

Dr Delphine DEBAYLE, IPMC CNRS, SOPHIA ANTIPOLIS.

Chimiste de formation, j'ai acquis durant ma thèse des compétences sur l'analyse multi-résidus quantitative de pesticides et d'antibiotiques dans des matrices agroalimentaires. Lors de mon post-doctorat, j'ai pu étoffer mon savoir-faire en étudiant l'analyse des acides-aminés soufrés dans des matrices complexes animales (foie, plasma, urine...). L'ensemble des connaissances acquises m'ont permis de devenir experte en analyse métabolomique. J'ai ensuite été directement recrutée à l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP), en tant qu'Ingénieur de Recherche, afin de mettre en place et développer une plateforme d'analyse métabolomique. Les analyses réalisées à l'IBMP portaient principalement sur la détection, la caractérisation et la quantification de molécules biologiques type flavonoïdes, acide salicylique, herbicides, dérivés de spermidines, susceptibles d'être présentes dans des extraits végétaux (feuille, graine pollen...).

Forte de cette nouvelle expertise, j'ai été recrutée en 2009 à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et cellulaire (IPMC), en tant qu'Ingénieur de Recherche, co-responsable de la plateforme protéomique. Depuis 2016 j'ai également développé au sein de notre plateforme toute l'expertise en analyse métabolomique que nous réalisons maintenant quotidiennement.

La plateforme d'analyse des Biomolécules (PAB) fait partie du réseau CAPABIO regroupant les plateformes d'analyses par spectrométrie de masse et RMN de Nice et Sophia-Antipolis.

La plateforme d'analyse des biomolécules de l'IPMC, savoir-faire et expertise : présentation d'un exemple d'application en analyse lipidomique.

Résumé

La plateforme d'analyse des biomolécules de l'IPMC a une expertise de plus de 15 ans en analyse protéomique et de 5 ans en analyse métabolomique en particulier en analyse lipidomique non ciblée et analyse de métabolites ciblés. Après une courte introduction pour vous présenter les activités principales de la plateforme, je vais vous exposer un projet d'analyse lipidomique que nous avons réalisé sur la plateforme et qui porte sur l'importance de la composition membranaire dans les mécanismes d'infiltration bactérienne.

Mots clés

Spectrométrie de masse Haute Résolution, Analyse lipidomique, CapaBio, Cellules, phospholipides polyinsaturés

Références bibliographiques

- UBTD1 regulates ceramide balance and endolysosomal positioning to coordinate EGFR signaling. Torino S, Tiroille V, Dolfi B, Dufies M, Hinault C, Bonesso L, Dagnino S, Uhler J, Irondelle M, Gay AS, Fleuriot L, Debayle D, Lacas-Gervais S, Cormont M, Bertero T, Bost F, Gilleron J, Clavel S. *Elife*. 2021 Apr 22
- Cansell C, Stobbe K, Sanchez C, Le Thuc O, Mosser CA, Ben-Fradj S, Leredde J, Lebeaupin C, **Debayle D, Fleuriot L**, Brau F, Devaux N, Benani A, Audinat E, Blondeau N, Nahon JL, Rovère C. Dietary fat exacerbates postprandial hypothalamic inflammation involving glial fibrillary acidic protein-positive cells and microglia in male mice. *Glia*. 2020 Jul 13.
- D'Ambrosio JM, Albanèse V, Lipp NF, **Fleuriot L, Debayle D**, Drin G, Čopič A. Osh6 requires Ist2 for localization to ER-PM contacts and efficient phosphatidylserine transport in budding yeast. *J Cell Sci*. 2020 Jun4;133(11).

Liens utiles

[https://www.ipmc.cnrs.fr/cgi-](https://www.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/site.cgi)

[bin/site.cgi](https://www.ipmc.cnrs.fr?page=ressource_caracterisation_P_C)https://www.ipmc.cnrs.fr?page=ressource_caracterisation_P_C



Présentation de la plateforme d'analyse des biomolécules (PAB) :

