PepS : dispositif microfluidique de préparation et stabilisation au lit du patient de marqueurs protéiques fragiles du sang

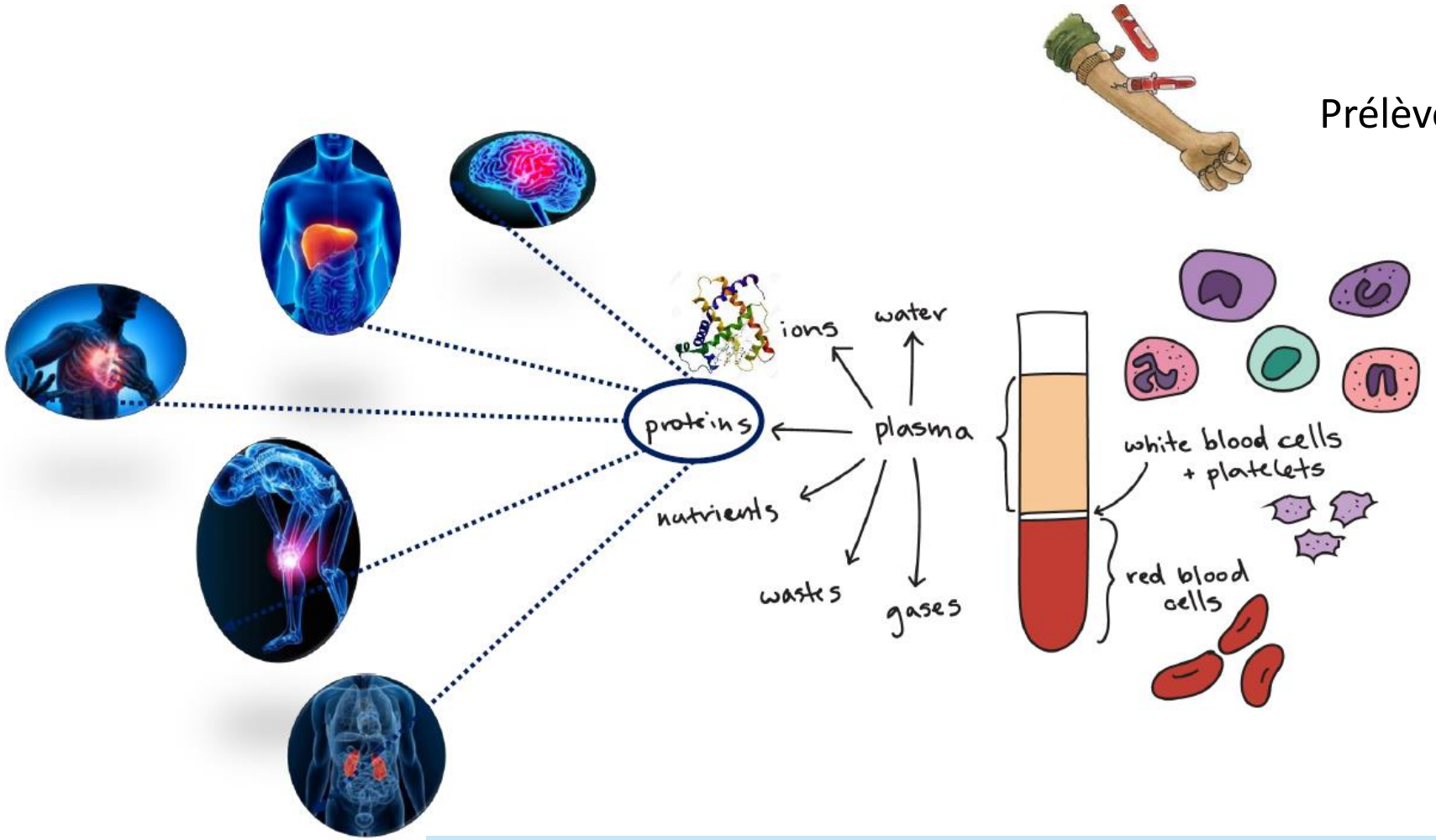
Benoit Gilquin, Myriam Cubizolles, Remco Den Dulk, Frédéric Revol-Cavalier, Manuel Alessio, Charles-Elie Goujon, Camille Echampard, Gorka Arrizabalaga, Annie Adrait, Mathilde Louwagie, Patricia Laurent, Fabrice Navarro, Yohann Couté, **Marie-Line Cosnier** et Virginie Brun

