellules souches hématopoïétiques et/ou autres progéniteurs à travers l'analyse protéomique du GR. Cette approche originale et moins invasive qu'une ponction de moelle osseuse viendrait ainsi compléter les analyses réalisées sur les progéniteurs nucléés dans ces pathologies (James, Ugo et al. 2005) (Goh, Josleyn et al. 2007) (Ugo, Marzac et al. 2004).

Enfin l'analyse protéomique du GR peut s'avérer utile dans la maladie de Parkinson (MP), pour laquelle le stress oxydatif au niveau de la SNc interviendrait dans la pathogénèse et/ou la progression de la maladie (Jenner 2003). La mise en évidence d'une défaillance générale

du système de régulation du stress oxydatif pourrait constituer un facteur de risque de la MP. De par sa fonction de transport de l'oxygène, le GR est soumis à un stress oxydatif important ; et une diminution d'expression des enzymes anti-oxydantes (la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase) a été mise en évidence dans les GRs de patients atteints de la MP (Abraham, Soundararajan et al. 2005). L'analyse protéomique quantitative permettrait la confirmation de ces résultats mais aussi l'identification d'autres protéines modifiées dans les GRs de patients parkinsoniens. En plus d'un stress oxydatif important, la présence dans le cytosol érythrocytaire de l'alpha synucléine et DJ-1 (Barbour, Kling et al. 2008)(Nakai, Fujita et al. 2007), deux protéines présentes aussi dans la SNC et associées aux formes familiales de la MP, laisse envisager que des études sur le GR, plus accessible que les neurones dopaminergiques de la SNC, aideraient à comprendre le rôle exact de ces protéines dans un environnement où règne un fort stress oxydatif.

III. L'utilisation de NPs pour l'analyse protéomique du plasma sanguin.

1. Introduction

1) Le plasma sanguin

Aujourd'hui, le fluide biologique le plus étudié en protéomique, pour la mise en évidence de marqueurs moléculaires, est le sang, ou plus précisément sa fraction protéique : le plasma (Anderson and Anderson 2002). Le plasma sanguin est considéré comme un réservoir universel de marqueurs moléculaires ; en effet, la plupart des cellules du corps humain libèreraient, en permanence dans le sang, des protéines informant de leur état physiopathologique à un instant donné (Liotta, Ferrari et al. 2003). Ce paradigme signifie qu'en théorie le plasma contiendrait les marqueurs moléculaires de toutes les maladies ; ce qui explique l'engouement de la protéomique pour ce fluide biologique en vue de prévenir, diagnostiquer ou évaluer l'effet d'un traitement sur une pathologie. L'identification de protéines d'origine tissulaire et retrouvées exprimées différemment dans le sang dans un contexte pathologique a conforté ce paradigme : l'augmentation de la troponine I et T (Antman, Tanasijevic et al. 1996) dans l'infarctus du myocarde ou encore celle de la « prostate specific antigen (PSA)» dans les pathologies de la prostate (Wang, Papsidero et al. 1981) en sont des exemples.

2) L'analyse protéomique du plasma sanguin

Malheureusement, face à l'importante quantité d'information générée par les nombreuses études d'un coté, et l'absence de résultats concrets dans la découverte de nouveaux marqueurs moléculaires plasmatiques de l'autre, on ne peut que constater l'échec actuel de la protéomique dans ce champ de recherche. Cet échec s'explique par l'énorme complexité du protéome sanguin (Anderson and Anderson 2002). Contrairement au LCR qui draine uniquement le système nerveux central, le sang draine tous les organes du corps humain et va contenir le protéome de chacun d'entre eux. La recherche de protéines dans le sang, spécifiques d'un tissu pathologique, va être compliquée par la présence des protéines provenant de tous les autres tissus « sains ». De plus la présence d'une vingtaine de

protéines résidentes, hyper-majoritaires (albumine, IgG, IgA, transferrine, haptoglobine, α 1-antitrypsine...) représentant 99 % de la masse protéique totale rend quasiment indétectable, par les spectromètres de masse actuels, le 1 % restant au sein duquel résident, à des concentrations très faibles les potentiels marqueurs moléculaires. En effet, la gamme de concentration dans le plasma est de 10 ordres de grandeur avec l'albumine concentrée à 50 mg/mL et les interleukines autour du pg/mL ; les spectromètres de masse les plus récents ont une gamme dynamique de 5 ordres de grandeur seulement. Dans l'attente du développement de spectromètres de masse plus performants, la seule alternative à l'identification des protéines minoritaires est de réduire la gamme de concentration protéique dans le plasma. Pour cela, des colonnes de déplétion des protéines majoritaires plasmatiques ont été développées. Différentes études ont démontré l'efficacité de ces colonnes à dépléter les protéines majoritaires (Bjorhall, Miliotis et al. 2005), (Stempfer, Kubicek et al. 2008). Cependant cette déplétion se traduit aussi par la perte de nombreuses autres protéines, liées aux protéines majoritaires qui leur servent de cargo pour circuler dans le sang (Shen, Kim et al. 2005).

Étant donné la capacité des NPs magnétiques modifiées chimiquement à considérablement augmenter le nombre de protéines identifiées dans le LCR ou le lysat de GR, en réduisant la concentration de protéines majoritaires comme l'albumine et l'hémoglobine, nous avons évalué le potentiel de ces NPs dans le plasma. Ces résultats sont préliminaires et une analyse plus détaillée est en cours.

2. Matériels et Méthodes

1) Collecte du plasma

Les échantillons sanguins proviennent de donneurs sains du CHU de Grenoble. Le sang a été récupéré dans des tubes EDTA et centrifugé 10 min à 2000g. Le surnageant constitué du plasma sanguin a été récupéré et conservé à -80°C jusqu'au moment de l'analyse.

2) Traitement avec les NPs

Ici, 2 types différents de NPs ont été utilisés : fluidMAG-OS et fluidMAG-PAA. Leurs caractéristiques plus détaillées sont disponibles en annexe. Nous avons aussi testé 2 tailles de NPs: 100 et 200 nm. Les quantités de NPs à incuber avec le plasma ont été calculées de

telle sorte que la surface de contact totale développée par les NPs soit identique quelque soit la taille des NPs.

500 µl de plasma ont été incubés avec les NPs pendant 45 min sous agitation à température ambiante. Les NPs ont été lavées 3 fois au PBS. Les protéines à leur surface ont ensuite été éluées dans un tampon acétonitrile / TFA 1% (50% / 20%). La concentration protéique des éluats et du plasma non traité a été déterminée par la méthode de Bradford.

3) Analyse du plasma par SDS-PAGE

10 µg de protéines éluées des NPs ainsi que 10 µg de plasma non traité ont été repris dans du tampon Laemli (4 % SDS, 20 % glycerol, 10 % 2-mercaptoethanol, 0.004 % bromophenol blue, 0.125 M Tris HCl), chauffés et chargés sur un gel de polyacrylamide (4 à 15 %) pour une séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie et décoloré à l'éthanol 30 % / acide acétique 7 %.

4) Identification des protéines par nano-LC-MS/MS

L'identification des protéines a été réalisée par la Dr Roxana Martinez-Pinna du laboratoire du Dr Bernard Monsarrat à Toulouse, selon le même protocole que celui utilisé pour l'analyse du LCR et du GR.

3. Résultats préliminaires

1) L'impact des NPs sur le profil SDS-PAGE du plasma sanguin

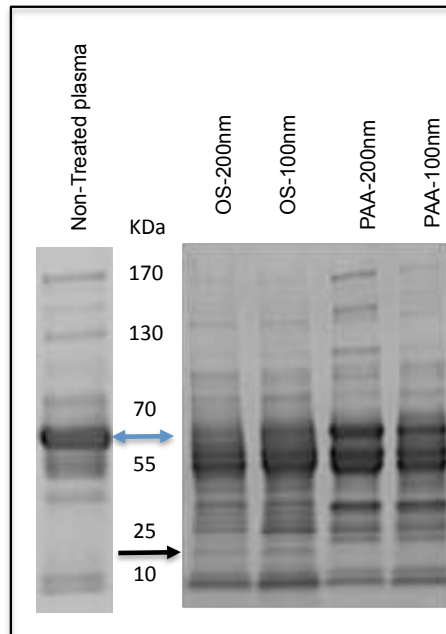


Figure 26: Profils SDS-PAGE d'un plasma non traité ou traité avec NPs. 2 types et 2 tailles différents de NPs ont été utilisés.

Comme on peut le constater sur ces profils de migration SDS-PAGE (Figure 26), les échantillons plasmatiques traités avec les NPs révèlent des profils protéiques différents du plasma brut, non traité. En effet, le profil protéique du plasma brut révèle une bande majoritaire (flèche bleue) qui correspond à la masse moléculaire de l'albumine ; très peu d'autres bandes sont visibles. En revanche, les 4 échantillons traités par les NPs révèlent des profils protéiques bien plus riches avec l'apparition de nombreuses bandes sur tout l'intervalle de masse (10 à 170 KDa). De plus la bande correspondant à l'albumine est nettement diminuée pour tous les échantillons traités, par rapport à l'échantillon contrôle. Cette première observation semble confirmer la capacité des NPs à réduire la concentration d'albumine à leur surface, permettant ainsi la détection d'autres protéines plasmatiques. Si on compare les 2 types de NPs utilisées, on observe une légère différence dans leurs profils protéiques ; on peut voir que certaines bandes sont plus intenses ou uniquement présentes (flèche noire) pour un type de NPs. Ce résultat suggère la complémentarité de capture des différentes chimies présentes à la surface des NPs. L'utilisation de différents types de NPs

permettrait une exploration plus étendue du protéome plasmatique. En revanche, aucune différence concernant la taille des NPs n'est clairement visible sur ces profils SDS-PAGE.

