

Emmanuelle Demey¹, Sophie Liuu¹, Emie Durighello¹, Magali Colombat², Gilles Gâteau³, Joëlle Vinh¹

¹SMBP CNRS USR 3149, ESPCI PARISTech, 10 rue Vauquelin 75005 Paris.

²Service d'anatomie pathologique, AP-HP Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine 75020 Paris.

³Service de médecine interne, Hôpital Tenon, UPMC, Inserm U933, 4 rue de la Chine 75020 Paris.

Introduction:

Les amyloses sont des maladies se manifestant par des agrégats de protéines extracellulaires dans divers tissus de l'organisme. Il existe une vingtaine de types d'amyloses différents, généralisées ou localisées, qui se différencient par leur protéine précurseur [1]. Le diagnostic se fait principalement par immunohistochimie, nécessitant des anticorps spécifiques. Elle permet de mettre en évidence jusqu'à une dizaine de protéines, mais son interprétation restant fortement dépendante du pathologiste et du matériel employé, peut être non concluante.

Objectif:

De nouvelles techniques ont fait leur apparition, combinant micro dissection par capture laser (MCL) et 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]. Nous avons identifié plusieurs marqueurs amyloïdes en utilisant une approche protéomique à partir de tissus bruts traités par ultrasons, éliminant l'étape de MCL pour rester au plus près du typage clinique.

Matériel & Méthodes

Optimisation du système nanochromatographique (matériel, connexions...) sur un mélange de protéines standards digérées, puis sur des biopsies de reins (préparation, gradients).

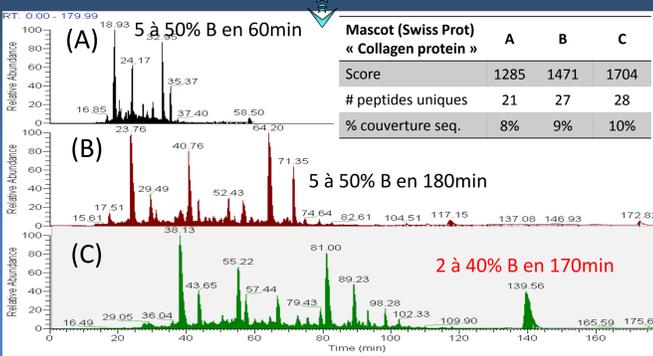


Figure 1: optimisation sur biopsie de tissu pulmonaire

- nano C18 Acclaim pepMap100 (Dionex) Viper 75µm d.i.x15cm, gradient 2% à 40%B en 170 min, tampons: A H₂O/ACN/AF 98:2:0.1 (v/v/v)/ B H₂O/ACN/AF 10:90:0.1 (v/v/v)
- Source nano ESI (Triversa Nanomate, Advion)
- LTQ-Fultra: Résolution 50000 MS + top 7 MS/MS (ThermoFisher scientific)

Interpretation: Approche non ciblée: une seule isoforme (validée et annotée dans SwissProt) conservée par groupe

- abondance des protéines calculée à partir de la surface des trois peptides les plus intenses (5)
- les isoformes non identifiées se voient attribuer l'intensité globale minimum calculable dans cette analyse.
- sont considérés comme candidats potentiels, les biopsies présentant: une abondance relative des protéines amyloïdogènes >1%, et les protéines communes aux dépôts amyloïdes ("Apolipoprotein E" et "Serum amyloid P component").
- les amyloses sont classées en fonction de leur intensité relative par rapport aux protéines de la table 1.

Préparation: Les tissus bruts et/ou fixés au paraformaldéhyde (coloration Bouin/AFA), issus de patients ou de témoins (tissus déclarés sains pour cette pathologie) sont directement digérés à l'aide d'une sonde à ultrasons.

- coupes de tissu (10µm): extrapolation du volume selon la surface des coupes issues de l'anatomopathologie

- digestion enzymatique: (trypsine porcine / Promega Gold) par sonication (sonde MicroSon XL à 4°C) après réduction et alkylation.

- filtration des mélanges sur pointes Proxeon avant injection LC (environ 0.15 mm³ à chaque analyse, sauf pour les préparations traitées par MDL - 0.0055 mm³ injectés, soit un équivalent de 0.3 coupes)



Recherches: Mascot 2.3 et Sequest combinés via Proteome Discoverer 1.3.0.339

Banques:

UniProt-SwissProt 2012_07 + banque interne contenant les protéines amyloïdogènes de SwissProt/Trembl.

Réglages: 5ppm MS, 0.5Da MS/MS, 2 "miss cleavages", peptides tryptiques.

Modifications partielles: Ox (M) et CAM (C).

