

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**DÉVELOPPEMENT D'OUTILS PROTEOMIQUES BASÉS SUR LA
SPECTROMÉTRIE DE MASSE**

Par

GENEVIÈVE DUFRESNE-MARTIN

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de

Maître en Sciences (M.Sc.) en Pharmacologie

14 juin 2004

*pas de page I et
pas de pages 1 à 13
OK blaque*



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 0-494-00245-X
Our file *Notre référence*
ISBN: 0-494-00245-X

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
RÉSUMÉ.....	xiii
I. INTRODUCTION.....	14
1. CANCER.....	14
1.1 Cycle cellulaire.....	14
1.2 Points de contrôle.....	16
1.3 Tumeur.....	18
1.4 Oncogènes.....	21
2. RÉSEAU MYC/MAX/MAD.....	22
3. OUTILS PROTÉOMIQUES.....	26
3.1 La protéomique.....	26
3.2 2D-SDS-PAGE.....	27
3.3 Spectrométrie de masse.....	29
3.3.1 Définition et principe général.....	29
3.3.2 Différents types d'ionisation.....	32
3.3.3 MALDI.....	33
3.3.3.1 Ionisation.....	33
3.3.3.2 Les matrices.....	34
3.3.4 Electrospray.....	36

3.3.4.1 Ionisation.....	36
3.3.5 L'analyseur en temps de vol	37
3.3.5.1 Les modes linéaire et réflectron.....	38
3.3.6 Spectrométrie de masse tandem	40
3.3.7 Séquençage des peptides.....	41
4. PROJET DE RECHERCHE.....	43
4.1 Mise en situation.....	43
4.2 Hypothèse.....	44
4.3 Méthodologie.....	45
4.4 But de l'étude.....	45
II. MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	47
Matériel.....	47
1D-SDS-PAGE.....	48
Immunobuvardage de type Western et détection au ECL.....	48
Culture cellulaire des cellules EcR 293.....	49
Préparation des extraits nucléaires.....	49
Préparation des homogénats de foie de rat.....	50
Dosage protéique.....	50
Focalisation isoélectrique et équilibrage des bandes.....	51
Digestion sur la membrane.....	51
Digestion dans le gel.....	52
Précipitation des protéines.....	53
Digestion en solution des extraits nucléaires.....	53

Digestion en solution de la BSA.....	53
Analyse sur spectromètre de masse.....	54
Recherche sur banque de données.....	54
III. RÉSULTATS.....	55
5.1 Stratégie.....	55
5.2 Compatibilité avec des agents classiques d'immuno-détection.....	56
5.3 Sensibilité.....	64
5.4 Cartographie par mesure des masses moléculaires.....	65
5.5 Identification de protéines phosphorylées sur le résidu tyrosine.....	68
5.6 Extraits nucléaires EcR 293.....	70
5.6.1 Identification de protéines phosphorylées.....	71
5.6.2 Identification de protéines nucléaires par 2D-LC-MS/MS.....	75
5.6.3 Marquage protéolytique.....	77
IV. DISCUSSION.....	79
V. CONCLUSION.....	89
VI. ANNEXE I.....	91
VII. ANNEXE II.....	93
REMERCIEMENTS.....	97
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	98

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Cycle cellulaire de cellules mammifères en culture. (SNUSTAD D.P. et SIMMONS M.J., 2000)
- Figure 2.** Régulateurs du le cycle cellulaire impliqués dans le cancer (HUNTER T. et PINES J., 1994)
- Figure 3.** Stade de prolifération maligne et d'invasion métastatique. (A) Cellule transformée, isolée au sein d'un tissu. (B) La cellule transformée commence à se diviser au milieu de ses voisines au repos, pour former un nodule de cellules tumorales. (C) Les cellules de la tumeur envahissent la lame basale qui borde le tissu. (D) Les cellules tumorales atteignent le courant sanguin qui va les disperser dans les autres tissus de l'organisme. (Figure adaptée à partir de LODISH *et al*, 1995)
- Figure 4.** Le réseau Myc/Max/Mad. (A) Les flèches indiquent les interactions existantes entre les membres du réseau. (B) Expression relative des protéines du réseau Myc/Max/Mad (Figure adaptée à partir de LUSCHER B., 2001).
- Figure 5.** Modèle du réseau des facteurs de transcription Myc/Max/Mad ainsi que de leur association. (Figure adaptée à partir de AMATI B. et LAND H., 1994)
- Figure 6.** Schéma général d'une électrophorèse bidimensionnelle (2D-SDS-PAGE)
- Figure 7.** Incorporation de deux isotopes stables durant la protéolyse (Figure tirée de YAO X. *et al*, 2003)