2) L'identification des protéines captées par les NPs par nano-LC-MS/MS

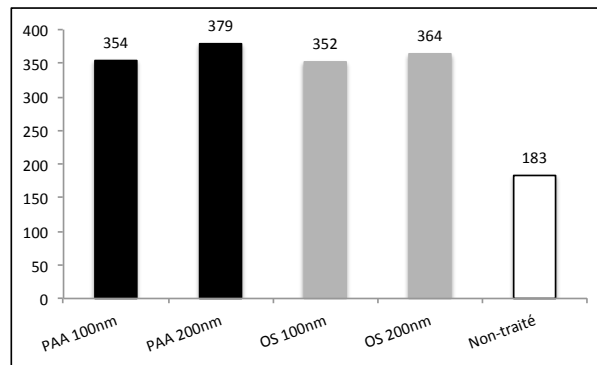


Figure 27: Histogramme récapitulatif du nombre de protéines différentes identifiées par nano-lc-ms/ms.

Afin de mieux évaluer la capacité des NPs à accéder plus largement au protéome plasmatique, nous avons identifié les protéines éluées de la surface des NPs par nano-lc-ms/ms. Les 4 échantillons traités avec les NPs et un échantillon de plasma non traité ont été analysés. Les résultats sont présentés dans la figure 27.

L'analyse du plasma non traité a permis l'identification de 183 protéines différentes ; plus de 350 protéines différentes ont été révélées à partir des échantillons traités avec les NPs. Ce nombre varie entre 352 et 379 protéines différentes, selon le type et la taille de NPs utilisés. Cette augmentation de 100 % du nombre de protéines différentes identifiées à partir de 500 μ l de plasma confirme l'intérêt de l'utilisation des NPs, en amont de l'analyse protéomique. D'après ces premiers résultats d'identification, la chimie et la taille des NPs ne semblent pas avoir une influence sur le nombre de protéines différentes captées. En revanche, si on regarde l'identité des protéines, on observe de nombreuses différences parmi les échantillons, en fonction de la chimie et de la taille des NPs (Figure 28)

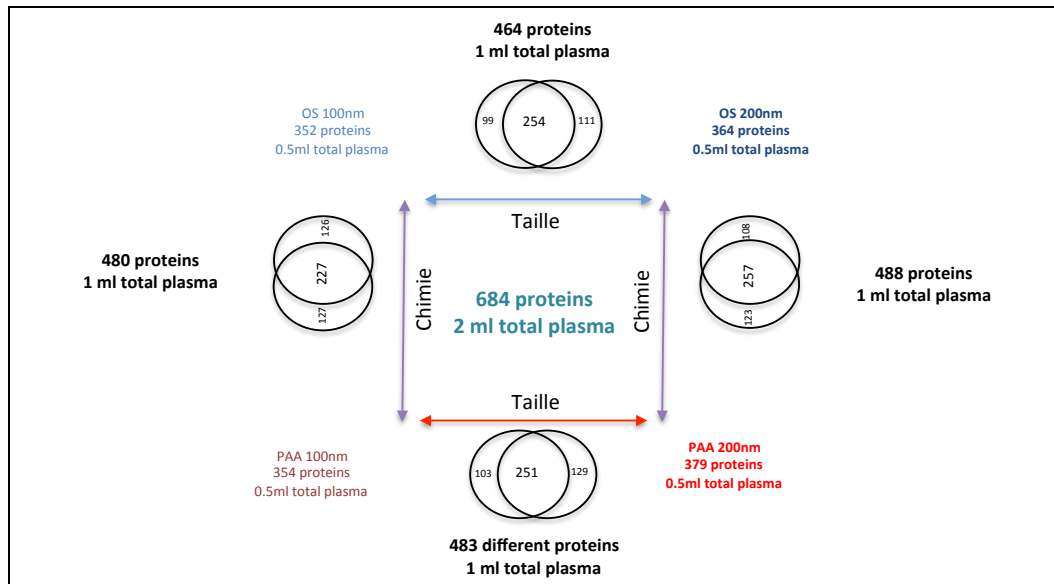


Figure 28: Diagramme de Venn schématisant le nombre de protéines différentes et similaires entre les échantillons.

Ainsi, en combinant 2 types différents de NPs, nous avons pu identifier jusqu'à 488 protéines à partir d'un ml de plasma. En regroupant toutes les protéines différentes identifiées dans les 4 échantillons, l'utilisation de NPs a mis en évidence une liste de 684 protéines différentes, à partir d'un volume total de plasma de 2 ml ; 90 % des 183 protéines identifiées dans le plasma brut sont retrouvées dans cette liste. Ces résultats devront être confirmés par des réplicats ; ils mettraient ainsi en évidence la complémentarité de capture des NPs, et l'intérêt de combiner différentes surfaces nanoparticulaires afin d'identifier des sous protéomes plasmatiques. Cette approche pourrait être utilisée en vue d'identifier des marqueurs moléculaires pathologiques circulant dans le sang.

IV. Vers l'utilisation *in vivo* de NPs pour la capture de protéines dans le sang.

1. Introduction générale

A l'instar de l'analyse post-mortem du tissu cérébral, l'analyse *ex vivo* du plasma est confrontée à la dégradation protéique et à la libération de facteurs solubles par les cellules du sang, lesquelles ont lieu entre le prélèvement et la conservation de l'échantillon à -80°C (Ayache, Panelli et al. 2006). Durant ce laps de temps (en moyenne 1 à 2 h), principalement lié à la distance entre le lieu de prélèvement et celui de traitement de l'échantillon, les protéines du sang sont sujettes à une dégradation, due à l'activité des différentes protéases endogènes présentes. En plus de la dégradation protéique, la libération d'interleukines ou de facteurs de croissance par les monocytes, les lymphocytes ou les plaquettes va aussi modifier le contenu moléculaire du plasma (Boyanton and Blick 2002). Une étude menée par Ayache *et al.* (Ayache, Panelli et al. 2006) a démontré l'augmentation de 37 facteurs solubles dans des échantillons sanguins restés 2 h à température ambiante. Ces phénomènes vont considérablement biaiser l'analyse qualitative et quantitative des protéines contenues dans l'échantillon, compromettant sérieusement l'identification de marqueurs moléculaires fiables. Si la dégradation protéique peut être en partie contrôlée par des inhibiteurs de protéases (endogènes et exogènes), la libération de facteurs solubles dans le plasma ne peut être évitée que par la centrifugation immédiate de l'échantillon afin de séparer le plasma des autres constituants sanguins : cette solution reste peu envisageable en routine clinique. Une autre solution pour s'affranchir des limites actuelles de l'analyse *ex vivo* serait le développement d'une stratégie permettant la capture des protéines plasmatiques *in vivo* à l'aide de NPs adaptées, injectées dans la circulation sanguine. Avec l'émergence des nanotechnologies ces dernières années, l'utilisation de NPs *in vivo* pour l'imagerie optique ou à résonance magnétique (Lee, Huh et al. 2007), (Yoo, Lee et al. 2011), la délivrance ciblée de médicaments (Gradishar, Tjulandin et al. 2005) ou encore des approches de thérapie par hyperthermie (Thiesen and Jordan 2008) est en enjeu majeur en théranostique, notamment dans les cancers (Ma, Zhao et al. 2011), (Xie, Huang et al. 2009). Cependant très peu de

groupes s'intéressent à leur utilisation *in vivo* pour la capture de marqueurs moléculaires. La possibilité pour ces NPs d'avoir accès à la totalité du volume sanguin et de circuler à proximité des microenvironnements pathologiques est une opportunité unique de concentrer des marqueurs moléculaires à leur surface. Cependant une telle approche requiert

- la biocompatibilité de ces NPs afin d'éviter une toxicité potentiellement dangereuse, et leur élimination rapide de la circulation par le système immunitaire (Dobrovolskaia, Aggarwal et al. 2008), (Fischer and Chan 2007)

- un système de recapture des NPs afin d'analyser les protéines présentes à leur surface.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai initié un projet tentant de répondre à ces deux conditions. Une collaboration avec le CEA-LETI et avec l'Institut Louis Néel a permis le dépôt de deux brevets (cf annexe) décrivant notre stratégie.

2. L'encapsulation des NPs dans un biopolymère d'alginate.

1) Introduction

Brièvement, afin d'éviter une réaction immunitaire mais aussi une toxicité potentielle suite à l'injection *in vivo* de NPs magnétiques et chimiquement modifiées (Fischer and Chan 2007), nous avons opté pour l'encapsulation des NPs dans un polymère biocompatible : l'alginate.

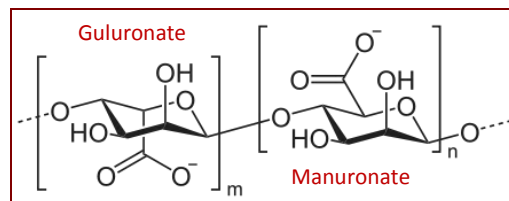


Figure 29: Structure chimique de l'alginate.