Validation: Protéines consensus identifiées en triplicat avec les 2 moteurs de recherche (FDR<1%)

Accession	Amylose	Description
P02743	non specif	>sp P02743 SAMP_HUMAN Serum amyloid P-component
P02649	non specif	>sp P02649 APOE_HUMAN Apolipoprotein E
P02766	ATTR	>sp P02766 TTHY_HUMAN Transthyretin
P04279	Asemi	>sp P04279 SEMG1_HUMAN Semenogelin-1
Q9UKY0	APrPsc	>sp Q9UKY0 PRND_HUMAN Prion-like protein doppel
Q865H4	APrPsc	>sp Q865H4 PRNT_HUMAN Putative testis-specific prion protein
P04156	APrPsc	>sp P04156 PRIO_HUMAN Major prion protein
P01236	APro	>sp P01236 PRL_HUMAN Prolactin
Q08431	AMed	>sp Q08431 MFGM_HUMAN Lactadherin
P61626	ALys	>sp P61626 LYSC_HUMAN Lysozyme C
P0C606	AIL	>sp P0C606 LAC3_HUMAN Ig lambda-3 chain C regions
P0C605	AIL	>sp P0C605 LAC2_HUMAN Ig lambda-2 chain C regions
P0C604	AIL	>sp P0C604 LAC1_HUMAN Ig lambda-1 chain C regions
P0CF74	AIL	>sp P0CF74 LAC6_HUMAN Ig lambda-6 chain C region
A0M8Q6	AIL	>sp A0M8Q6 LAC7_HUMAN Ig lambda-7 chain C region
P01834	AIk	>sp P01834 IGKC_HUMAN Ig kappa chain C region
Q14960	Alect2	>sp Q14960 LECT2_HUMAN Leukocyte cell-derived chemotaxin-2
P02788	ALac	>sp P02788 TRF1_HUMAN Lactotransferrin
Q15582	Aker	>sp Q15582 BGH3_HUMAN Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3
P01308	AIns	>sp P01308 INS_HUMAN Insulin
P10997	AIAPP	>sp P10997 IAPP_HUMAN Islet amyloid polypeptide
P01871	AHm	>sp P01871 IGHM_HUMAN Ig mu chain C region
P01857	AHg	>sp P01857 IGHG1_HUMAN Ig gamma-1 chain C region
P06396	AGel	>sp P06396-2 GELS_HUMAN Isoform 2 of Gelsolin
P06395	AGel	>sp P06395 GELS_HUMAN Gelsolin
P02671	AFib	>sp P02671 FIBA_HUMAN Fibrinogen alpha chain
P01034	ACys	>sp P01034 CYTC_HUMAN Cystatin-C
P01258	ACal	>sp P01258 CALC_HUMAN Calcitonin
P05067	ABeta	>sp P05067 A4_HUMAN Amyloid beta A4 protein
P61769	AB2M	>sp P61769 B2MG_HUMAN Beta-2-microglobulin
P06727	AApoAIV	>sp P06727 APOA4_HUMAN Apolipoprotein A-IV
P02652	AApoAII	>sp P02652 APOA2_HUMAN Apolipoprotein A-II
Q8NCV5	AApoAI	>sp Q8NCV5-2 AIBP_HUMAN Isoform 2 of Apolipoprotein A-I-binding protein
P02647	AApoAI	>sp P02647 APOA1_HUMAN Apolipoprotein A-I
P01160	AANF	>sp P01160 ANF_HUMAN Natriuretic peptides A
P02735	AA	>sp P02735 SAA_HUMAN Serum amyloid A protein

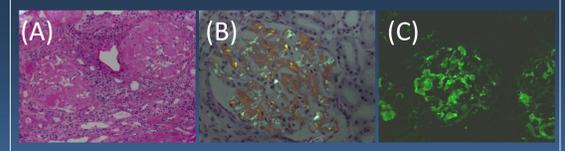
Table 1: Liste de protéines associées à l'amylose, prises en compte dans cette étude.

Typage des amylose, par digestion Ultrasons sur tissus bruts ou fixés:

- comparaison et confirmations des résultats provenant de l'immunohistopathologie (diagnostic réalisé à partir du test anticorps, exemple photo C)
- résultats significatifs pour différents tissus (rein, glandes salivaires, poumon...).
- résultats significatifs pour plusieurs pathologies (amyloses type AL, AA, TTR, ApoA1...)

Figure 2 : Images d'anatomopathologie^{2,3} de biopsies de tissu rénal (amylose AL): (A) Hemaline Eosine (HE), (B) rouge Congo, (C) immunomarquage AL.

Proportion de tissu amyloïde de type AL : moins de 50% du tissu (photo C)



Visualisation des résultats sous forme de diagrammes circulaires représentant l'intensité relative des protéines amyloïdogènes. Tissu rénal.

