

Typage direct de biopsies amyloïdes par analyse protéomique

CJSM/SFSM, Congrès SMAP, Avignon, 19 Septembre 2011

Sophie Liuu¹, Emmanuelle Demey¹, Emie Durighello¹, Magali Colombat², Gilles Grateau³, Joëlle Vinh¹

¹Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique, CNRS USR 3149 / ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

²Service d'anatomie et cytologie pathologiques, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine Paris, 75020 Paris, France.

³Service de médecine interne, AP-HP, Hôpital Tenon, UPMC, Inserm U933, 4 rue de chine 75020 Paris, France.

Les amyloses sont des maladies qui se caractérisent par des agrégats de protéines extracellulaires dans divers tissus de l'organisme. Il existe une vingtaine de différents types d'amyloses, généralisées ou localisées, qui se différencient par leur protéine précurseur [Grateau et al., 2000]. Par exemple, la maladie d'Alzheimer et le cancer médullaire de la thyroïde sont des types particuliers d'amyloses liés respectivement à l'accumulation de « amyloid protein precursor » (APP) et de calcitonine. De nos jours, le diagnostic se fait principalement par immunohistochimie. Cette technique, nécessitant des anticorps spécifiques, permet de mettre en évidence une, deux, voire trois protéines à la fois.

Ce travail vise à identifier des marqueurs amyloïdes en utilisant une approche protéomique sans *a priori*. Les différentes biopsies sont préparées puis analysées par nano-chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (MS/MS) haute résolution de type nanoESI-LIT/FTICR (LTQ FT Ultra, Thermo Fisher Scientific).

Dans un premier temps, la méthodologie employée a été d'optimiser le système nano-chromatographique (diamètre interne, longueur et type des capillaires et connections) sur un mélange de protéines standards digérées afin de réduire les volumes morts qui altèrent la séparation nanoLC (figure 1). La longueur (figure 2) de la colonne et la durée du gradient d'élution (figure 3) ont également été optimisées sur des échantillons complexes, des biopsies de reins, afin d'obtenir une meilleure couverture du protéome.

Puis dans un deuxième temps, les biopsies prélevées chez des patients atteints de différents types d'amyloses sont directement broyées et digérées à l'aide d'une enzyme protéolytique, la trypsine. Cette étape a été réalisée par une technique originale mise au point au laboratoire : la digestion sous ultrasons. Cette technique permet d'augmenter l'efficacité et le temps de la digestion, et de minimiser la quantité d'échantillons biologiques nécessaires. Ces échantillons digérés sont ensuite analysés en nanoLC-MS/MS (figure 4) pour une identification et une quantification label-free des protéines [Silva et Al., 2006].

Cette approche protéomique nous a permis de confirmer le diagnostic clinique des patients atteints par la pathologie d'amylose décelée dans différents organes/tissus (reins, poumons, glandes salivaires, testicule, œil vitré).

De plus, cette méthode, efficace pour des biopsies de faible volume (4 mm³) permettra d'identifier de nouvelles protéines co-agrégées avec les protéines majeures d'amyloses, ce qui ne pourrait pas être le cas en immunohistochimie où la connaissance de la protéine au préalable est nécessaire.

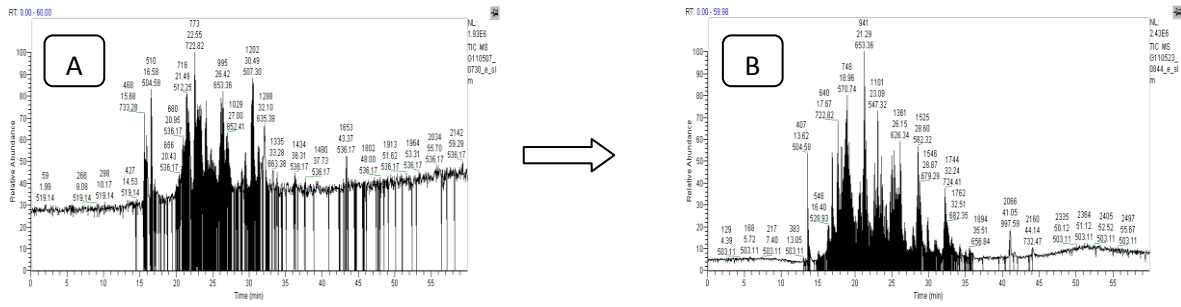


Figure 1 : Optimisation extra-colonne d'un mélange de digestion de 6 protéines standards (albumine de sérum bovin, sérotransferrine, alcool déshydrogénase, béta-galactosidase, lysozyme C et cytochrome C) sur la colonne Acclaim pepMap100 C18, 3µm, 100Å, 75µm x 150mm (Dionex).
 Analyse par nano chromatographie liquide (Ultimate 3000, Dionex) couplée à la spectrométrie de masse (nanoESI, TriVersa NanoMate Advion ; LTQ FT Ultra, ThermoFisher).
 Eluent A: eau/acétonitrile/acide formique 98/2/0,1 (v/v/v), Eluent B: acétonitrile/eau/ acide formique 90/10/0,1 (v/v/v).
 Gradient de 5%B à 50%B en 60 min.
 A: Avant optimisation, B: Après optimisation