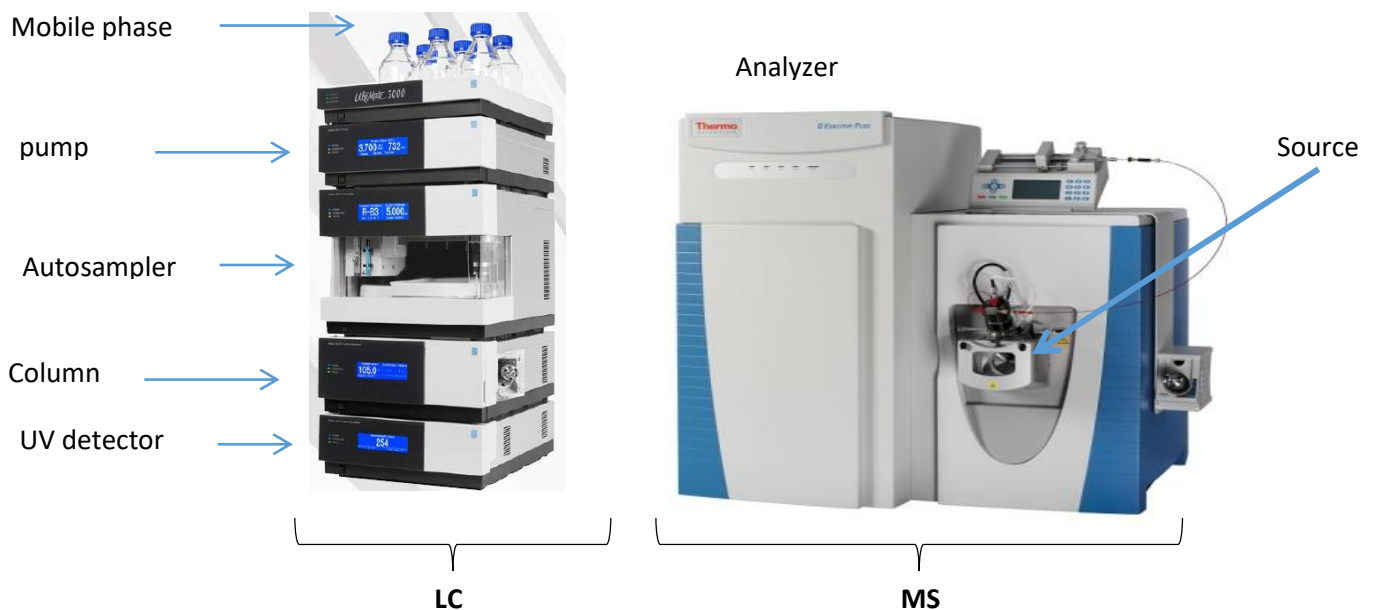
Métabolomique/ Protéomique

La plateforme d'analyse des biomolécules de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire est spécialisée dans l'analyse par spectrométrie de masse des protéines, lipides et métabolites.

La plateforme dispose de différents systèmes de spectrométrie de masse pour répondre au mieux aux analyses :

-Une chaîne nano2D couplée à un Spectromètre de masse Exploris 480 (R=480000) pour les analyses protéomiques.

-Une chaîne μ UPLC couplée à un spectromètre de masse Qexactive *plus* (R=280000) Pour les analyses métabolomiques.



Domaines d'expertises

La plateforme d'analyse des biomolécules de l'IPMC est organisée en 2 pôles principaux

- l'analyse métabolomique
- l'analyse protéomique

Les projets **d'analyses métabolomiques** réalisées sur la plateforme s'orientent autour de deux domaines : i) l'analyse globale en lipidomique dans des mélanges complexes, ii) l'analyse de métabolites ciblés et notamment des analyses qualitatives et quantitatives avec pour objectif la comparaison d'expression entre deux états.

Les principaux objectifs sont d'identifier des métabolites impliqués dans des problématiques liées au domaine de la santé et plus particulièrement dans la compréhension à l'échelle cellulaire et moléculaire des processus physiopathologiques aboutissant à des maladies du système nerveux comme la maladie d'Alzheimer, l'autisme, la dépression ou encore certains cancers et même l'obésité. L'ensemble des analyses métabolomiques sont réalisées sur un grand nombre de matrices biologiques différentes telles que : cellules, sérum, salive, urine, tissus comme l'hippocampe, l'hypothalamus, les muscles.

Les projets **d'analyses protéomiques** menés sur la plateforme sont eux aussi divisés en différents axes qui sont : i) l'identification non ciblée et ciblée de protéines présentes dans un mélange complexe, ii) la quantification relative globale et ciblée de protéines dans des mélanges complexes, iii) l'identification de modifications post-traductionnelles.

Ici encore la plateforme travaille principalement sur des projets liés à des problématiques de santé et plus précisément dans les domaines des neuropathologies et en cancérologie.

Implication de la plateforme : de la conception à la valorisation

Le travail réalisé sur notre plateforme se situe à l'interface de la biologie avec la chimie. Nous apportons une grande importance au dialogue avec les différents collaborateurs afin de comprendre leurs attentes et de pouvoir leur proposer des approches analytiques correspondant à leurs attentes.