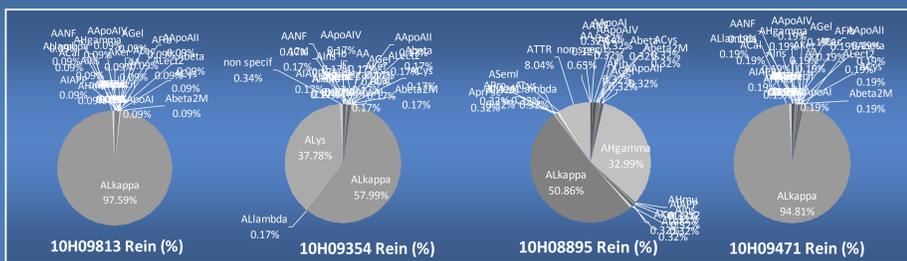


Figure 3: Contrôles biopsies négatives pour les dépôts amyloïdes.

- pas de réels contrôles négatifs car les biopsies proviennent obligatoirement de patients testés pour une recherche de pathologie.
- absence de SAMP et ApoE (biomarqueurs fibrillaires) dans les tissus rénaux non amyloïdes.
- protéines amyloïdogènes néanmoins détectées (Igκ and γ) dans certains tissus non amyloïdes, probablement dues à la réponse inflammatoire ou à des lésions tissulaires (lésions glomérulaires mineures).
- validation des contrôles s'ils ne présentent pas de pathologie amyloïdogène.

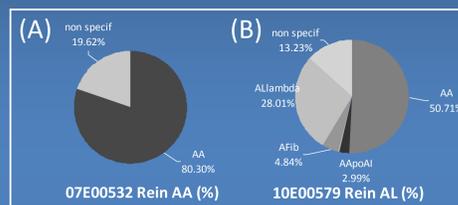


Figure 4: Biopsies de tissu contenant : (A) 80% de fibrilles amyloïdes AA et (B) 10% de fibrilles amyloïdes AA.

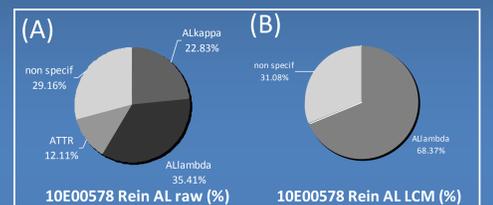


Figure 5: Biopsies de tissu amyloïdes (type AL) : (A) tissu brut (50% fibrilles, Fig. 2), (B) MCL (fibrilles supérieur à 95%)

- pas d'ambiguïté de diagnostic et classification pour des dépôts amyloïdes > à 80% (Fig 4 A).
- diagnostic correct mais perdant en robustesse si pourcentage < à 50% (Fig 4 B & 5A).
- identification possible sur tissu brut (sans découpe et sans sélection de zones à dépôts amyloïdogènes) (Fig 5A).
- aucune ambiguïté de détermination sur tissu traités par MCL (offrant 95% de fibrilles amyloïdes) (Fig 5B).

Conclusions & Perspectives:

Cette stratégie permet un typage rapide et assez précis pour le typage des amyloses, directement sur l'échantillon clinique, sur des tissus de nature et provenance variées (fixés, colorés ou bruts, issus de rein, glandes salivaires, poumon, testicule, rate...). Du traitement enzymatique (avec un minimum de 10 tranches de 10µm d'échantillon) à l'acquisition par LC-MS/MS en triplicats (avec un équivalent de 1 coupe de 10µm par injection) moins de 2 jours sont nécessaires. D'autre part, elle s'affranchit de la MCL, qui reste une étape longue et délicate. Le typage par sonication couplée à la LC-MS/MS est particulièrement intéressante dans les cas où l'analyse classique par immunohistochimie ne fournit pas suffisamment d'informations pour le diagnostic.

Dans l'optique d'une application clinique plus réaliste (augmentation des cohortes) nous souhaiterions automatiser la première étape. La miniaturisation du système de préparation est envisagée afin de diminuer la consommation en échantillon lors du premier traitement (cependant seulement 10% de l'échantillon est analysé par la suite). La caractérisation spécifiques d'isoformes de certaines de ces protéines est en cours d'analyse par SRM (sur le TSQ Vantage, ThermoFisher scientific). Cette perspective ouvre une voie intéressante, comme le montrent les analyses de cas d'ATTR, par la double stratégie bottom-up (3) et top-down (4). La caractérisation des isoformes de transthyrétine permette une discrimination entre des cas d'amyloses séniles systémiques et des amyloses par transthyrétine de type familiale.

1. S. Sethi, et al Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 2010; 5(12): 2180-7.
2. L. Fernandez, et al JOMICS, 2011, 1(1): 144-150.
3. J.S. Kingsbury, et al Anal. Chem. 2007, 79(5), 1990-8
4. R. Théberge, et al Int. J. Mass Spectrom. 2011; 300: 130-42
5. J.C. Silva, Mol Cell Prot, 2006, 5: 144-56

- S. Liuu and E. Durighello ont reçu une gratification de la part de la SAESPCI. Ce travail est soutenu par le CNRS, l'AP-HP Ville de Paris et l'Association Française contre l'Amylose et a fait l'objet d'une présentation orale au XIII^{ème} Symposium International des Amyloses (Groningen, NL, mai 2012)
- Contact : emmanuelle.demey@espci.fr