Sommaire

- Contexte
- La protéomique dans la pratique clinique
- La plateforme PepS
- Résultats pour le mode « découverte »
- Résultats pour le mode « ciblé »
- Conclusions et perspectives

Contexte

La découverte et la quantification des biomarqueurs sanguins



Prélèvement sanguin

1. Biomarqueurs pour une signature de la pathologie
2. En recherche fondamentale : augmentation importante du nombre de marqueurs protéiques

Limites actuelles de la préparation des échantillons en spectrométrie de masse

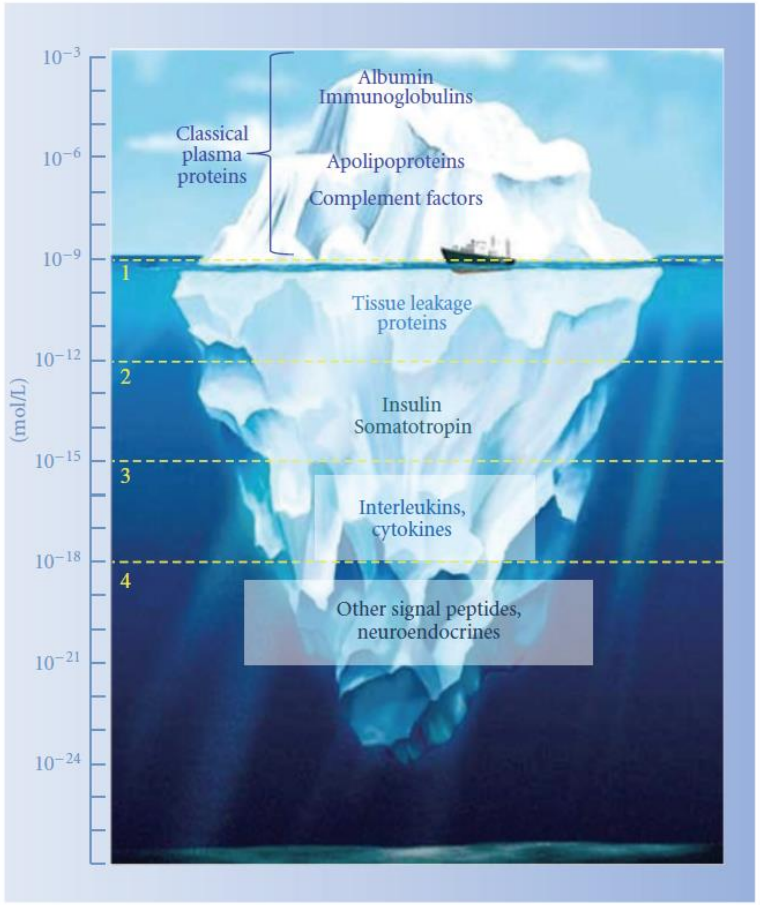


FIGURE 1: Illustrative iceberg representation of high dynamic range of proteins found in blood

Avantages de la spectrométrie de masse pour la découverte et la quantification de biomarqueurs :

1. Détection des isoformes des protéines et des modifications
2. Capacité de multiplexage

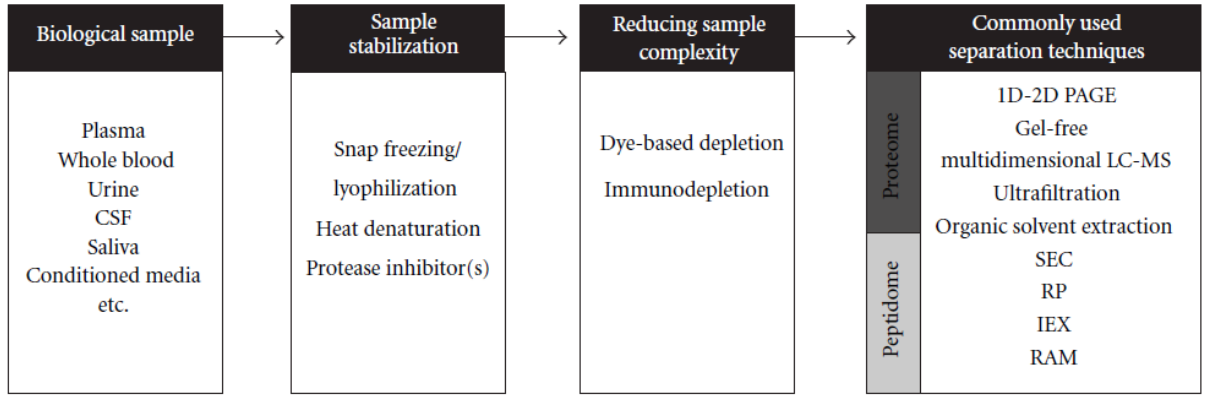


FIGURE 2: Schematic overview of methods and techniques used in proteome and peptidome analyses for sample preparation prior to LC MS/MS.