- Figure 8.** Principe d'un spectromètre de masse
- Figure 9.** Schéma de l'ionisation d'un échantillon (peptide) par MALDI.
- Figure 10.** Principe de l'électrospray (A) et de la génération des ions (B).
- Figure 11.** Schéma d'un spectromètre de masse MALDI-TOF avec un détecteur linéaire et un détecteur réflectron.
- Figure 12.** Principe d'un spectromètre de masse tandem
- Figure 13.** (A) Schéma d'un peptide. (B) Fragments N- et C-terminal générés après fragmentation en spectrométrie de masse.
- Figure 14.** Ions générés par la fragmentation
- Figure 15.** Approche d'immuno-détection couplée au MALDI-MS
- Figure 16.** Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite à un clivage tryptique de 1 pmol BSA en solution. (B = BSA et K = kératine)
- Figure 17.** Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de 1 pmol BSA transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20 et immuno-déTECTÉE. (B = BSA, K = kératine et T = trypsine)
- Figure 18.** Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de 1 pmol BSA transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-déTECTÉE. (B = BSA, K = kératine et T = trypsine)
- Figure 19.** Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de 1 pmol BSA transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde, immuno-déTECTÉE et lavée avec une solution contenant DMF/HCOOH. (B = BSA et T = trypsine)

- Figure 20.** Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de 1 pmol BSA transférée sur membrane de NC, bloquée avec du PVP-40, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée. (B = BSA, K = kératine et T = trypsine)
- Figure 21.** Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de 1 pmol BSA transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée avec 1% de lait en poudre inclus dans la solution. (B = BSA, K = kératine, C = caséine et T = trypsine)
- Figure 22.** Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage d'un morceau de membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée avec 1% de lait en poudre inclus dans la solution. (K = kératine et C = caséine)
- Figure 23.** Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de 100 femtomol de BSA transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée. (B = BSA, K = kératine et T = trypsine)
- Figure 24.** Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de la β -galactosidase transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée.

- Figure 25.** Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de l'ovalbumine transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée.
- Figure 26.** Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de la transferrine transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée.
- Figure 27.** Identification de protéines phosphorylées suite à une séparation par 2D-SDS-PAGE d'un homogénat de foie de rat. (A) Membrane de NC bloquée au Tween 20 et colorée à l'encre d'Inde. (B) Détection des protéines phosphorylées sur le résidu tyrosine par anticorps monoclonal antiphosphotyrosine-HRP (dilution 1/750).
- Figure 28.** Peptides tryptiques obtenus par MALDI-MS suite à l'immuno-détection effectuée à la Figure 27.
- Figure 29.** Schéma général de l'approche utilisée avec les extraits nucléaires provenant des cellules EcR 293.
- Figure 30.** Extrait nucléaire de cellules EcR 293 séparé par 2D-SDS-PAGE.
- Figure 31.** Schéma général du 2D-LC-MS/MS
- Figure 32.** Chromatogrammes obtenus suite au 2D-LC-MS/MS des extraits nucléaires digérés en solutions.
- Figure 33.** Incorporation partielle de deux atomes de ^{18}O déterminée par MALDI-TOF-MS sur des extraits nucléaires digérés à l'aide de la trypsine.

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I.** Exemples de matrices existantes ainsi que leur substrat.
- Tableau II.** Concentration de contaminants généralement tolérés par les matrices.
- Tableau III.** Sommaire des résultats obtenus pour l'identification des protéines phosphorylées sur la sérine isolées à partir d'extraits nucléaires des cellules Ecr293.
- Tableau IV.** Résultats comparatifs de MALDI-TOF-MS obtenus pour la BSA avec différentes conditions lors de l'immunobuvardage de type Western.
- Tableau V.** Protéines identifiées par 2D-LC-MS/MS à partir des extraits nucléaires des cellules EcR 293.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACN	Acétonitrile
BSA	Albumine de sérum bovin
CE	Énergie de collision (Collision Energy)
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)diméthylamino]-1-propanesulfonate
1-D	Une dimension
2-D	Deux dimensions
Da	Dalton (masse moléculaire)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	N,N-diméthylformamide
DTT	Dithiothréitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique acide
ESI	Ionisation électrospray (Electrospray Ionization)
FBS	Sérum foetal bovin
HCOOH	Acide formique
HEPES	acide (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonique])
HRP	Horseradish peroxidase
IEF	Focalisation isoélectrique
IMAC	Immobilised metal affinity capture
kDa	Kilodalton (masse moléculaire)
LC	Chromatographie liquide