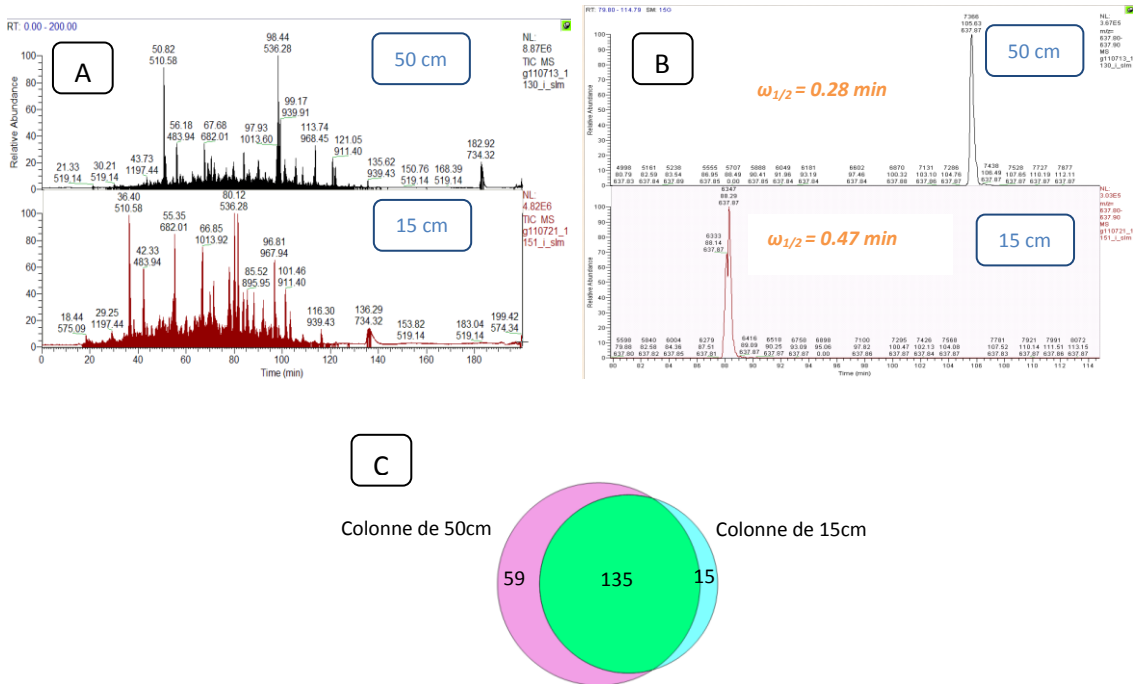


Figure 2 : Optimisation de la longueur de la colonne sur des biopsies de rein sur la colonne Acclaim pepMap100 C18, 3µm, 100Å, 75µm x L (Dionex).
 Analyse par nano chromatographie liquide (Ultimate 3000, Dionex) couplée à la spectrométrie de masse (nanoESI, TriVersa NanoMate Advion ; LTQ FT Ultra, ThermoFisher).
 Eluent A: eau/acétonitrile/ acide formique 98/2/0,1 (v/v/v), Eluent B: acétonitrile/eau/ acide formique 90/10/0,1 (v/v/v).
 Gradient de 2%B à 40%B en 170 min puis 50%B en 10min.
 A : Chromatogrammes d'ion total obtenus sur une colonne de 50cm (en noir) et sur une colonne de 15cm (en rouge)
 B: Extraction de l'ion m/z 637.87 (lissage gaussien de 15 points des spectres) : largeur de pic à mi-hauteur ($\omega_{1/2}$) plus large avec une colonne de 15 cm qu'une colonne de 50cm.
 C : Distribution du nombre d'identification de protéines en fonction de la longueur de la colonne analytique: 194 protéines identifiées avec une colonne de 50 cm contre 150 protéines identifiées avec une colonne de 15cm (FDR<1%, protéines vus dans les 3 réplicats, 2 peptides par protéines minium)