Finoulst *et al* (2011) **J Biomed Biotech**

La protéomique dans la pratique clinique

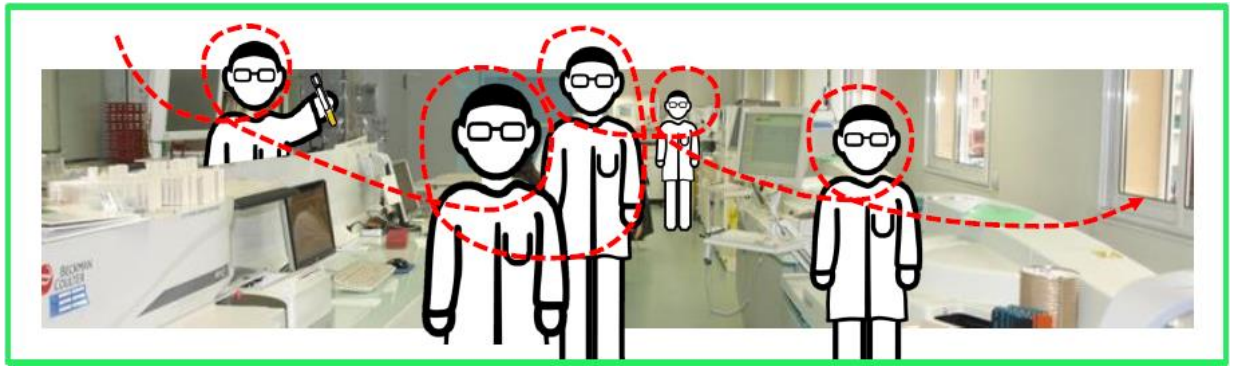
La protéomique basée sur la spectrométrie de masse dans la pratique clinique…

Besoin d'automatiser, de standardiser et de simplifier les étapes de préparation de l'échantillon

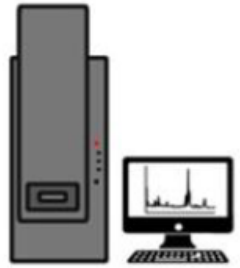
Traitement de l'échantillon immédiat

Assure l'intégrité des protéines et évite leurs dégradations

~ 2 jours



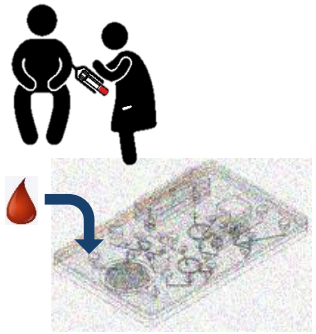
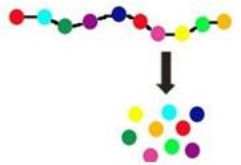
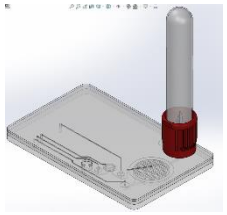
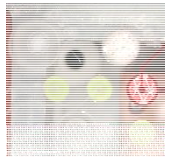
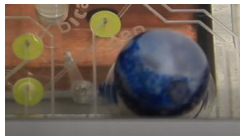
Spectromètre de masse



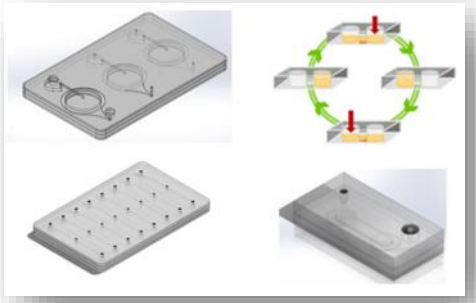
~ 2 h

La plateforme PepS

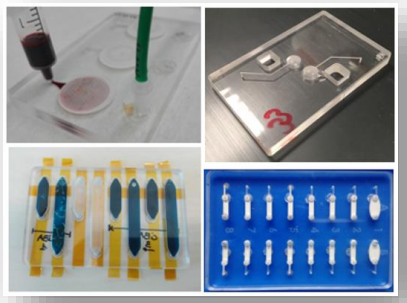
Process flow pour la préparation des échantillons de sang avant l'analyse MS

