

## Nouvelle stratégie analytique pour la mesure de vitesse de renouvellement de protéines musculaires spécifiques in vivo

C. Migné(1) • T. Berton(1) • V. Patrac(2) • S. Walrand(2) • B. Bouchon(3) • E. Pujos-Guillot(1)

(1)INRA, UMR 1019, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Nutrition Humaine, Saint Genès Champanelle, France • (2)Clermont Université, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France • (3)Clermont-Université, Univ. d'Auvergne et INSERM, UMR990, Clermont-Ferrand, France

Depuis plusieurs décennies, les traceurs isotopiques sont très fréquemment utilisés dans les études du métabolisme protéique. Les mesures d'enrichissements isotopiques ([1] et [2]) permettent en effet de calculer les vitesses de synthèse protéique de différentes fractions telles que les protéines myofibrillaires, sarcoplasmiques ou mitochondriales.

Une méthodologie tout à fait innovante, présentée ici, a rendu possible l'étude des vitesses de renouvellement de protéines musculaires spécifiques [3]. Les protéines présentes dans une fraction d'intérêt sont tout d'abord séparées par des techniques électrophorétiques (gels bi-dimensionnels). Les spots obtenus sont prélevés des gels 2-D pour être identifiés par MALDI-TOF.

Les travaux présentés ont consisté au développement d'une méthode de mesure d'enrichissements isotopiques, au sein de ces protéines spécifiques, par chromatographie gazeuse /spectrométrie de masse triple quadripôle (GC-QqQ). Une purification des spots a tout d'abord été mise au point : les protéines sont hydrolysées et les hydrolysats sont purifiés et concentrés par extraction en phase solide. Les acides aminés obtenus sont analysés, après dérivation, par ionisation chimique et GC-QqQ. Les paramètres chromatographiques ainsi que les conditions d'ionisation et de détection (énergie de collision, transitions) ont été optimisés. La méthode développée nous permet de garantir une grande robustesse et une sensibilité qui nous permet de travailler avec des échantillons faiblement concentrés et faiblement enrichis.

La méthodologie développée a été appliquée à des échantillons de muscles préalablement marqués in vivo par la 1-L-[ring-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-phénylalanine, injectée à des rats par la technique de « flooding dose ». L'emploi de ce traceur, pourvu de six <sup>13</sup>C, nous permet de calculer un rapport isotopique en utilisant les abondances relatives des masses M+6 et M+2.

Grâce à cette nouvelle procédure, il sera maintenant envisageable de calculer des vitesses de renouvellement de protéines isolées, parfois peu présentes, impliquées plus particulièrement dans certaines situations physiopathologiques musculaires ou d'interventions nutritionnelles.

[1] Leucine incorporation into mixed skeletal muscle protein in humans. Nair KS, Halliday D, Griggs RC. *Am J Physiol*. 1988 Feb; 254 (2):208-213.

[2] Protein turnover modifications induced by the protein feeding pattern still persist after the end of the diets. Arnal MA et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 May; 278(5):902-909.

[3] In vivo measurement of synthesis rate of individual skeletal muscle mitochondrial proteins. Jaleel A et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Nov; 295 (5):1255-1268.