Nous étudions ensemble la faisabilité du projet, déterminons une stratégie expérimentale adaptée au projet, aux échantillons et à la question biologique posée.

Dans le cas des analyses métabolomiques et notamment en analyses lipidomiques les lipides sont extraits sur place en pratiquant une extraction liquide/liquide en utilisant majoritairement via la méthode d'extraction Bligh and Dyer, ou Bligh and Dyer modifiée. Dans le cas de l'analyse de métabolites nous demandons aux équipes de réaliser eux-mêmes les extractions par des méthodes d'extraction liquide/liquide ou d'extraction sur phase solide (SPE). Evidemment notre expertise, dans ce domaine, est partagée avec les utilisateurs.

Par la suite les analyses des échantillons sont réalisées sur un système LC-HRMS couplant une chaîne chromatographique de type chaîne micro-HPLC (U3000, Thermo Fisher) avec un spectre de masse à haute résolution (Q-exactive plus, ThermoFisher). Les séparations chromatographiques sont adaptées selon la nature des échantillons à analyser. Nous travaillons notamment sur des colonnes de types : C18, C8, PFP, HILIC... Les analyses par spectrométrie de masse peuvent être ensuite faites selon plusieurs modes d'acquisition : Full scan, PRM ou ddMS2 en mode positif et/ou négatif, et ceux-ci en accord avec le projet, les molécules étudiées et la question biologique posée.

En analyses protéomiques nous travaillons principalement sur des extraits complexes de protéines issus de cellules, tissus, fluides biologiques... Avant analyse, les échantillons protéiques doivent subir une digestion enzymatique pour transformer les protéines en peptides plus adaptés à l'analyse par spectrométrie de masse. Selon la quantité et la provenance des échantillons nous pouvons digérer les protéines en solution et/ou à partir des gel SDS-PAGE. Les peptides ainsi générés sont ensuite analysés avec notre système nano-chromatographique (RSLC-U3000, ThermoFisher) couplée avec un

spectromètre de masse à haute résolution de type orbitrap (Exploris480, ThermoFisher). Les méthodes séparatives et d'acquisition sont adaptées en accord avec les projets et les différentes problématiques.

En analyses métabolomiques ou protéomiques, le retraitement des données est réalisé par les ingénieurs de la plateforme en utilisant différents logiciels adaptés comme : i) LipidSearch, skyline, Excel, R, prism pour la partie lipidomique , ii) skyline, xcalibur-quant pour la partie analyse de métabolites ciblés, iii) Proteome Discoverer 2.5, MaxQuant, Perseus, LFQ-Analyst pour la partie protéomique. Les ingénieurs de la plateforme mettent au service des utilisateurs leur savoir-faire dans les études de bio-analyse et de bio-statistique (ProteoRE, STRING, Python...) afin de valoriser les résultats obtenus après retraitement des données issues d'analyses par spectrométrie de masse.