	Aspiration	Séparation	Calibration	Déplétion	Digestion	Stockage
Etapes	Injection de l'échantillon sanguin	Séparation du plasma	Calibration du volume et protéines standards	Déplétion en albumine	Digestion protéique	Stockage des peptides
						
Solutions technologiques	Interfaçage direct avec le Vacutainer®	Filtration intégrée du sang	Protéines standards (PSAQ) lyophilisées dans la chambre microfluidique	Déplétion intégrée avec des billes de Cibacron®	Digestion intégrée avec de la trypsine lyophilisée	Stockage intégré sur une phase inverse
						

Intégration et automatisation de toutes les étapes pré-analytiques



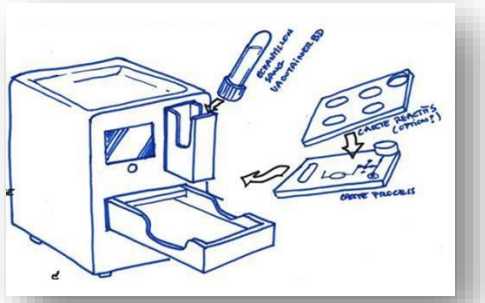
Conception module par module



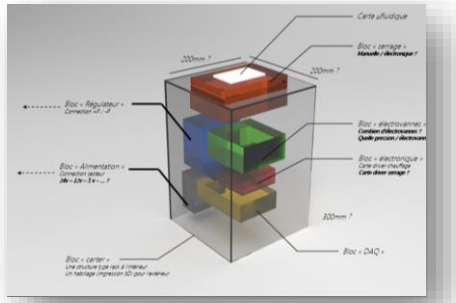
Réalisation des modules tests unitaires

Conception et intégration

PEPS – Carte microfluidique



Design

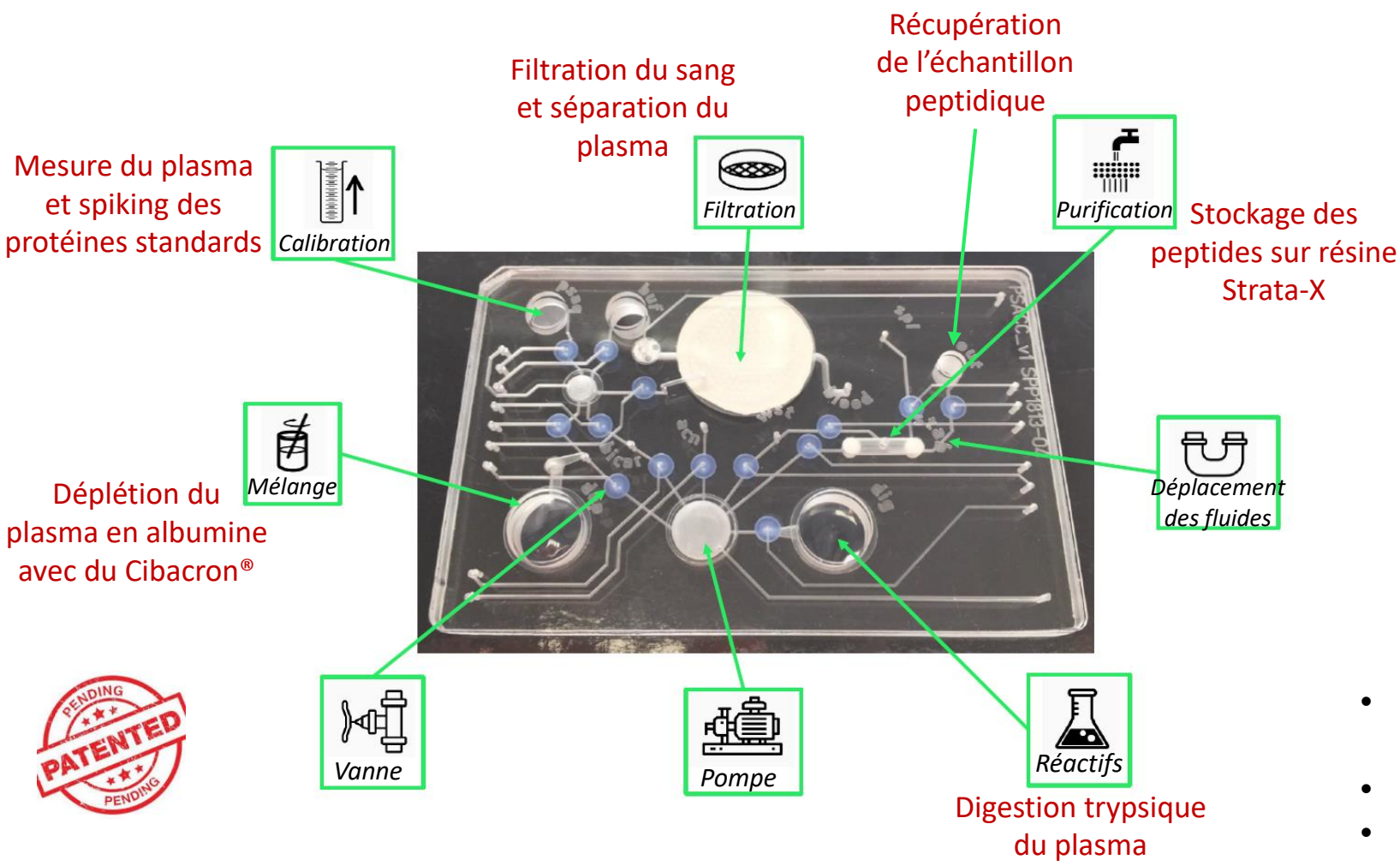


Architecture

Conception

PEPS - Instrument