M	Molaire (concentration)
mA	Milliampères
MALDI	Désorption/ionisation laser assistée par matrice (Matrix-assisted laser desorption/ionization)
MS	Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
MS/MS	Spectrométrie de masse tandem
m/z	masse/charge
NC	Nitrocellulose
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonate d'ammonium
nm	Nanomètre
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS	Solution saline de phosphates tamponés (phosphate buffered saline)
pI	Point isoélectrique
Q	Quadripôle
rpm	Révolutions par minute
SDS	Sodium dodécyl sulfate
TEMED	N, N ,N', N'-tétraméthyléthylène diamide
TOF	Temps de vol (Time of Flight)
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
TFA	Acide trifluorique
UV	UltraViolet
V	Volts
W	Watts

RÉSUMÉ

DÉVELOPPEMENT D'OUTILS PROTEOMIQUES BASÉS SUR LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de Maître en Sciences (M.Sc.) en Pharmacologie

Par : Geneviève Dufresne-Martin

Département de pharmacologie
Université de Sherbrooke

Depuis les deux dernières décennies, l'analyse protéomique a été un point d'intérêt de plusieurs recherches menant à une meilleure compréhension de plusieurs voies biologiques. Comprendre comment une cellule réagit face à une condition comparativement à une autre est crucial. Afin de pouvoir faire ceci, des extraits cellulaires totaux ou des compartiments cellulaires peuvent être analysés par électrophorèse bidimensionnelle ou comparés en utilisant la chromatographie liquide bidimensionnelle couplée à un spectromètre de masse. Ces techniques sont utilisées pour étudier des mélanges complexes de protéines et comparer leur niveau d'expression, les modifications post-traductionnelles (comme la phosphorylation) et divers processus cellulaires.

Dans cette étude, une technique a été développée, avec des protéines standard, afin de coupler l'immunobuvardage de type western avec la spectrométrie de masse directement au lieu d'utiliser un deuxième gel afin de pouvoir faire l'identification protéique. Grâce à cette étude et au développement de cette technique, des protéines phosphorylées sur les résidus tyrosine et sérine ont été identifiées par MALDI-TOF-MS suite à une séparation par 2D-SDS-PAGE et un immunobuvardage de type western d'homogénat de foie de rat et d'extraits nucléaires EcR 293. Nous avons pu identifier plusieurs protéines contenues dans les extraits nucléaires par 2D-LC-MS/MS.

L'identification des protéines par 2D-LC-MS/MS sera utilisée en combinaison avec une colonne de cuivre afin de simplifier le mélange de peptides en sélectionnant seulement ceux qui possèdent des résidus histidine et/ou cystéine et d'identifier les protéines les moins abondantes. La quantification des niveaux d'expression des protéines contenues dans les extraits cellulaires à l'aide d'un marquage avec l'eau (H_2^{18}O) n'a pu être effectuées puisque l'incorporation de deux molécules d'oxygène ^{18}O n'a pas été optimale (i.e. de 100%). Un marquage *in vivo* des protéines synthétisées dans la cellule avec des acides aminés isotopiquement différents de ceux normalement utilisés dans le milieu de culture lors de la culture cellulaire est envisagé.

INTRODUCTION

1. LE CANCER

1.1 Le cycle cellulaire

Afin qu'un organisme puisse proliférer, trois événements doivent se produire au niveau cellulaire : (1) la masse cellulaire doit être dupliquée; (2) le génome doit être reproduit; et (3) un processus de division cellulaire doit se produire pour répartir de façon équitable le matériel génétique provenant de la cellule mère à chaque cellule fille afin de perpétuer la lignée cellulaire. Dans les cellules eucaryotes, ce processus est appelé le cycle cellulaire qui est présenté en Figure 1.

