

## TYPAGE DIRECT DE BIOPSIES AMYLOÏDES PAR ANALYSE PROTÉOMIQUE

Sophie Liuu<sup>1</sup>, Emmanuelle Demey-Thomas<sup>1</sup>, Emie Durighello<sup>1</sup>, Gilles Grateau<sup>2</sup>, Joëlle Vinh<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Service de médecine interne, Hôpital Tenon, UPMC, Inserm U933, 4 rue de la Chine Paris, 75020 Paris, France

Les amyloses sont des maladies qui se manifestent par des agrégats de protéines extracellulaires dans divers tissus de l'organisme. Une vingtaine de types d'amyloses différents est répertoriée, généralisées ou localisées qui se différencient par la protéine amyloïdogène associée [1].

Actuellement, le diagnostic se fait principalement par immunohistochimie. Cette technique, nécessitant des anticorps spécifiques, permet de mettre en évidence jusqu'à une dizaine de protéines, mais son interprétation reste fortement dépendante du pathologiste et du matériel employé, et peut être ambiguë. Récemment de nouvelles techniques ont fait leur apparition, combinant la microdissection laser (MDL) et la spectrométrie de masse [2].

Une des étapes clé de l'analyse protéomique par approche *bottom-up* reste la protéolyse enzymatique, et le traitement par ultrasons permet d'en améliorer la réalisation [3]. Notre travail vise à identifier des marqueurs amyloïdes en utilisant une approche protéomique à partir de tissus bruts traités par ultrasons, en évitant l'étape de MDL pour rester au plus près d'un typage clinique. Après la phase d'optimisation du système nanochromatographique (matériel, connexions...) sur un mélange de protéines standards digérées, puis sur des biopsies de reins (préparation, gradients), les biopsies prélevées chez des patients atteints de différents types d'amyloses sont directement broyées, et digérées par la trypsine, sous ultrasons. Cette technique permet d'augmenter l'efficacité et réduire le temps de la digestion, tout en minimisant la quantité de matériel biologique nécessaire. Ces échantillons digérés sont ensuite analysés par nano-chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (MS/MS) à haute résolution de type nanoESI-LIT/FTICR (LTQ FT Ultra, Thermo Fisher Scientific) pour caractériser les protéines présentes [4]. La validation de cette approche protéomique pour le diagnostic clinique des patients présentant une amylose dans différents organes/tissus (reins, poumons, glandes salivaires, testicule, humeur vitrée, rate) nous a permis de mettre au point une méthode de criblage dédiée. L'étape suivante consiste à transférer la méthode en analyse clinique vers un spectromètre de masse de type triple quadripole (TSQ Vantage, Thermo Fisher Scientific) pour une analyse spécifique en mode SRM (*Selected Reaction Monitoring*) [5]. Dans ce cadre, un travail sur le débit d'analyse est aussi souhaitable sur les méthodes de séparation mises en œuvre.

Ces méthodes, efficaces pour des biopsies de faible volume, permettent de typer rapidement les amyloses et de trouver de nouvelles protéines amyloïdogènes, ce qui ne pourrait pas être le cas en immunohistochimie où la connaissance de la protéine au préalable est nécessaire.

[1]. G. Grateau et al., Médecine Sciences, 2005: 627-633.

[2]. S. Sethi et al., Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 2010; 5(12): 2180-7.

[3]. L. Fernandez, et al JIOMICS, 2011, 1(1): 144-150.

[4]. J.C. Silva et al., Mol Cell Prot, 2006, 5: 144-56.

[5]. S. Liuu et al., en préparation.