Plateforme microfluidique PepS (Peptide Saver)



- Unité de contrôle pneumatique (régulateurs de pression + électrovannes)
- Collecteur pneumatique : « manifold »
- Contrôle électronique
- Eléments chauffants
- Porte carte avec système de serrage

Carte microfluidique (format carte de crédit)

Standardisation au CEA-Leti-DTBS

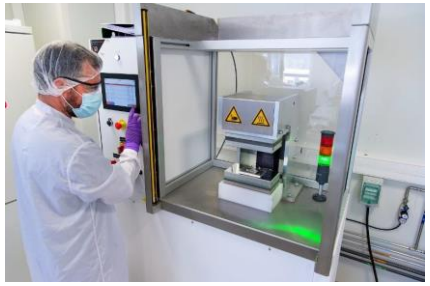
- **Designs, matériaux, procédés de fabrication adaptés à la microfabrication**
- **Leader de la standardisation microfluidique**
  - Leader de ISO TC/48/WG3 & CEN TC 332/WG7 – Microfluidic devices
- **Infrastructures à l'état de l'art pour le prototypage / microfabrication**

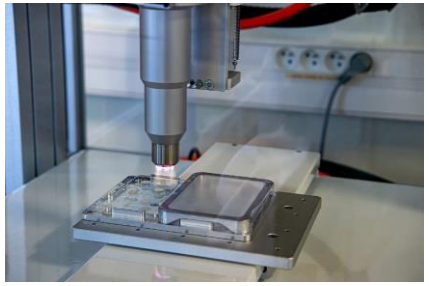
Microfluidics Association

ISO

Salles Blanches du LETI

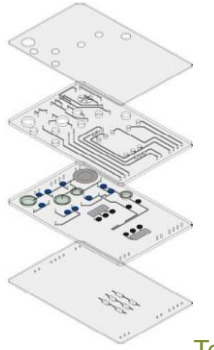
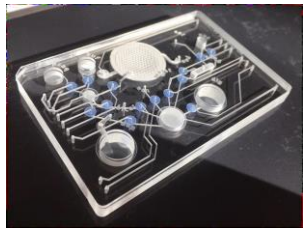
Micro-usinage de précision de polymères et moules aluminium

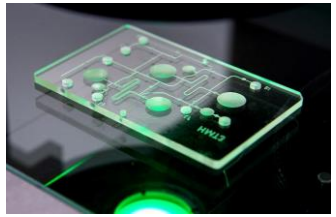
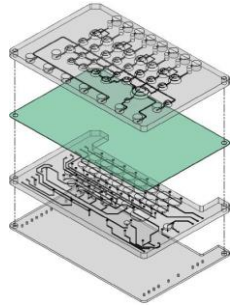