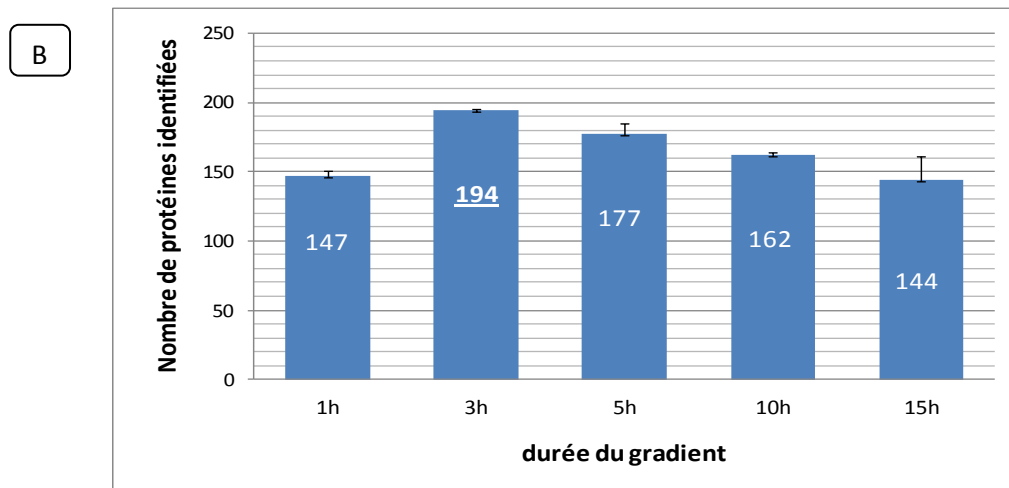
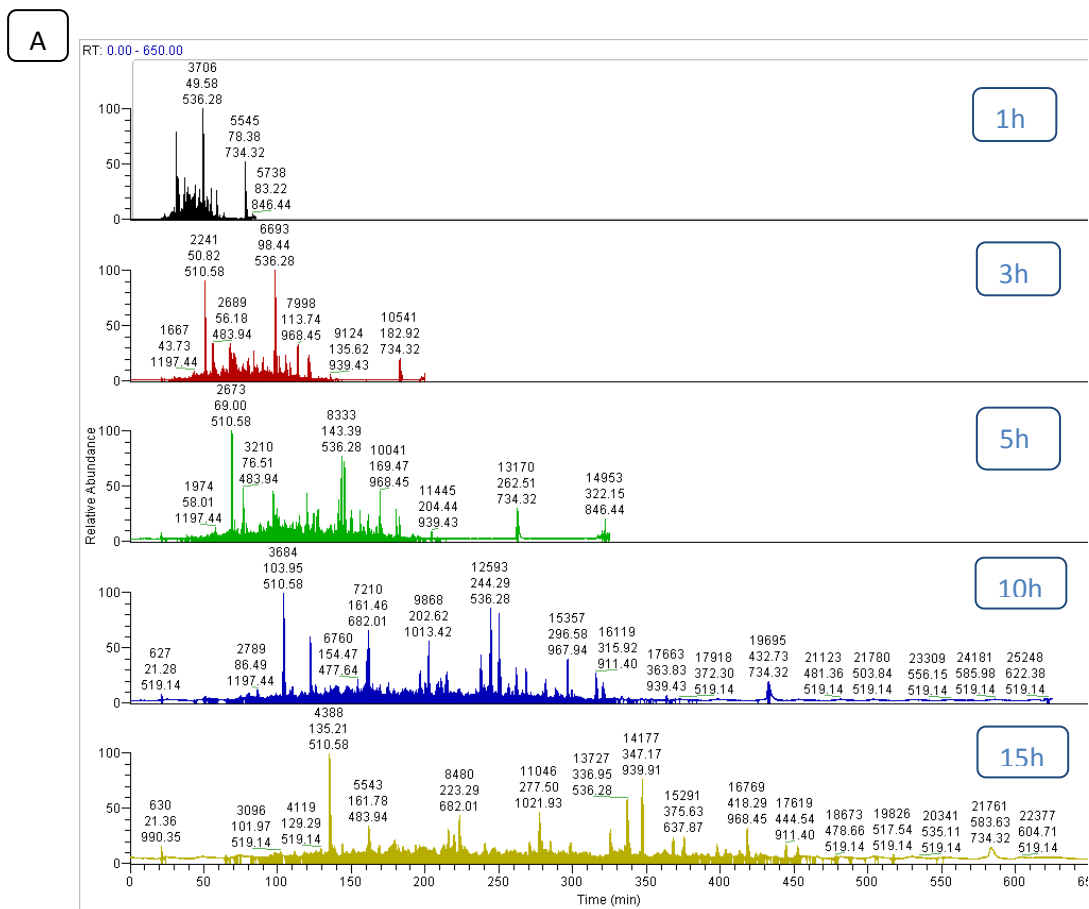


Figure 3 : Optimisation du gradient d'élution sur des biopsies de rein sur la colonne Acclaim pepMap100 C18, 3 μ m, 100 \AA , 75 μ m \times 500mm (Dionex).