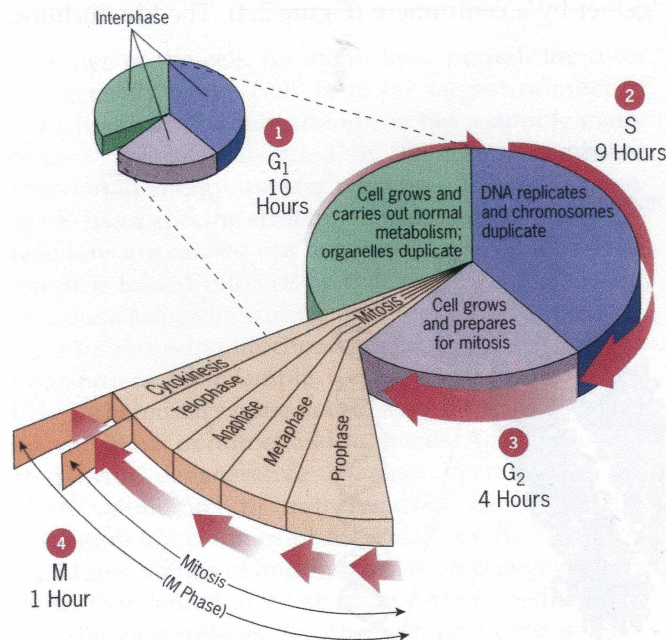


Figure 1. Cycle cellulaire de cellules mammifères en culture. (SNUSTAD D.P. et SIMMONS M.J., 2000)

Le cycle cellulaire peut être divisé en 4 phases bien qu'en fait tout ce processus soit fait en continu. Lors de la première phase, G1, la masse cellulaire croît et augmente suite à la division cellulaire. La phase G1 (G pour interruption ou «gap») sert essentiellement à la croissance cellulaire, à la synthèse d'ARN et de protéines et à la préparation de l'ADN pour la réplication. Suite à ceci, pendant la phase S ou phase de synthèse, le matériel génétique est répliqué. Lorsque la réplication de l'ADN est terminée, la cellule entre dans une autre phase de croissance appelée G2. À ce moment, la cellule se prépare à la mitose qui suivra, ou phase M qui est l'étape finale complétant le cycle cellulaire. La mitose, précédée par l'interphase (consistant en les phases G1, S et G2 du cycle cellulaire), peut être divisée en cinq phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. La mitose entraîne la ségrégation d'un jeu diploïde ($2n$) de chromosomes dans chaque cellule fille. Ces dernières deviennent donc identiques à elles-mêmes et à la cellule mère.

Il existe deux modes de division cellulaire dans les cellules eucaryotes : la méiose et la mitose dont nous venons de discuter brièvement. Lors de la méiose, mode de reproduction sexuelle, la cellule mère diploïde ($2n$) donne des cellules filles haploïdes (n). Tandis que lors de la mitose, une cellule diploïde ($2n$) donne deux cellules filles diploïdes ($2n$). En observant le cycle cellulaire de plus près, on peut voir que lorsque les cellules sont en phase G1, elles sont diploïdes ($2n$) tandis que dans la phase G2 elles ont un contenu d'ADN tétraploïde ($4n$). Les cellules en phase S dupliquent activement l'ADN et ont donc un contenu variant entre $2n$ et $4n$.

1.2 Points de contrôle

Le cycle cellulaire est donc constitué de périodes de croissance, de synthèse d'ADN et de division. La durée de ce cycle est contrôlée par des signaux chimiques externes et internes. La transition d'une phase à une autre du cycle cellulaire requiert l'intégration de signaux chimiques spécifiques et une réponse précise face à ces derniers. Si ces signaux ne sont pas correctement intégrés par la cellule, la cellule peut devenir cancéreuse. Durant le cycle cellulaire, il existe des points de contrôle, identifiés pour la première fois par HARTWELL L. *et al* (1989), qui permettent à la cellule de s'engager dans le cycle cellulaire ou d'arrêter afin que la cellule puisse terminer la synthèse de l'ADN, ou réparer des aberrations dans l'ADN qui auraient pu survenir lors d'une étape précédente ou encore amener la cellule à une mort programmée ou apoptose. Une fois le cycle cellulaire engagé, il n'y a pu de possibilité de retourner en arrière. Toutes les phases du cycle cellulaire sont sujettes à des points de contrôle. Les points de contrôle importants et les plus étudiés se trouvent à la transition des phases G1/S (REED S.I., 1997) et des phases G2 et M. Un troisième point de contrôle est situé en métaphase, ce dernier sert à assurer l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale afin de permettre une bonne séparation. Le point de contrôle de G1/S permet de s'assurer que la cellule ne commence pas à synthétiser de l'ADN à moins que tous les nutriments nécessaires soient présents et que l'ADN soit intact. Le point de contrôle G2/M sert à arrêter le cycle cellulaire si la réplication de l'ADN n'est pas complète. Un grand nombre de points de contrôle interviennent lors de la mitose pour garantir que la cellule n'essaie pas de se diviser avant d'avoir réalisé tous les événements antérieurs nécessaires. Un contrôle important vérifie que tout l'ADN a été dupliqué; d'autres points