Thermoformage et scellement thermique


Plasma atmosphérique

Laminage film silicone

Assemblage final

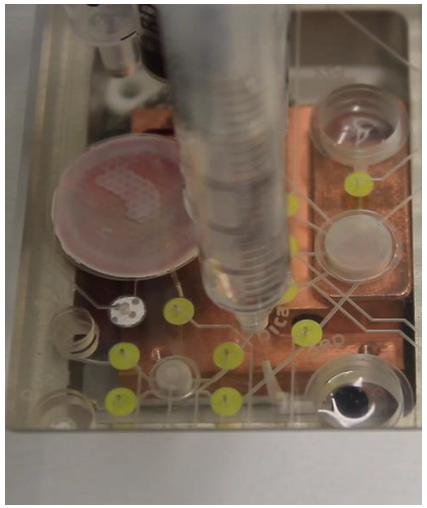


Technologie vannes



Technologie flow-stretch

Soutien de l'inflexion CEA sur les dispositifs médicaux

Plateforme microfluidique PepS en fonctionnement

Injection du sang (vitesse réelle)

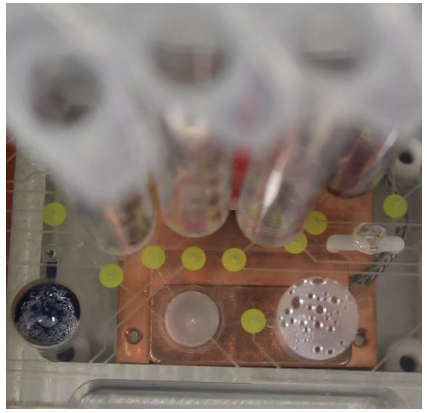


Extraction du plasma (vitesse X4)

Mesure de 50µL de plasma avec standards lyophilisés (vitesse X8)

Déplétion en albumine du plasma avec Cibacron® blue (vitesse X16)

Digestion avec trypsine lyophilisée (vitesse X8)



Stockage des peptides purifiés sur résine Strata-X (vitesse X8)

Résultats

Résultats pour le mode « découverte de nouveaux biomarqueurs »

➢ Comparaison des performances pour la préparation des échantillons avec le protocole de référence

✓ **Avec PepS** : identification de 579 protéines
✓ **Avec le protocole de référence « manuel »** : identification de 535 protéines
✓ **Bonne répétabilité**

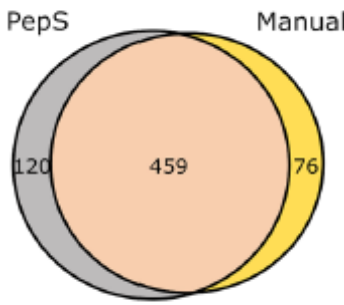
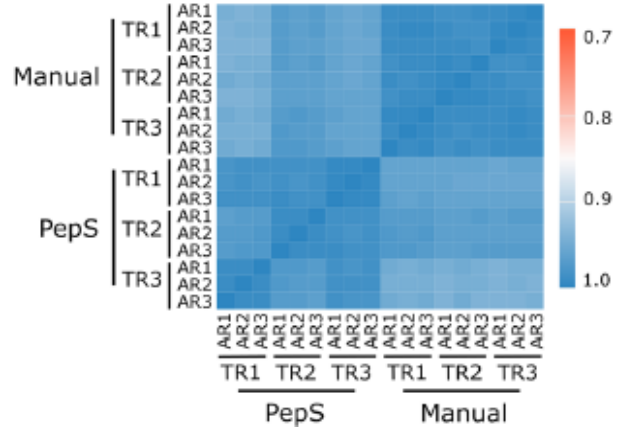
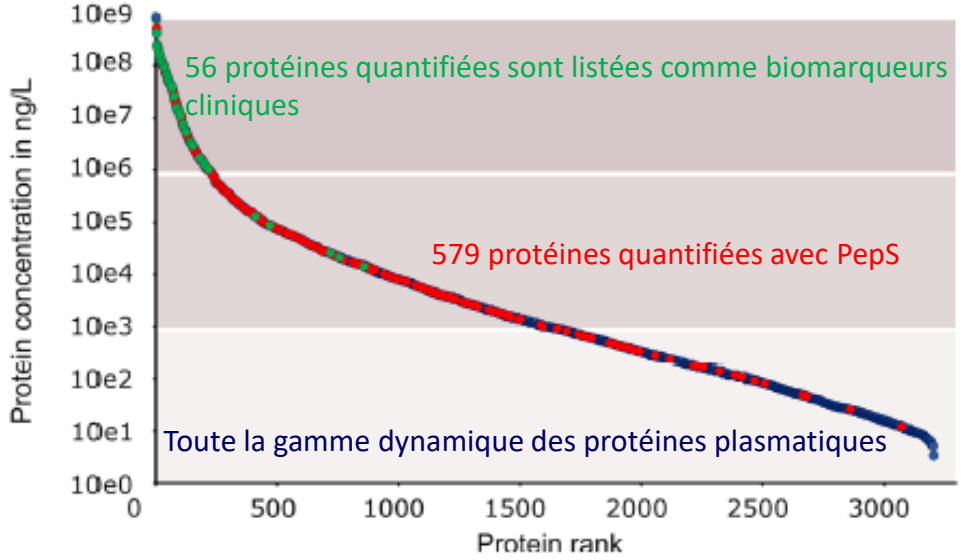