L'alginate fait partie de la famille des polysaccharides ; c'est un biopolymère naturel provenant des algues brunes, très utilisé dans les applications médicales. Il se compose de chaînes linéaires polysaccharidiques dont les 2 monomères sont l'acide β -D mannuronique et l'acide α -L guluronique (Figure 29). Les propriétés physico-chimiques de l'alginate dépendent de la proportion et de la distribution de ces monomères (Wee and Gombotz 1998).

En présence d'ions divalents comme le calcium, l'alginate va former un gel ; les chaînes polysaccharidiques vont s'associer autour des ions calcium, entraînant ainsi une réticulation et la formation d'un réseau tridimensionnel nanoporeux, imperméable aux cellules du système immunitaire et aux immunoglobulines (Figure 30) (Kulseng, Thu et al. 1997). Ce réseau peut facilement être renversé par l'utilisation de chélateurs du calcium, lesquels vont entraîner la dépolymérisation du gel.

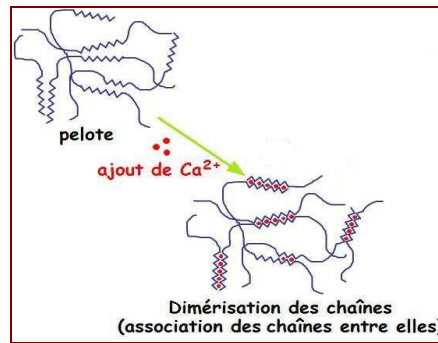


Figure 30: Principe de la gélification.

Jusqu'à présent, l'alginate a principalement été utilisé comme système de délivrance de médicaments ou dans les xenogreffes pour éviter le rejet immunologique par l'organe hôte (Tonnesen and Karlsen 2002), (Dufrane, Goebbels et al. 2006).

Nous sommes les premiers à proposer l'utilisation de NPs encapsulées dans l'alginate afin de recueillir une information moléculaire *in vivo*. Nous avons déposé un brevet en collaboration avec le CEA-Leti décrivant cette approche. Cependant l'encapsulation des NPs, afin de les rendre indétectables par le système immunitaire, ne doit en aucun cas altérer leur capacité de capture protéique. Afin de le vérifier, nous avons incubé des capsules d'alginate contenant des NPs, avec du plasma et réalisé l'analyse des protéines présentes à la surface des NPs, après dépolymérisation des capsules. Nous avons comparé les résultats avec ceux obtenus sur des NPs non encapsulées.

2) Matériels et Méthodes :

a. Nanoparticules et Alginate

Des NPs fluidMAG-OS de 100 nm de diamètre ont été utilisées. Leurs caractéristiques plus détaillées sont disponibles en annexe.

L'alginate PRONOVA SLG100 provient de chez Novamatrix. Il s'agit d'alginate de sodium, stérile, dont le ratio en composé acide Guluronique/Mannuronique est de 1,5. Un tampon de chlorure de calcium à 100 mM est utilisé pour la polymérisation de l'alginate tandis que du citrate de sodium à 0,3 M est utilisé pour le dépolymériser. Plus de détails sont disponibles en annexe.

b. Encapsulation des NP dans l'alginate

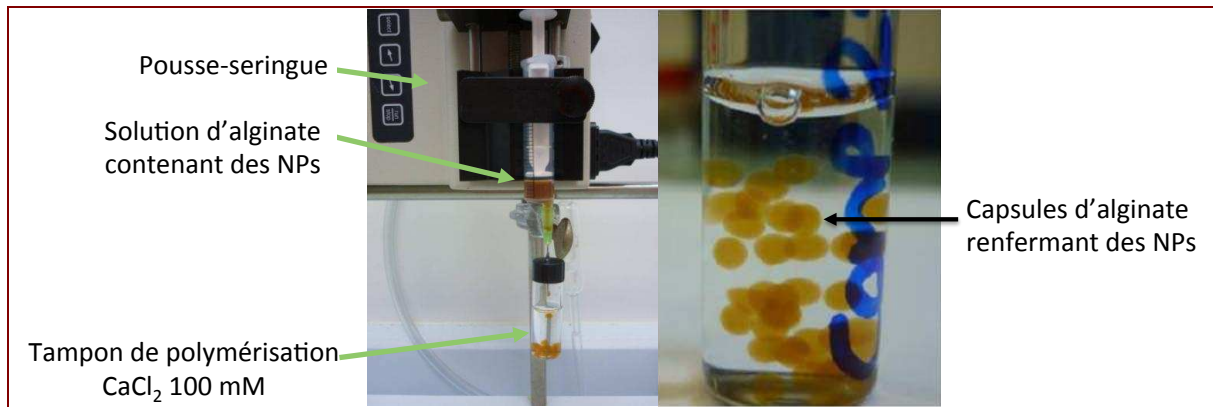


Figure 31: Photo du dispositif (gauche) permettant la production de capsules d'alginate contenant des NPs (droite).

Par chute de gouttes dans le tampon de polymérisation (CaCl₂ 100mM), à l'aide d'un pousse seringue, des capsules d'environ 2 mm de diamètre sont formées à partir d'une solution aqueuse contenant 1,5 % m/v d'alginate et 10 % v/v de NP-OS. Les capsules formées et renfermant les NPs sont laissées 48h dans le tampon de polymérisation afin que la polymérisation soit complète (Figure 31)

c. Incubation des NPs encapsulées avec le plasma

500 µl de plasma ont été incubés avec 500 µg de NPs, encapsulées. Les capsules ont ensuite été lavées 3 fois au PBS puis incubées pendant 15 min sous agitation avec 150 µl de citrate de sodium 0,3 M afin de dépolymériser l'alginate. Une fois libérées de l'alginate, les NPs ont été lavées 2 fois au PBS et une fois à l'eau. Les protéines à leur surface ont été éluées dans un tampon acétonitrile / TFA 1% (50% / 20%). Pour comparaison, des NPs non encapsulées ont été incubées en parallèle avec 500 µl de plasma. La concentration en protéines des éluats a été déterminée par la technique de Bradford.

d. Analyse SDS PAGE des protéines plasmatiques captées par les NPs

10 µg de protéines éluées respectivement des NPs non encapsulées et des NPs encapsulées, ont été repris dans du tampon Laemli (4% SDS, 20 % glycerol, 10 % 2-mercaptoéthanol, 0,004 % bleu de bromophenol, 0,125 M Tris HCl), chauffés et chargés sur un gel de polyacrylamide pour une séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie et décoloré à l'éthanol 30 % / acide acétique 7 %.

e. Analyse par spectrométrie de masse des protéines captées par les NPs.

Afin d'avoir un profil protéique des bas poids moléculaires (inférieur à 10 KDa) 0,5 µg de protéines de chaque éluat ont été repris dans de la matrice CHCA, déposé sur une cible maldi et analysé sur un spectromètre de masse type MALDI-TOF (Microflex, Bruker, Germany). Chaque spectre a été acquis en mode linéaire grâce au logiciel FlexControl, puis analysé sur FlexAnalysis (Bruker, Germany).

3) Résultats préliminaires

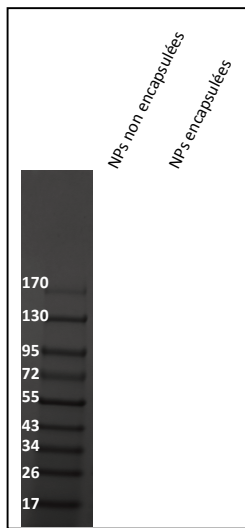


Figure 32: Profils SDS-PAGE des protéines éluées de NPs non encapsulées ou encapsulées

Ces résultats sont préliminaires et les interprétations faites ici devront être confirmées.

Le dosage protéique, par la méthode de Bradford, de l'éluat des NPs encapsulées dans l'alginate a révélé une concentration de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Le dosage des mêmes NPs non encapsulées a révélé une concentration protéique 4 fois plus élevée, autour de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Ce premier résultat démontre que l'encapsulation des NPs modifie leur comportement de capture protéique. Afin de mieux comprendre cette première différence, nous avons réalisé l'analyse SDS-PAGE des protéines éluées

des NPs encapsulées et non encapsulées (Figure 32). L'observation des profils protéiques révèle la diminution de la proportion d'albumine dans les 2 échantillons. En effet, nous pouvons noter l'absence d'une bande majoritaire à 66 KDa qui correspond à la masse moléculaire de l'albumine. Cette observation avait déjà été faite dans les résultats

précédents concernant l'analyse protéomique du plasma sur les NPs non encapsulées. Ici, on démontre que l'encapsulation n'altère pas la capacité des NPs à réduire la concentration d'albumine à leur surface. Cependant, on peut noter une certaine différence entre ces 2 profils protéiques : en effet, alors que le profil des NPs non-encapsulées révèlent des bandes au delà de 170 KDa, la dernière bande visible sur le profil des NPs encapsulées se situe autour de 130 KDa. Ce résultat confirme que le réseau nanoporeux tridimensionnel d'alginate forme un filtre de masse qui empêche les « grosses » protéines de pénétrer dans la capsule et de se fixer sur les NPs. En empêchant les grosses protéines de rentrer, le réseau d'alginate offrirait ainsi la possibilité à d'autres protéines de plus petites masses de se fixer à la surface des NPs. Afin de confirmer cette supposition, nous avons analysé le profil protéique de nos échantillons à des masses inférieures à 10 KDa, par MALDI-TOF-MS.