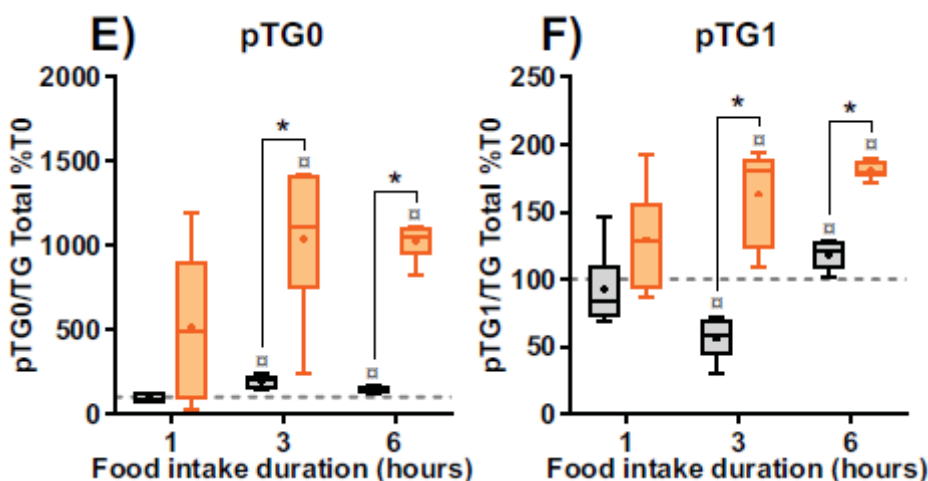
Quelques résultats

Torrino et al. Elife. 2021

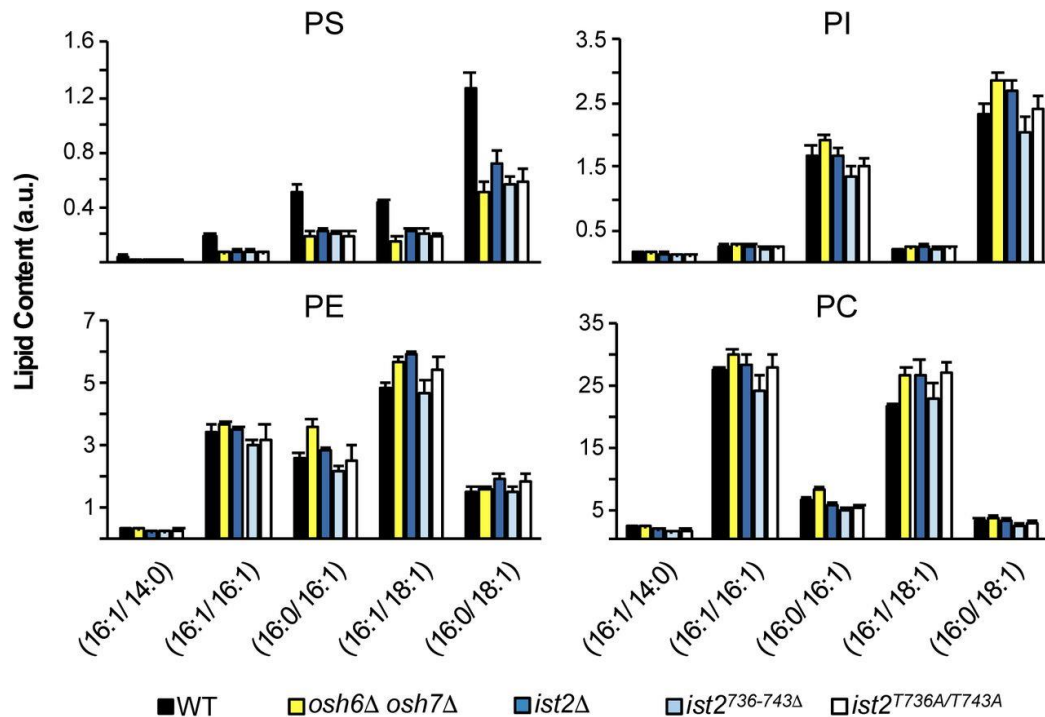
Le récepteur à l'EGF (EGFR) est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des tyrosine kinases indispensable à la signalisation induite par le facteur de croissance épithélial (EGF). Outre, son rôle essentiel dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire, l'EGFR est un oncogène fréquemment muté ou sur-exprimé dans de nombreux cancers. En combinant des approches de protéomique et de lipidomique avec des analyses fonctionnelles, nous avons montré que la protéine UBTD1 a pour rôle de coordonner 2 étapes essentielles de la signalisation de l'EGFR, son activation et sa dégradation. L'analyse lipidomique a permis de démontrer qu'UBTD1, en régulant la quantité de céramides contenue dans les membranes cellulaires, contrôle l'auto-activation de l'EGFR. De plus, l'analyse protéomique ciblée nous a aidé à disséquer les processus moléculaires par lesquels UBTD1 régule la quantité de céramides membranaires et la dégradation lysosomale de l'EGFR. Ces travaux nous ont permis de démontrer le rôle important d'UBTD1 dans la coordination de la voie de signalisation de l'EGFR et le contrôle de la prolifération cellulaire.

Cancell et al Glia 2020

proportion of total triglycerides (TG) containing (E) saturated (pTG0) and (F) mono-unsaturated (pTG1) fatty acids of 8-week-old C57Bl/6J male mice exposed for 1h, 3h and 6h to either standard diet (SD) or high-fat diet (HFD) at the onset of the dark period.



Lipidomic analysis of total cellular content of PC, PE, PI and PS species in WT, *osh6Δ osh7Δ* and *ist2* mutant cells



[Publications associées à la plateforme PAB 2018-2021](#)

1: UBD1 regulates ceramide balance and endolysosomal positioning to coordinate EGFR signaling. Torino S, Tiroille V, Dolfi B, Dufies M, Hinault C, Bonesso L, Dagnino S, Uhler J, Irondelle M, **Gay AS, Fleuriot L, Debayle D**, Lacas-Gervais S, Cormont M, Bertero T, Bost F, Gilleron J, Clavel S. *Elife*. 2021 Apr 22.