de contrôle déterminent si l'ADN est endommagé et reportent la mitose jusqu'à ce qu'il est été réparé. Une machinerie moléculaire extrêmement complexe agit au niveau de ces points de contrôle. Deux types de protéines sont reconnues comme faisant partie de cette machinerie : les cyclines et les protéines kinases dépendant des cyclines (CDK) (VERMEULEN K *et al*, 2003).

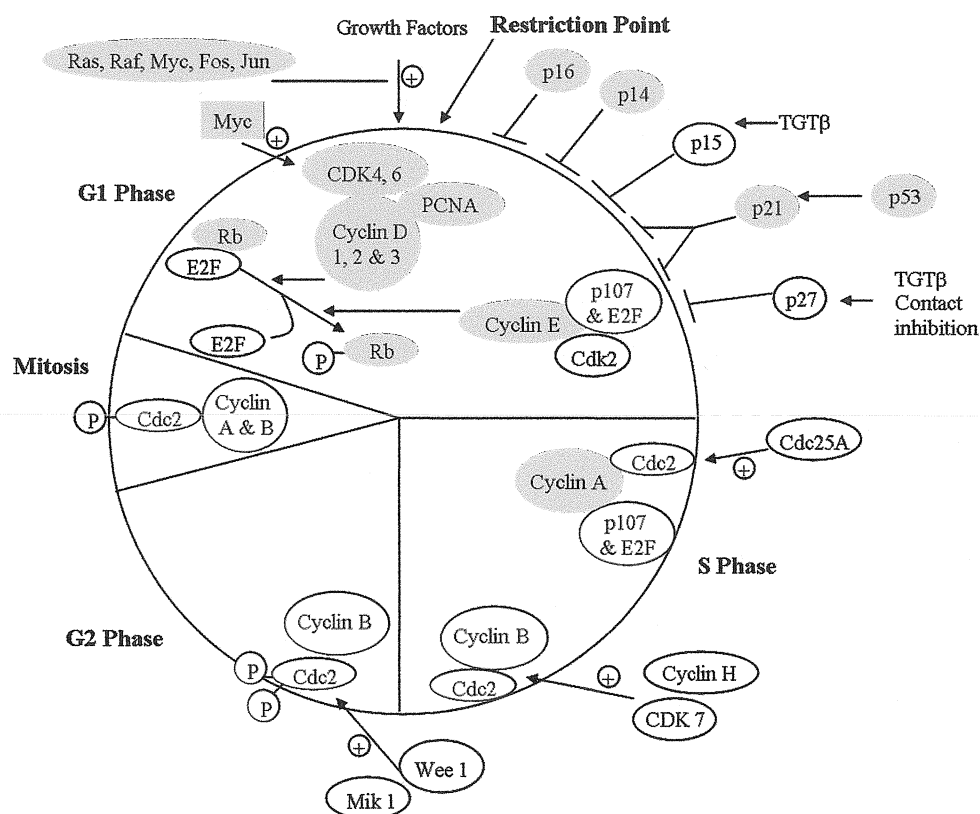


Figure 2. Régulateurs du le cycle cellulaire impliqués dans le cancer (HUNTER T. et PINES J., 1994)

Les CDK activent ou inhibent des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire en phosphorylant les sérines ou thréonines des sites régulateurs en utilisant l'adénosine triphosphate (ATP) comme donneur du groupement phosphate. La formation d'un complexe CDK-cycline est essentielle à l'activité des CDK. Différents

complexes de CDK-cyclines sont actifs durant chaque phase du cycle cellulaire et c'est la cycline choisie qui détermine la protéine qui sera phosphorylée par le dimère CDK-cycline. Les cyclines sont des protéines instables qui sont rapidement dégradées comparativement aux CDK dont l'expression est à peu près constante au cours du cycle cellulaire. Différentes cyclines ainsi que des CDK impliqués dans le cycle cellulaire peuvent être observés en Figure 2.