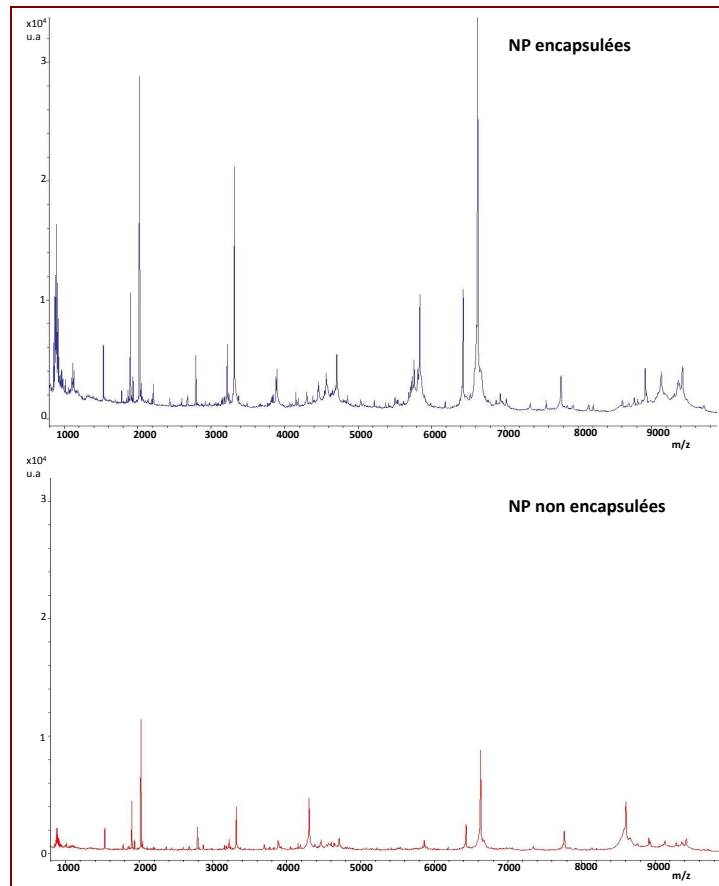


Figure 33: Profil MALDI des protéines de bas poids moléculaire captées par les NPs encapsulées (spectre du haut) et non encapsulées (spectre du bas).

La figure 33 met clairement en évidence un enrichissement qualitatif et quantitatif des pics détectés sur le spectre protéique des NPs encapsulées, pour un intervalle de masse de 1 à 10 KDa. En effet, pour une même quantité de protéines déposée sur les spots MALDI, le nombre de pics détectés et leur intensité sont supérieurs pour les NPs encapsulées. Ce résultat révèle ainsi que l'encapsulation des NPs augmente la concentration de protéines de bas poids moléculaires à leur surface.

En résumé, l'encapsulation des NPs dans un réseau d'alginate va considérablement modifier les capacités de capture protéique des NPs. En effet, le réseau nanoporeux, créé par la réticulation de l'alginate, empêche les protéines supérieures à 130 KDa de pénétrer dans les capsules. Aussi, pour un même plasma, les NPs à l'intérieur des capsules vont se retrouver dans un environnement protéique différent de celui où se trouvent des NPs non encapsulées ; ce qui explique un comportement différent. Bien que les NPs encapsulées se comportent différemment des NPs « nues », elles ont conservé la capacité à réduire à leur

surface la concentration d'albumine et semblent efficaces dans la capture des bas poids moléculaires. Ce dernier paramètre renforce l'intérêt de les utiliser *in vivo* dans le sang pour la capture de marqueurs moléculaires provenant du tissu, et qui sont souvent décrits comme des protéines de bas poids moléculaires (Liotta, Ferrari et al. 2003). Enfin, bien que développées pour une potentielle utilisation *in vivo*, les propriétés des NPs encapsulées peuvent aussi servir à l'analyse protéomique *ex vivo* des fluides biologiques. A l'instar de la complémentarité offerte par les différentes chimies greffées à la surface des NPs, l'encapsulation offrirait aussi l'accès à d'autres sous protéomes plasmatiques.

Il faut cependant confirmer ces résultats sur un plus grand nombre d'échantillons mais aussi identifier par nano-lc-ms/ms les protéines captées par ces NPs encapsulées afin de mieux évaluer leurs différences par rapport aux NPs nues.

3. Développement de micro-aimants implantables pour la recapture de NPs dans la circulation sanguine.

1) Introduction

Une condition indispensable à l'utilisation de NPs pour la recherche de biomarqueurs *in vivo* est le développement d'un système de recapture d'une partie des NPs injectées afin d'analyser leur contenu protéique. En collaboration avec l'institut Louis Néel à Grenoble, nous avons tiré profit des propriétés magnétiques des NPs pour développer des micro-aimants implantables et capables d'attirer des NPs faiblement concentrées dans le sang. Cette collaboration a fait l'objet d'un brevet joint en annexe. A l'heure actuelle, les micro-dispositifs principalement développés pour le contrôle et/ou la manipulation de particules magnétiques utilisent des micro-bobines ou des matériaux doux respectivement couplés à un courant ou à un champ magnétique externe. Dans les deux cas, ces micro-dispositifs ne sont pas autonomes et requièrent une alimentation externe qui compliquerait leur implantation *in vivo*. En collaboration avec l'Institut Néel, nous avons développé des micro-aimants biocompatibles et totalement autonomes. Ces aimants présentent une surface magnétiquement structurée dont le procédé de fabrication est détaillé dans le brevet en annexe. Ils possèdent de remarquables propriétés magnétiques (Dempsey, Walther et al. 2007) proches de celles des meilleurs aimants macroscopiques du marché.

2) Résultats préliminaires

Nous avons entrepris des expériences *ex vivo* afin d'évaluer les capacités de ces micro-aimants à capter des NPs présentes dans du sang en circulation. Pour cela, nous avons mimé une circulation sanguine à l'aide d'un circuit de tubulures connecté à une pompe péristaltique (Figure 34). Dans un bécher contenant un volume total de 200 ml de sang EDTA provenant de donneurs sains du CHU de Grenoble, nous avons injecté 20 μ l d'une solution de NPs fluidMAG-OS de 100 nm, soit un rapport volume sang / volume solution NPs égal à 10 000. Dix minutes après avoir démarré la pompe péristaltique (à un débit de 40 ml/ min), un micro-aimant disposé sur une tige en inox a été introduit dans la circulation sanguine

(Figure 34 droite) pendant 5 minutes. Le micro-aimant a ensuite été retiré, rincé au PBS et observé au microscope optique.

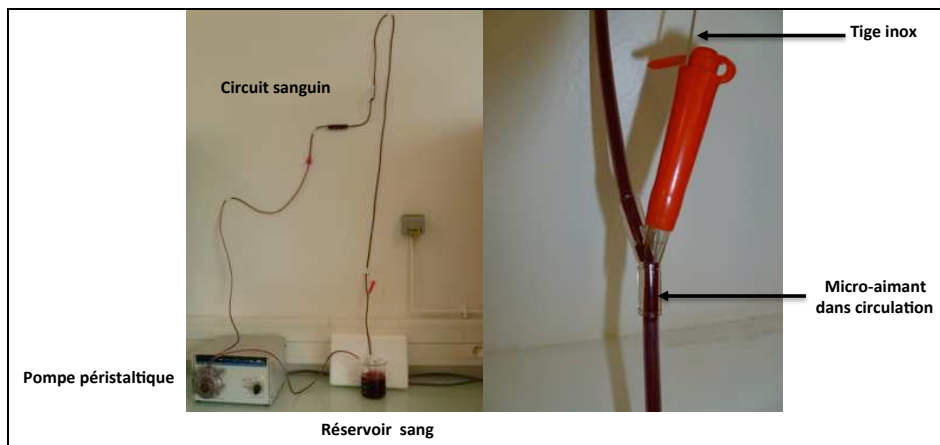


Figure 34: Photo du dispositif mimant la circulation (gauche) et site d'introduction du micro-aimant (droite)

Le micro-aimant utilisé contenait des pièges magnétiques sous forme de bandes transversales plus ou moins espacées. L'utilisation d'un masque permet de les localiser avant l'introduction de l'aimant dans la circulation (Figure 35 A). Afin de valider l'efficacité et la spécificité de capture de notre micro-aimant, l'observation au microscope optique de ce dernier, après son introduction dans le circuit sanguin, et sans utiliser de masque doit faire apparaître ces mêmes bandes transversales. En effet, cette observation signifierait que des NPs se sont déposées spécifiquement à l'endroit où sont présents les pièges magnétiques. La figure 35B correspond à l'observation du micro-aimant au microscope optique après la capture de NPs. La similarité avec la figure 35A confirme la capture de NPs suivant le profil magnétique présent sur le substrat. Ces résultats démontrent notre capacité à récupérer des NPs en très faible concentration dans une circulation sanguine.

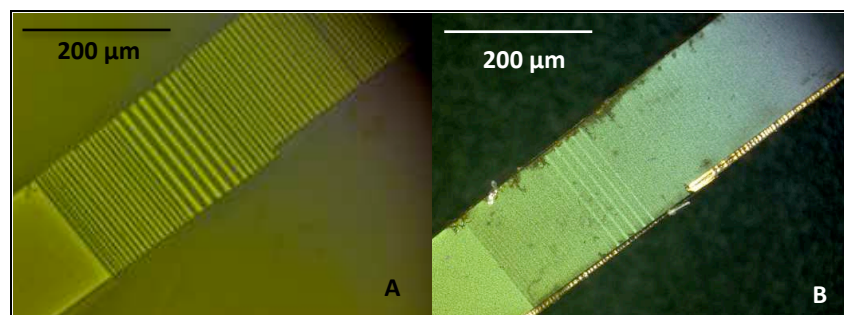


Figure 35 : (A) Localisation des pièges magnétiques avant la capture de NPs via l'utilisation d'un masque. (B) Observation de ce même aimant sans masque après la capture de NPs.