Diagramme de Venn



Coefficient de Pearson calculé pour chaque paire de réplicats techniques (TR) et de réplicats analytiques (AR) sur la base des valeurs de quantification

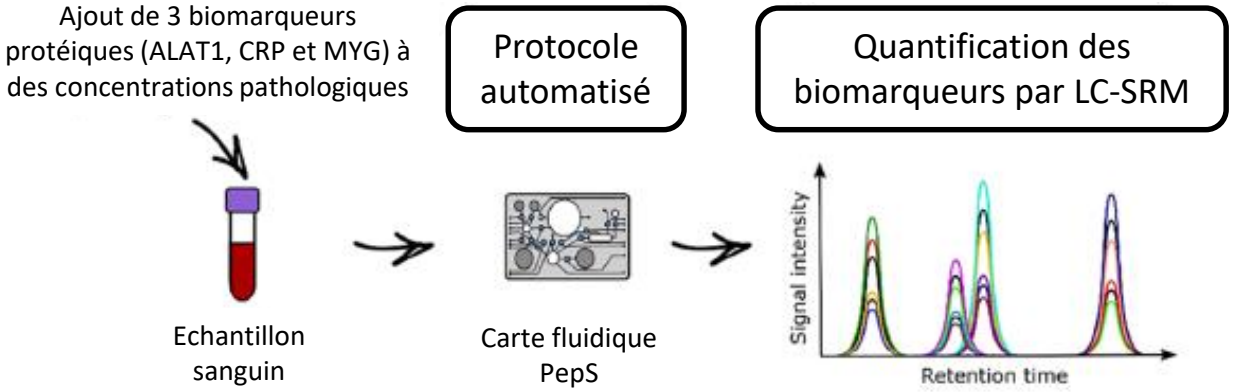
➢ Les protéines quantifiées avec PepS sont distribuées sur 8 ordres de grandeurs dans la gamme dynamique pour le plasma *(Uhlen and co-workers)*



Gilquin, Cubizolles, Den Dulk *et al* (2021) **Anal Chem**

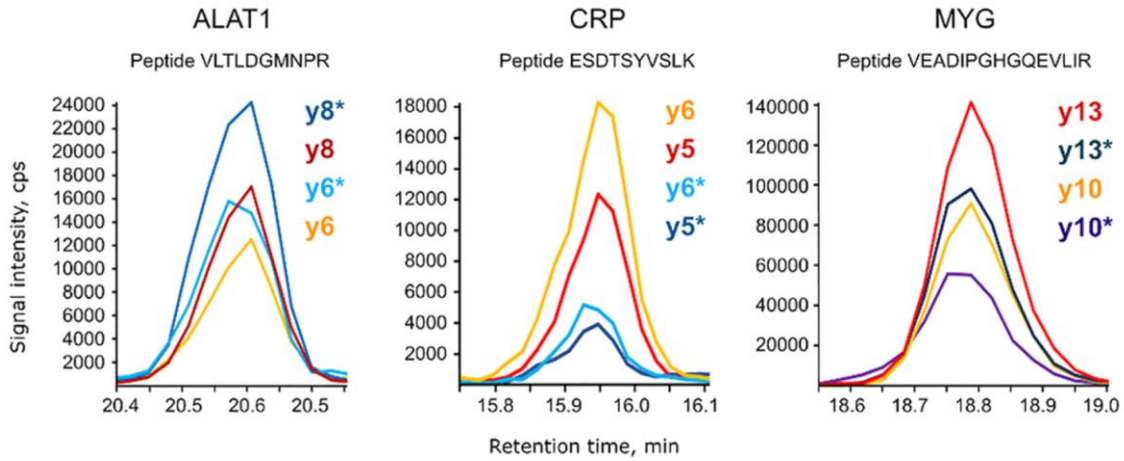
Résultats pour le mode « ciblé » pour la quantification de biomarqueurs