2: Aminopeptidase A contributes to biochemical, anatomical and cognitive defects in Alzheimer's disease (AD) mouse model and is increased at early stage in sporadic AD brain. Valverde A, Dunys J, Lorivel T, **Debayle D, Gay AS**, Lacas-Gervais S, Roques BP, Chami M, Checler F. *Acta Neuropathol*. 2021 Apr 21.

3: FBXO32 links ubiquitination to epigenetic reprogramming of melanoma cells. Habel N, El-Hachem N, Soysouvanh F, Hadhiri-Bziouche H, Giuliano S, Nguyen S, Horák P, **Gay AS, Debayle D**, Nottet N, Béranger G, Paillerets BB, Bertolotto C, Ballotti R. *Cell Death Differ*. 2021 Jan 18.

4: Cansell C, Stobbe K, Sanchez C, Le Thuc O, Mosser CA, Ben-Fradj S, Leredde J, Lebeaupin C, **Debayle D, Fleuriot L**, Brau F, Devaux N, Benani A, Audinat E, Blondeau N, Nahon JL, Rovère C. Dietary fat exacerbates postprandial hypothalamic inflammation involving glial fibrillary acidic protein-positive cells and microglia in male mice. *Glia*. 2020 Jul 13.

5: Signetti L, Elizarov N, Simsir M, Paquet A, Douguet D, Labbal F, **Debayle D**, Di Giorgio A, Biou V, Girard C, Duca M, Bretillon L, Bertolotto C, Verrier B, Azoulay S, Mus-Veteau I. Inhibition of Patched

Drug Efflux Increases Vemurafenib Effectiveness against Resistant BrafV600E Melanoma. *Cancers* (Basel). 2020 Jun 9;12(6):1500.

6: D'Ambrosio JM, Albanèse V, Lipp NF, **Fleuriot L, Debayle D**, Drin G, Čopič A. Osh6 requires Ist2 for localization to ER-PM contacts and efficient phosphatidylserine transport in budding yeast. *J Cell Sci.* 2020 Jun4;133(11).

7: Péresse T, Kovacs D, Subra M, Bigay J, Tsai MC, Polidori J, Gautier R, Desrat S, **Fleuriot L, Debayle D**, Litaudon M, Pham VC, Bignon J, Antony B, Roussi F, Mesmin B. Molecular and cellular dissection of the oxysterol-binding protein cycle through a fluorescent inhibitor. *J Biol Chem.* 2020 Mar 27;295(13):4277-4288.

8: CDC20B is required for deuterosome-mediated centriole production in multiciliated cells. Revinski DR, Zaragosi LE, Boutin C, Ruiz-Garcia S, Deprez M, Thomé V, Rosnet O, **Gay AS**, Mercey O, Paquet A, Pons N, Ponzio G, Marcet B, Kodjabachian L, Barbry P. *Nat Commun.* 2018 Nov 7.

9: Nicolas S, **Debayle D**, Béchade C, Maroteaux L, **Gay AS**, Bayer P, Heurteaux C, Guyon A, Chabry J. Adiporon, an adiponectin receptor agonist acts as an antidepressant and metabolic regulator in a mouse model of depression. *Transl Psychiatry.* 2018 Aug 16;8(1):159.

10: Melanocytes Sense Blue Light and Regulate Pigmentation through Opsin-3. Regazzetti C, Sormani L, **Debayle D**, Bernerd F, Tulic MK, De Donatis GM, Chignon-Sicard B, Rocchi S, Passeron T. *J Invest Dermatol.* 2018 Jan.

Tarification et Contacts

La PAB dispose d'une politique de tarification à plusieurs niveaux selon que vous dépendiez d'un laboratoire académique ou privé. Cette tarification est adaptée à la nature de votre projet (identification, quantification, contrôle ...) ainsi qu'au type de collaboration souhaitée (collaboration, prestation de service). La PAB propose également une tarification sous forme de forfait développement/étude de faisabilité selon votre questionnaire et les mises au point nécessaires. Pour travailler avec nous vous pouvez contacter les responsables de la Plateforme d'Analyse des Biomolécules.

Dr. Delphine Debayle et Dr Anne-Sophie Gay

IPMC, UMR 7275 CNRS

Université Côte-d'Azur

660 route des lucioles

06560 Valbonne, France

☎ : +33 (0)4 93 95 77 52

✉ : debayle@ipmc.cnrs.fr, gay@ipmc.cnrs.fr

https://www.ipmc.cnrs.fr?page=ressource_caracterisation_P_C

Financements