L'intérêt majeur de récupérer ces NPs injectées dans la circulation est d'obtenir un profil protéique *in vivo* du plasma sanguin. Néanmoins afin d'en tirer une information pertinente, la quantité de protéines disponible, laquelle dépend du nombre de NPs récupérées par les micro-aimants, doit être suffisante pour une analyse par spectrométrie de masse. Après avoir développé des micro-aimants contenant un maximum de pièges magnétiques sur un substrat de 20 mm de longueur et à 0,6 mm de largeur, nous avons souhaité connaître le nombre de NPs récupérées par ce type de micro-aimant. En collaboration avec le Dr Pascal Fries du CEA de Grenoble, nous avons débuté des expériences en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) haut champ afin de répondre à cette question. Brièvement, l'objectif était de mesurer le temps de relaxation T1 rho d'une solution aqueuse contenant des NPs avant et après l'immersion d'un micro-aimant dans cette solution. En effet, la variation du temps de relaxation T1 rho est inversement proportionnelle à celle de la concentration en NPs dans la solution. Notre première expérience réalisée dans une solution aqueuse fortement concentrée en NPs a mis en évidence une saturation de l'aimant après avoir capté $2,5 \cdot 10^{11}$ particules. En nous basant sur la quantité de protéines plasmatiques éluées des NPs dans les expériences *ex vivo*, $2,5 \cdot 10^{11}$ particules captent environ 5 µg de protéines ; une quantité compatible avec une approche nano-LC-MS/MS. En résumé nous disposons de micro-aimants, capables de récupérer des NPs faiblement concentrées dans un large volume de sang en circulation, et avec une capacité de capture de NPs suffisante pour l'analyse en spectrométrie de masse des protéines présentes à la surface de ces dernières. Ces résultats sont très préliminaires ; ils sont tout de même très prometteurs. Leur confirmation permettrait l'initiation d'un projet *in vivo* unique à ce jour, visant à l'obtention du premier profil protéique sanguin sans réaliser de prise de sang.

Conclusion générale.

I. Développement d'une stratégie pour l'analyse protéomique du cerveau *in vivo*.

L'identification des mécanismes moléculaires à l'origine de la dégénérescence dans la MP passe nécessairement par l'analyse du tissu pathologique, et constitue un enjeu majeur au développement de thérapies curatives. Avec la validation de techniques d'identification et de quantification en spectrométrie de masse, il est aujourd'hui possible de comparer simultanément l'expression de centaines de protéines différentes dans les régions cérébrales affectées par une pathologie. Dans la MP, la difficulté à accéder au tissu cérébral *in vivo* limite actuellement l'analyse protéomique au tissu post-mortem, trop souvent représentatif d'un stade très avancé de la maladie et potentiellement altéré par différents facteurs pré et post-mortem. Dans ce contexte, les quelques études de protéomique publiées jusqu'à présent ont mis en évidence des différences d'expression de protéines associées au stress oxydatif, à la fonction mitochondriale et au système protéasomal, sans pour autant réussir à distinguer la cause précoce, des conséquences moléculaires tardives de la neurodégénérescence. De plus, les contradictions observées inter-études (Basso, Giraudo et al. 2004), (Werner, Heyny-von Haussen et al. 2008), (Licker, Cote et al. 2012), probablement liées au délai post-mortem de prélèvement du tissu cérébral soulignent les biais potentiellement introduits par ce type d'approche. C'est pourquoi il nous semblait indispensable d'analyser le tissu pathologique *in vivo* et à un stade moins avancé de la maladie. La stimulation cérébrale profonde, proposée comme traitement symptomatique de la MP est une opportunité unique d'accéder au cerveau parkinsonien dans ces conditions. Cette procédure neurochirurgicale de plusieurs heures qui consiste à implanter une électrode de stimulation dans le STN est aujourd'hui appliquée à d'autres pathologies et/ou à d'autres régions cérébrales. Elle constitue un contexte idéal à l'exploration du cerveau, que les électrophysiologistes ont su exploiter pour étudier l'activité électrique neuronale dans différentes pathologies cérébrales (Piallat, Polosan et al. 2011), (Sanghera, Grossman et al. 2003).

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons aussi exploité cet accès temporaire au cerveau parkinsonien pour obtenir une information moléculaire du STN chez

le patient *in vivo*. Sans ajouter le moindre geste à la procédure chirurgicale et à partir d'un stylet de guidage habituellement utilisé en fin d'opération, et dont l'extrémité entre en contact avec le STN, nous avons pu extraire des micro-fragments tissulaires dont l'analyse protéomique par nano-LC-MS/MS a permis l'identification de 1353 protéines différentes. Cette approche est unique à ce jour et ouvre la voie à la mise en place d'une banque d'empreinte moléculaire pour tous les noyaux et toutes les pathologies pour lesquels la stimulation cérébrale électrique est appliquée en clinique. Elle laisse aussi envisager la possibilité de réaliser des empreintes dans la SNc dégénérée dans la MP et accessible sur la même trajectoire, en aval du STN. L'analyse protéomique de ces empreintes moléculaires viendrait ainsi compléter les résultats obtenus sur le tissu post-mortem, qui demeure la référence en neuroprotéomique dans la MP.

Une critique possible de cette approche *in vivo* réside dans l'origine des micro-fragments tissulaires récupérés. En effet, il n'est pas exclu que du tissu, provenant des différents noyaux situés sur la trajectoire en amont du site d'implantation, se retrouve dans le tube guide à l'intérieur duquel est introduit le stylet de guidage. L'extrémité du stylet serait ainsi contaminée par le tissu d'autres noyaux que celui ciblé et les résultats de l'analyse protéomique résultante seraient difficilement interprétables.

Afin d'assurer une capture spécifique du noyau ciblé, nous avons développé et breveté avec le CEA-LETI un nouvel outil d'empreinte adapté au tissu cérébral. Basé sur la technologie du silicium microstructuré et fonctionnalisé chimiquement, l'outil dispose de caractéristiques qui garantissent l'obtention d'une information spécifique de la région d'intérêt, par une exposition contrôlée de la surface de capture. La capture tissulaire sur puce permet aussi de conserver l'anatomie des noyaux ciblés. Dans une étude réalisée chez le primate sain, nous avons validé les capacités de notre outil à fournir une information moléculaire représentative des noyaux ciblés, à travers la réalisation de plusieurs empreintes à différents temps, dans le même noyau, et chez le même animal, sans engendrer de lésions fonctionnelles. Une telle approche présente un intérêt certain dans des études précliniques chez l'animal, visant à décrypter la chronologie d'évènements moléculaires associés à un processus dégénératif progressif, comme celui observé chez le primate exposé de manière chronique à de faibles doses de MPTP (Bezard, Imbert et al. 1997).

En parallèle de notre étude, et afin de valider l'utilisation en clinique de notre outil, la toxicité du silicium pour le tissu cérébral a été évaluée. Les résultats obtenus jusqu'à présent

laissent entrevoir la validation prochaine de notre outil chez l'humain. Son utilisation présenterait un intérêt dans toutes les pathologies cérébrales nécessitant une intervention neurochirurgicale, permettant ainsi d'établir une banque d'empreinte tissulaire sur puce. Bien entendu, l'utilisation de notre outil, en lieu et place du stylet chirurgical dans la SNc de patients parkinsoniens, aurait un intérêt majeur pour la compréhension de l'étiologie moléculaire de la neurodégénérescence dopaminergique. La réalisation d'empreintes tissulaires contrôles, dans la SNc non dégénérée de patients atteints de TOC ou d'épilepsie et opérés pour l'implantation d'électrode dans le STN permettrait, via des approches de protéomique quantitative, d'identifier les protéines dont l'expression est spécifiquement modifiée dans la MP. Des études fonctionnelles sur ces protéines candidates et l'utilisation d'agents pharmacologiques ciblant les mécanismes moléculaires dans lesquels elles sont impliquées permettraient d'évaluer le rôle de ces mécanismes dans le processus dégénératif et orienterait le développement de nouvelles thérapies curatives.

II. Développement d'une stratégie pour l'analyse protéomique des fluides biologiques en clinique.

Un autre enjeu majeur de la MP réside dans l'identification de marqueurs moléculaires diagnostiques dans les fluides biologiques. Actuellement, le diagnostic de la MP repose essentiellement sur l'examen clinique des symptômes moteurs. Il se révèle erroné dans 10 à 25 % des cas en raison de la similarité des symptômes de la MP avec d'autres pathologies, mais aussi tardif puisque les premiers symptômes moteurs n'apparaissent qu'après la dégénérescence d'au moins 60 % des neurones dopaminergiques de la SNc.

L'analyse protéomique des fluides biologiques, notamment du LCR qui reflète l'état physiopathologique du cerveau, est une opportunité d'identifier en périphérie, des protéines dont l'expression serait spécifiquement modifiée dans la MP. Cependant, en raison de la présence majoritaire de l'albumine et d'une gamme de concentration de 8 ordres de grandeur dans le LCR, l'accès au protéome minoritaire, au sein duquel se trouveraient de potentiels marqueurs moléculaires, requiert de longues étapes de fractionnement, efficaces mais incompatibles avec des études cliniques sur un grand nombre d'échantillons individuels. Un compromis entre l'intensité et la durée du fractionnement, et

le nombre d'échantillons analysés doit être trouvé afin d'obtenir une information protéomique pertinente sur un nombre d'échantillons statistiquement significatif.