➢ Quantification de 3 biomarqueurs après préparation de l'échantillon avec PepS



Gilquin, Cubizolles, Den Dulk *et al* (2021) **Anal Chem**

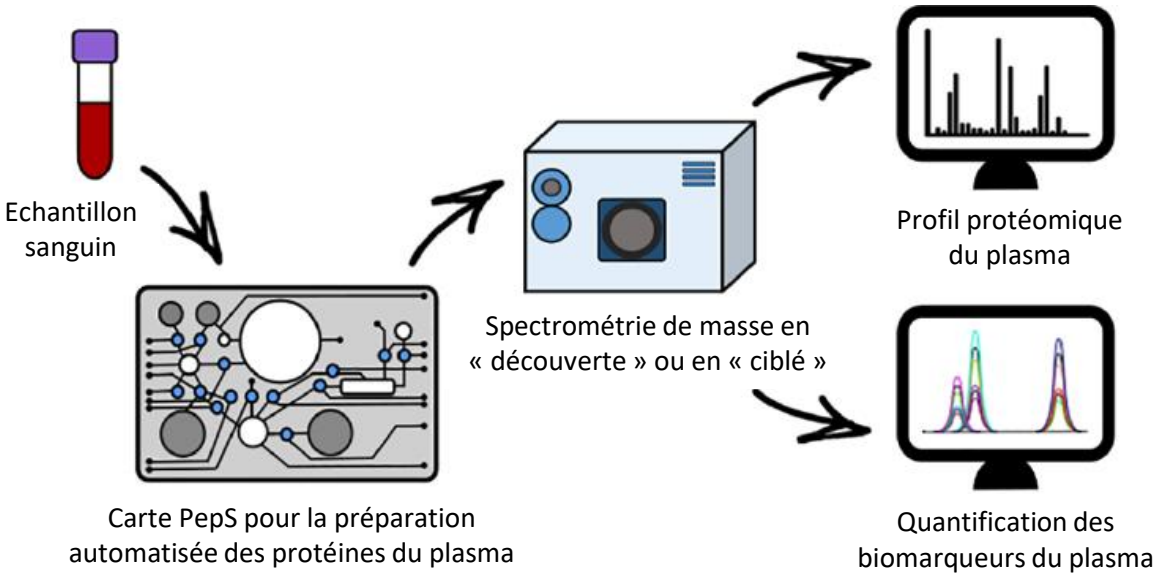
LC-SRM a extrait les chromatogrammes ioniques des peptides de signature pour les 3 biomarqueurs cibles. Seules les 2 meilleures transitions du peptide sont attribuées pour améliorer la lisibilité.



➢ Quantification reproductible des 3 biomarqueurs par LC-SRM

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives



<u>Évaluation de PepS pour le mode découverte</u>

Déplétion en albumine efficace et stabilisation d'un ensemble de peptides protéolytiques pour le profilage du protéome plasmatique

<u>Évaluation de PepS pour les tests multiplexés</u>

Quantification reproductible de 3 biomarqueurs par LC-SRM : ALAT1, CRP et myoglobine

- Le système PepS permet de traiter <u>automatiquement</u> le protéome plasmatique du sang <u>en 2 h</u>
- PepS : dispositif de « preuve de concept », entre une perspective de produit pour la clinique et un instrument de recherche pour la découverte de biomarqueurs

Remerciements

FINANCEMENTS

INSTITUT CARNOT CEA LETI
Agence Nationale de la Recherche ANR
grail
Grenoble Alliance for Integrated Structural & Cell Biology

clinatec® Benoit GILQUIN

leti ceatech

Y SPOT Charles-Elie GOUJON
Gorka ARRIZABALAGA

Département des technologies pour la santé et la biologie, Laboratoire de systèmes microfluidiques et de bioingénierie

Myriam CUBIZOLLES
Remco DEN DULK
Frédéric REVOL-CAVALIER
Manuel ALESSIO
Camille ECHAMPARD
Patricia LAURENT
Fabrice NAVARRO
Marie-Line COSNIER

irig INSTITUT DE RECHERCHE INTERDISCIPLINAIRE DE GRENOBLE

EDyP Laboratoire

Annie ADRAIT
Mathilde LOUWAGIE
Yohann COUTÉ
Virginie BRUN