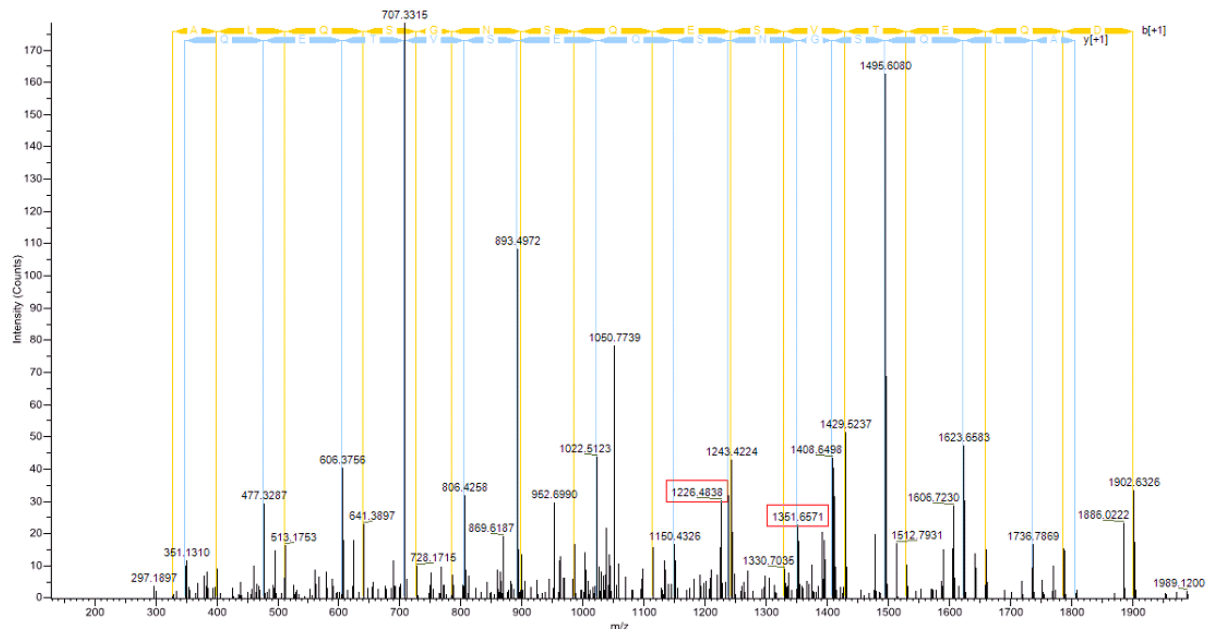
Analyse par nano chromatographie liquide (Ultimate 3000, Dionex) couplée à la spectrométrie de masse (ESI, TriVersa NanoMate Advion ; LTQ FT Ultra, ThermoFisher).

Eluent A: eau/acétonitrile/ acide formique 98/2/0,1 (v/v/v), Eluent B: acétonitrile/eau/ acide formique 90/10/0,1 (v/v/v).

Gradient de 2%B à 40%B puis 50%B, temps de gradients différents selon l'expérience.

A : Chromatogrammes d'ion total obtenus avec différentes durées de gradient d'élution.

B : Nombre de protéines identifiées en fonction de la durée du gradient d'élution : meilleur nombre de protéines identifiées avec un gradient de 3h (2%B à 40%B en 170 min puis 50%B en 10min).



V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K

Figure 4 : Spectre MS/MS d'un peptide spécifique (peptide VDNALQSGNSQESVTEQDSK m/z 2134.9614) à un marqueur amyloïde : Ig kappa chain C (IGKC), protéine caractéristique du dépôt amyloïde de chaîne légère AL (amyloid Light chain). Analyse par chromatographie liquide (Ultimate 3000, Dionex) couplée à la spectrométrie de masse (ESI, TriVersa NanoMate Advion ; LTQ FT Ultra, ThermoFisher) Colonne : Acclaim pepMap100 C18, 3 μ m, 100Å, 75 μ m \times 500mm (Dionex). Gradient de 2%B à 40%B en 170 min puis 50%B en 10min.

Références :

[Grateau et Al., 2005] : Grateau, G., J. Verine, M. Delpech, and M. Ries. "Les amyloses, un modèle de maladie du repliement des protéines." *Médecine Sciences*, 2005: 627-633.

[Silva et Al., 2006] : Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JPC, Geromanos SJ. Absolute quantification by LCMS^E, *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, 5,144.