Pour répondre aux besoins de la protéomique clinique, nous avons développé une stratégie de fractionnement sur NPs magnétiques modifiées chimiquement. Le traitement de faibles volumes de LCR avec ces NPs a considérablement diminué la proportion d'albumine dans l'échantillon, et révélé un enrichissement considérable des profils protéiques obtenus en MS. Ce fractionnement par NPs a permis d'augmenter de 160 % le nombre de protéines identifiées par nano-LC-MS/MS, et la quantification relative sans marquage des protéines dans les répliques a permis de confirmer la reproductibilité de capture des NPs. Nous disposons donc d'une stratégie de fractionnement rapide, efficace et reproductible pour le traitement du LCR. Nous mettons actuellement au point une plateforme automatisée permettant de traiter sur plaque, 96 échantillons simultanément. En réduisant considérablement l'étape de fractionnement, nous pourrions ainsi envisager des études de profilage quantitatif via des approches sans marquage, sur un grand nombre d'échantillon afin d'identifier des marqueurs diagnostiques dans le LCR de patients parkinsoniens.

Afin d'étendre le champ d'application des NPs, nous avons aussi démontré l'intérêt de leur utilisation pour l'analyse protéomique du GR et du plasma. Ces résultats ouvrent la voie à la recherche de marqueurs diagnostiques de la MP dans ce type d'échantillons. Ils ouvrent aussi la voie à l'utilisation de notre stratégie en amont de toute analyse protéomique sur les fluides biologiques, peu importe la pathologie étudiée. Enfin, nous travaillons aussi sur une stratégie visant à utiliser ces NPs *in vivo*, dans le sang pour la capture directe de protéines. Pour cela, nous avons initié une stratégie d'encapsulation des NPs dans un polymère biocompatible et développons actuellement, en collaboration avec l'Institut Louis Néel, des micro-aimants implantables dans les vaisseaux sanguins, et capables de récupérer des NPs faiblement concentrées dans le sang.

Références

- Aarsland, D., E. Tandberg, et al. (1996). "Frequency of dementia in Parkinson disease." Arch Neurol **53**(6): 538-542.
- Abdi, F., J. F. Quinn, et al. (2006). "Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders." J Alzheimers Dis **9**(3): 293-348.
- Abraham, S., C. C. Soundararajan, et al. (2005). "Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease." Indian J Med Res **121**(2): 111-115.
- Aebersold, R. and M. Mann (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." Nature **422**(6928): 198-207.
- Ahn, S. M. and R. J. Simpson (2007). "Body fluid proteomics: Prospects for biomarker discovery." Proteomics Clin Appl **1**(9): 1004-1015.
- Albrethsen, J. (2007). "Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry." Clin Chem **53**(5): 852-858.
- Anderson, N. L. and N. G. Anderson (2002). "The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects." Mol Cell Proteomics **1**(11): 845-867.
- Ansari, K. A. and A. Johnson (1975). "Olfactory function in patients with Parkinson's disease." J Chronic Dis **28**(9): 493-497.
- Antman, E. M., M. J. Tanasijevic, et al. (1996). "Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes." N Engl J Med **335**(18): 1342-1349.
- Ayache, S., M. Panelli, et al. (2006). "Effects of storage time and exogenous protease inhibitors on plasma protein levels." Am J Clin Pathol **126**(2): 174-184.
- Barbour, R., K. Kling, et al. (2008). "Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood." Neurodegener Dis **5**(2): 55-59.
- Basso, M., S. Giraud, et al. (2004). "Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease." Proteomics **4**(12): 3943-3952.
- Baumann, S., U. Ceglarek, et al. (2005). "Standardized approach to proteome profiling of human serum based on magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." Clin Chem **51**(6): 973-980.
- Benabid, A. L. (2003). "Deep brain stimulation for Parkinson's disease." Curr Opin Neurobiol **13**(6): 696-706.
- Benabid, A. L., S. Chabardes, et al. (2009). "Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease." Lancet Neurology **8**(1): 67-81.
- Benabid, A. L., P. Pollak, et al. (1993). "Chronic VIM thalamic stimulation in Parkinson's disease, essential tremor and extra-pyramidal dyskinesias." Acta Neurochir Suppl (Wien) **58**: 39-44.
- Bezard, E., C. Imbert, et al. (1997). "A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the monkey." Brain Res **766**(1-2): 107-112.
- Bjorhall, K., T. Miliotis, et al. (2005). "Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples." Proteomics **5**(1): 307-317.
- Blandini, F., G. Nappi, et al. (2000). "Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease." Prog Neurobiol **62**(1): 63-88.
- Boyanton, B. L., Jr. and K. E. Blick (2002). "Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum." Clin Chem **48**(12): 2242-2247.
- Brooks, D. J. (2004). "Neuroimaging in Parkinson's disease." NeuroRx **1**(2): 243-254.

- Brown, P. (2003). "Oscillatory nature of human basal ganglia activity: relationship to the pathophysiology of Parkinson's disease." *Mov Disord* **18**(4): 357-363.
- Calne, D. B., B. J. Snow, et al. (1992). "Criteria for diagnosing Parkinson's disease." *Ann Neurol* **32 Suppl**: S125-127.
- Cappiello, A., G. Famiglini, et al. (2005). "Liquid chromatography-electron ionization mass spectrometry: fields of application and evaluation of the performance of a Direct-EI interface." *Mass Spectrom Rev* **24**(6): 978-989.
- Castagna, A., D. Cecconi, et al. (2005). "Exploring the hidden human urinary proteome via ligand library beads." *J Proteome Res* **4**(6): 1917-1930.
- Chabardes, S., P. Kahane, et al. (2002). "Deep brain stimulation in epilepsy with particular reference to the subthalamic nucleus." *Epileptic Disord* **4 Suppl 3**: S83-93.
- Constantinescu, R., U. Andreasson, et al. (2010). "Proteomic profiling of cerebrospinal fluid in parkinsonian disorders." *Parkinsonism Relat Disord* **16**(8): 545-549.
- Cottrell, J. S. (1994). "Protein identification by peptide mass fingerprinting." *Pept Res* **7**(3): 115-124.
- Crecelius, A., A. Gotz, et al. (2008). "Assessing quantitative post-mortem changes in the gray matter of the human frontal cortex proteome by 2-D DIGE." *Proteomics* **8**(6): 1276-1291.
- Cummings, J. L. (1992). "Depression and Parkinson's disease: a review." *Am J Psychiatry* **149**(4): 443-454.
- D'Alessandro, A., P. G. Righetti, et al. (2010). "The red blood cell proteome and interactome: an update." *J Proteome Res* **9**(1): 144-163.
- de Lau, L. M. L. and M. M. B. Breteler (2006). "Epidemiology of Parkinson's disease." *Lancet Neurology* **5**(6): 525-535.
- Delaunay, J. (2007). "The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders." *Blood Rev* **21**(1): 1-20.
- Dempsey, N. M., A. Walther, et al. (2007). "High performance hard magnetic NdFeB thick films for integration into micro-electro-mechanical systems." *Applied Physics Letters* **90**(9).
- Dobrovolskaia, M. A., P. Aggarwal, et al. (2008). "Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution." *Mol Pharm* **5**(4): 487-495.
- Dufrane, D., R. M. Goebels, et al. (2006). "Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: proof of concept." *Transplantation* **81**(9): 1345-1353.
- Elbaz, A., J. Clavel, et al. (2009). "Professional exposure to pesticides and Parkinson disease." *Ann Neurol* **66**(4): 494-504.
- Eller, M. and D. R. Williams (2009). "Biological fluid biomarkers in neurodegenerative parkinsonism." *Nat Rev Neurol* **5**(10): 561-570.
- Emborg, M. E. (2007). "Nonhuman primate models of Parkinson's disease." *ILAR J* **48**(4): 339-355.
- Fang, J., T. Nakamura, et al. (2007). "S-nitrosylation of peroxiredoxin 2 promotes oxidative stress-induced neuronal cell death in Parkinson's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(47): 18742-18747.
- Farrer, M. J. (2006). "Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects." *Nat Rev Genet* **7**(4): 306-318.
- Fearnley, J. M. and A. J. Lees (1991). "Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity." *Brain* **114 (Pt 5)**: 2283-2301.

- Fenn, J. B., M. Mann, et al. (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." *Science* **246**(4926): 64-71.
- Fiedler, G. M., S. Baumann, et al. (2007). "Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." *Clin Chem* **53**(3): 421-428.
- Fischer, H. C. and W. C. Chan (2007). "Nanotoxicity: the growing need for in vivo study." *Curr Opin Biotechnol* **18**(6): 565-571.
- Forno, L. S. (1996). "Neuropathology of Parkinson's disease." *J Neuropathol Exp Neurol* **55**(3): 259-272.
- Galvin, J. E., V. M. Lee, et al. (2001). "Synucleinopathies: clinical and pathological implications." *Arch Neurol* **58**(2): 186-190.
- Gelb, D. J., E. Oliver, et al. (1999). "Diagnostic criteria for Parkinson disease." *Arch Neurol* **56**(1): 33-39.
- Georganopoulou, D. G., L. Chang, et al. (2005). "Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(7): 2273-2276.
- Gibb, W. R. and A. J. Lees (1988). "The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **51**(6): 745-752.
- Goh, S. H., M. Josleyn, et al. (2007). "The human reticulocyte transcriptome." *Physiol Genomics* **30**(2): 172-178.
- Goodman, S. R. and K. Shiffer (1983). "The spectrin membrane skeleton of normal and abnormal human erythrocytes: a review." *Am J Physiol* **244**(3): C121-141.
- Gradishar, W. J., S. Tjulandin, et al. (2005). "Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer." *J Clin Oncol* **23**(31): 7794-7803.
- Guerrier, L., P. G. Righetti, et al. (2008). "Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library." *Nat Protoc* **3**(5): 883-890.
- Gygi, S. P., B. Rist, et al. (1999). "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags." *Nat Biotechnol* **17**(10): 994-999.
- Healy, D. G., P. M. Abou-Sleiman, et al. (2004). "Tau gene and Parkinson's disease: a case-control study and meta-analysis." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75**(7): 962-965.
- Holdorff, B. (2002). "Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and his work." *J Hist Neurosci* **11**(1): 19-28.
- Hornykiewicz, O. and S. J. Kish (1987). "Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease." *Parkinson's Disease* **45**: 19-34.
- Hu, Q., R. J. Noll, et al. (2005). "The Orbitrap: a new mass spectrometer." *J Mass Spectrom* **40**(4): 430-443.
- Huang, X., P. C. Chen, et al. (2004). "APOE-[epsilon]2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease." *Neurology* **62**(12): 2198-2202.
- Hughes, A. J., S. E. Daniel, et al. (2002). "The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service." *Brain* **125**(Pt 4): 861-870.
- Hughes, A. J., S. E. Daniel, et al. (1992). "Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **55**(3): 181-184.
- Huhmer, A. F., R. G. Biringer, et al. (2006). "Protein analysis in human cerebrospinal fluid: Physiological aspects, current progress and future challenges." *Dis Markers* **22**(1-2): 3-26.

- Hutchens, T. W. and T. T. Yip (1993). "New Desorption Strategies for the Mass-Spectrometric Analysis of Macromolecules." Rapid Communications in Mass Spectrometry **7**(7): 576-580.
- Hynd, M. R., J. M. Lewohl, et al. (2003). "Biochemical and molecular studies using human autopsy brain tissue." J Neurochem **85**(3): 543-562.
- Iwanaga, K., K. Wakabayashi, et al. (1999). "Lewy body-type degeneration in cardiac plexus in Parkinson's and incidental Lewy body diseases." Neurology **52**(6): 1269-1271.
- James, C., V. Ugo, et al. (2005). "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera." Nature **434**(7037): 1144-1148.
- Jellinger, K. (1990). "New developments in the pathology of Parkinson's disease." Parkinson's Disease **53**: 1-16.
- Jenner, P. (2003). "Oxidative stress in Parkinson's disease." Ann Neurol **53 Suppl 3**: S26-36; discussion S36-28.
- Jenner, P. and C. W. Olanow (1996). "Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease." Neurology **47**(6 Suppl 3): S161-170.
- Jin, J., C. Hulette, et al. (2006). "Proteomic identification of a stress protein, mortalin/mthsp70/GRP75: relevance to Parkinson disease." Mol Cell Proteomics **5**(7): 1193-1204.
- Johanson, C. E., J. A. Duncan, 3rd, et al. (2008). "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease." Cerebrospinal Fluid Res **5**: 10.
- Johnson, C. J., N. Zhukovsky, et al. (2008). "Proteomics, nanotechnology and molecular diagnostics." Proteomics **8**(4): 715-730.
- Kakhniashvili, D. G., L. A. Bulla, Jr., et al. (2004). "The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry." Mol Cell Proteomics **3**(5): 501-509.
- Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." Anal Chem **60**(20): 2299-2301.
- Kebarle, P. (2000). "A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry." J Mass Spectrom **35**(7): 804-817.
- Kish, S. J., K. Shannak, et al. (1988). "Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications." N Engl J Med **318**(14): 876-880.
- Kish, S. J., K. Shannak, et al. (1992). "Aging produces a specific pattern of striatal dopamine loss: implications for the etiology of idiopathic Parkinson's disease." J Neurochem **58**(2): 642-648.
- Kitsou, E., S. Pan, et al. (2008). "Identification of proteins in human substantia nigra." Proteomics Clin Appl **2**(5): 776-782.
- Kulseng, B., B. Thu, et al. (1997). "Alginate polylysine microcapsules as immune barrier: permeability of cytokines and immunoglobulins over the capsule membrane." Cell Transplant **6**(4): 387-394.
- Langston, J. W. (2006). "The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg." Ann Neurol **59**(4): 591-596.
- Langston, J. W., P. Ballard, et al. (1983). "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis." Science **219**(4587): 979-980.
- Laxton, A. W., D. F. Tang-Wai, et al. (2010). "A phase I trial of deep brain stimulation of memory circuits in Alzheimer's disease." Ann Neurol **68**(4): 521-534.
- Lee, J. H., Y. M. Huh, et al. (2007). "Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging." Nat Med **13**(1): 95-99.

- Leverenz, J. B., I. Umar, et al. (2007). "Proteomic identification of novel proteins in cortical lewy bodies." *Brain Pathol* **17**(2): 139-145.
- Licker, V., M. Cote, et al. (2012). "Proteomic profiling of the substantia nigra demonstrates CNDP2 overexpression in Parkinson's disease." *J Proteomics* **75**(15): 4656-4667.
- Liotta, L. A., M. Ferrari, et al. (2003). "Clinical proteomics: written in blood." *Nature* **425**(6961): 905.
- Ma, X., Y. Zhao, et al. (2011). "Theranostic nanoparticles engineered for clinic and pharmaceuticals." *Acc Chem Res* **44**(10): 1114-1122.
- Makarov, A. (2000). "Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis." *Anal Chem* **72**(6): 1156-1162.
- Makarov, A., E. Denisov, et al. (2006). "Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer." *Anal Chem* **78**(7): 2113-2120.
- Mallet, L., M. Polosan, et al. (2008). "Subthalamic nucleus stimulation in severe obsessive-compulsive disorder." *N Engl J Med* **359**(20): 2121-2134.
- Mann, M. and M. Wilm (1994). "Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags." *Anal Chem* **66**(24): 4390-4399.
- Marouga, R., S. David, et al. (2005). "The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology." *Anal Bioanal Chem* **382**(3): 669-678.
- Mizuno, Y., H. Yoshino, et al. (1998). "Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease." *Ann Neurol* **44**(3 Suppl 1): S99-109.
- Montgomery, E. B., Jr. and J. T. Gale (2008). "Mechanisms of action of deep brain stimulation(DBS)." *Neurosci Biobehav Rev* **32**(3): 388-407.
- Moore, D. J., A. B. West, et al. (2005). "Molecular pathophysiology of Parkinson's disease." *Annu Rev Neurosci* **28**: 57-87.
- Morrish, P. K., J. S. Rakshi, et al. (1998). "Measuring the rate of progression and estimating the preclinical period of Parkinson's disease with [18F]dopa PET." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **64**(3): 314-319.
- Mouton-Barbosa, E., F. Roux-Dalvai, et al. (2010). "In-depth exploration of cerebrospinal fluid by combining peptide ligand library treatment and label-free protein quantification." *Mol Cell Proteomics* **9**(5): 1006-1021.
- Nakai, M., M. Fujita, et al. (2007). "Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage." *Biochem Biophys Res Commun* **358**(1): 104-110.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." *J Biol Chem* **250**(10): 4007-4021.
- Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, et al. (2008). "Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease." *Mov Disord* **23** Suppl 3: S548-559.
- Ondo, W., J. Jankovic, et al. (1998). "Unilateral thalamic deep brain stimulation for refractory essential tremor and Parkinson's disease tremor." *Neurology* **51**(4): 1063-1069.
- Ong, S. E., B. Blagoev, et al. (2002). "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics." *Mol Cell Proteomics* **1**(5): 376-386.
- Ong, S. E. and M. Mann (2005). "Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative." *Nat Chem Biol* **1**(5): 252-262.

- Ono, M., M. Shitashige, et al. (2006). "Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry." *Mol Cell Proteomics* **5**(7): 1338-1347.
- Orth, M. and A. H. Schapira (2002). "Mitochondrial involvement in Parkinson's disease." *Neurochem Int* **40**(6): 533-541.
- Pahwa, R., S. Wilkinson, et al. (1997). "High-frequency stimulation of the globus pallidus for the treatment of Parkinson's disease." *Neurology* **49**(1): 249-253.
- Pan, S., D. Zhu, et al. (2007). "A combined dataset of human cerebrospinal fluid proteins identified by multi-dimensional chromatography and tandem mass spectrometry." *Proteomics* **7**(3): 469-473.
- Pappin, D. J., P. Hojrup, et al. (1993). "Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting." *Curr Biol* **3**(6): 327-332.
- Parkinson, J. (2002). "An essay on the shaking palsy. 1817." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **14**(2): 223-236; discussion 222.
- Pasini, E. M., M. Kirkegaard, et al. (2006). "In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells." *Blood* **108**(3): 791-801.
- Perlmutter, J. S. and J. W. Mink (2006). "Deep brain stimulation." *Annu Rev Neurosci* **29**: 229-257.
- Piallat, B., M. Polosan, et al. (2011). "Subthalamic neuronal firing in obsessive-compulsive disorder and Parkinson disease." *Ann Neurol* **69**(5): 793-802.
- Provan, D. and D. Weatherall (2000). "Red cells II: acquired anaemias and polycythaemia." *Lancet* **355**(9211): 1260-1268.
- Ray, S., P. J. Reddy, et al. (2011). "Emerging nanoproteomics approaches for disease biomarker detection: a current perspective." *J Proteomics* **74**(12): 2660-2681.
- Reiber, H. (2001). "Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid." *Clin Chim Acta* **310**(2): 173-186.
- Riederer, P. and S. Wuketich (1976). "Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis." *J Neural Transm* **38**(3-4): 277-301.
- Righetti, P. G. and E. Boschetti (2008). "The ProteoMiner and the FortyNiners: searching for gold nuggets in the proteomic arena." *Mass Spectrom Rev* **27**(6): 596-608.
- Ringrose, J. H., W. W. van Solinge, et al. (2008). "Highly efficient depletion strategy for the two most abundant erythrocyte soluble proteins improves proteome coverage dramatically." *J Proteome Res* **7**(7): 3060-3063.
- Roux-Dalvai, F., A. Gonzalez de Peredo, et al. (2008). "Extensive analysis of the cytoplasmic proteome of human erythrocytes using the peptide ligand library technology and advanced mass spectrometry." *Mol Cell Proteomics* **7**(11): 2254-2269.
- Samii, A., J. G. Nutt, et al. (2004). "Parkinson's disease." *Lancet* **363**(9423): 1783-1793.
- Sanghera, M. K., R. G. Grossman, et al. (2003). "Basal ganglia neuronal discharge in primary and secondary dystonia in patients undergoing pallidotomy." *Neurosurgery* **52**(6): 1358-1370; discussion 1370-1353.
- Schapira, A. H., J. M. Cooper, et al. (1990). "Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease." *J Neurochem* **54**(3): 823-827.
- Schocke, M. F., K. Seppi, et al. (2002). "Diffusion-weighted MRI differentiates the Parkinson variant of multiple system atrophy from PD." *Neurology* **58**(4): 575-580.

- Seibert, V., A. Wiesner, et al. (2004). "Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS) and ProteinChip technology in proteomics research." *Pathol Res Pract* **200**(2): 83-94.
- Sennels, L., M. Salek, et al. (2007). "Proteomic analysis of human blood serum using peptide library beads." *J Proteome Res* **6**(10): 4055-4062.
- Shen, Y., J. Kim, et al. (2005). "Characterization of the human blood plasma proteome." *Proteomics* **5**(15): 4034-4045.
- Sherer, T. B., R. Betarbet, et al. (2002). "Environment, mitochondria, and Parkinson's disease." *Neuroscientist* **8**(3): 192-197.
- Shi, M., J. Bradner, et al. (2011). "Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression." *Ann Neurol* **69**(3): 570-580.
- Shi, M., W. M. Caudle, et al. (2009). "Biomarker discovery in neurodegenerative diseases: a proteomic approach." *Neurobiol Dis* **35**(2): 157-164.
- Shi, M., J. Jin, et al. (2008). "Mortalin: a protein associated with progression of Parkinson disease?" *J Neuropathol Exp Neurol* **67**(2): 117-124.
- Shiba, M., J. H. Bower, et al. (2000). "Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study." *Mov Disord* **15**(4): 669-677.
- Shiio, Y. and R. Aebersold (2006). "Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry." *Nat Protoc* **1**(1): 139-145.
- Singh, N., V. Pillay, et al. (2007). "Advances in the treatment of Parkinson's disease." *Prog Neurobiol* **81**(1): 29-44.
- Spillantini, M. G., R. A. Crowther, et al. (1998). "alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 6469-6473.
- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, et al. (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies." *Nature* **388**(6645): 839-840.
- Stefani, A., A. M. Lozano, et al. (2007). "Bilateral deep brain stimulation of the pedunculopontine and subthalamic nuclei in severe Parkinson's disease." *Brain* **130**(Pt 6): 1596-1607.
- Stempfer, R., M. Kubicek, et al. (2008). "Quantitative assessment of human serum high-abundance protein depletion." *Electrophoresis* **29**(21): 4316-4323.
- Sunderland, T., G. Linker, et al. (2003). "Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease." *JAMA* **289**(16): 2094-2103.
- Thiesen, B. and A. Jordan (2008). "Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia." *Int J Hyperthermia* **24**(6): 467-474.
- Tolosa, E., Y. Compta, et al. (2007). "The premotor phase of Parkinson's disease." *Parkinsonism Relat Disord* **13** Suppl: S2-7.
- Tonnesen, H. H. and J. Karlsen (2002). "Alginate in drug delivery systems." *Drug Dev Ind Pharm* **28**(6): 621-630.
- Towatari, M., H. Iida, et al. (1997). "Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathway in acute leukemia cells." *Leukemia* **11**(4): 479-484.
- Tsanas, A., M. A. Little, et al. (2012). "Novel speech signal processing algorithms for high-accuracy classification of Parkinson's disease." *IEEE Trans Biomed Eng* **59**(5): 1264-1271.
- Ugo, V., C. Marzac, et al. (2004). "Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera." *Exp Hematol* **32**(2): 179-187.

- van Dijk, K. D., H. W. Berendse, et al. (2012). "The proteome of the locus ceruleus in Parkinson's disease: relevance to pathogenesis." *Brain Pathol* **22**(4): 485-498.
- Vidailhet, M., L. Vercueil, et al. (2005). "Bilateral deep-brain stimulation of the globus pallidus in primary generalized dystonia." *N Engl J Med* **352**(5): 459-467.
- Villanueva, J., K. Lawlor, et al. (2006). "Automated serum peptide profiling." *Nat Protoc* **1**(2): 880-891.
- Villanueva, J., J. Philip, et al. (2004). "Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry." *Anal Chem* **76**(6): 1560-1570.
- Wang, G., W. W. Wu, et al. (2006). "Label-free protein quantification using LC-coupled ion trap or FT mass spectrometry: Reproducibility, linearity, and application with complex proteomes." *J Proteome Res* **5**(5): 1214-1223.
- Wang, M. C., L. D. Papsidero, et al. (1981). "Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer." *Prostate* **2**(1): 89-96.
- Weatherall, D. J. and A. B. Provan (2000). "Red cells I: inherited anaemias." *Lancet* **355**(9210): 1169-1175.
- Wee, S. and W. R. Gombotz (1998). "Protein release from alginate matrices." *Adv Drug Deliv Rev* **31**(3): 267-285.
- Werner, C. J., R. Heyny-von Haussen, et al. (2008). "Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease." *Proteome Sci* **6**: 8.
- Wiese, S., K. A. Reidegeld, et al. (2007). "Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research." *Proteomics* **7**(3): 340-350.
- Wilkins, M. R., J. C. Sanchez, et al. (1996). "Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it." *Biotechnol Genet Eng Rev* **13**: 19-50.
- Wolters, E. C., C. Francot, et al. (2000). "Preclinical (premotor) Parkinson's disease." *J Neurol* **247 Suppl 2**: II103-109.
- Wood-Kaczmar, A., S. Gandhi, et al. (2006). "Understanding the molecular causes of Parkinson's disease." *Trends Mol Med* **12**(11): 521-528.
- Xie, J., J. Huang, et al. (2009). "Iron oxide nanoparticle platform for biomedical applications." *Curr Med Chem* **16**(10): 1278-1294.
- Xu, Q., S. E. Simpson, et al. (2003). "Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation." *Blood* **102**(3): 972-980.
- Yates, J. R., 3rd, J. K. Eng, et al. (1995). "Mining genomes: correlating tandem mass spectra of modified and unmodified peptides to sequences in nucleotide databases." *Anal Chem* **67**(18): 3202-3210.
- Yoo, D., J. H. Lee, et al. (2011). "Theranostic magnetic nanoparticles." *Acc Chem Res* **44**(10): 863-874.
- Zerr, I., M. Bodemer, et al. (1998). "Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease." *Ann Neurol* **43**(1): 32-40.
- Zhang, J. (2007). "Proteomics of human cerebrospinal fluid - the good, the bad, and the ugly." *Proteomics Clin Appl* **1**(8): 805-819.
- Zhang, J., C. D. Keene, et al. (2008). "Proteomics of human neurodegenerative diseases." *J Neuropathol Exp Neurol* **67**(10): 923-932.
- Zijlmans, J. C., H. O. Thijssen, et al. (1995). "MRI in patients with suspected vascular parkinsonism." *Neurology* **45**(12): 2183-2188.

Annexe

1. Informations concernant l’outil d’empreinte tissulaire

<https://docs.google.com/folder/d/0B1GhVE-38pVBWEF4aINYMmZxZUE/edit>

2. Fiches techniques des NPs utilisées au cours de ce travail

<https://docs.google.com/folder/d/0B1GhVE-38pVBVTZvVU9hYWIXaEU/edit>

3. Brevet concernant l’encapsulation de NPs dans un polymère biocompatible

<https://docs.google.com/folder/d/0B1GhVE-38pVBTUFDRF82NIMxODg/edit>

4. Brevet concernant le développement de micro-aimants autonomes et implantables

<https://docs.google.com/file/d/0B1GhVE-38pVBRU1wVDBqOUFwczg/edit>