1.3 Tumeur

Une des caractéristiques importantes commune à toutes les cellules est qu'elles ont une durée de vie définie. Les cellules cancéreuses ou tumorales constituent une exception notable. Ces dernières ont perdu le contrôle normal de leur prolifération. Leur capacité à proliférer dans des endroits inappropriés ou à se propager indéfiniment peut être létale pour l'organisme dans lequel elles se sont formées. Trois étapes amènent une cellule vers un état cancéreux : l'immortalisation, la transformation et la métastase. L'immortalisation décrit la propriété de prolifération illimitée hors de tout control. La transformation caractérise le fait que les cellules ne sont plus soumises aux contraintes normales de croissance comme le besoin en facteurs de croissance. Les cellules cancéreuses ont donc une prolifération désordonnée menant à une augmentation du volume d'une partie d'un tissu ou d'un organe formant un nouveau tissu (néoplasie). Le cancer peut atteindre tous les organes ou tissus via la formation de métastases.

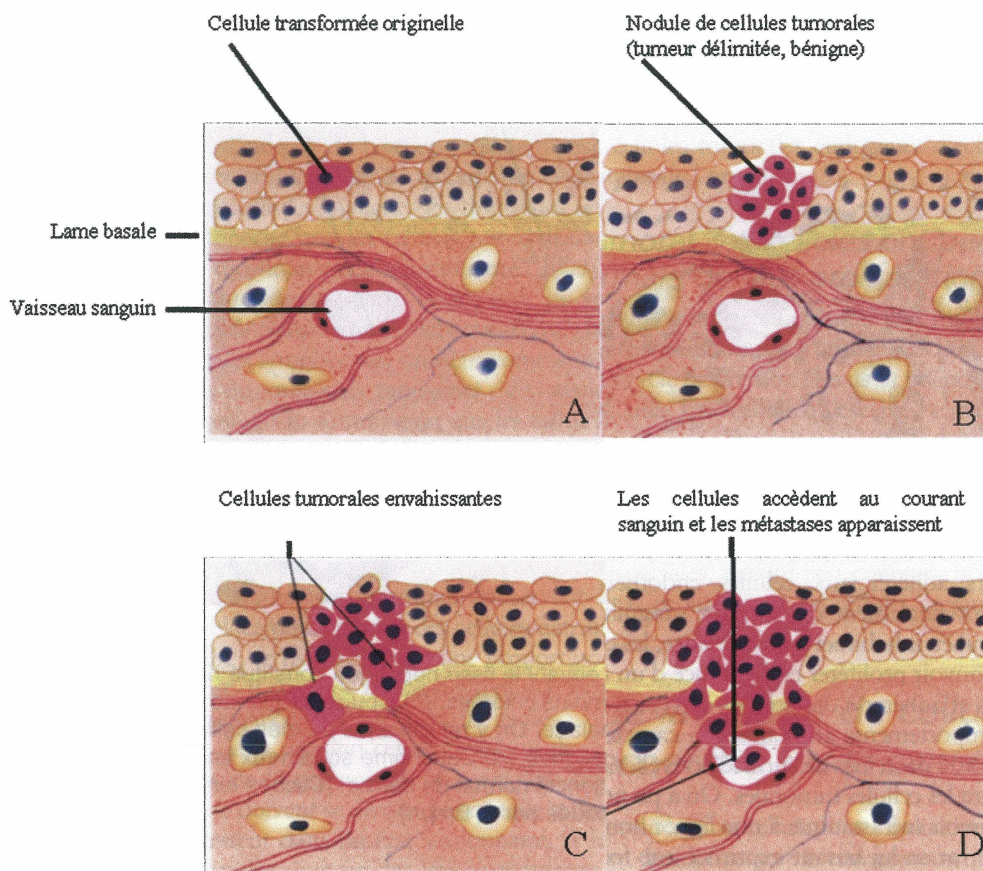


Figure 3. Stade de prolifération maligne et d'invasion métastatique. (A) Cellule transformée, isolée au sein d'un tissu. (B) La cellule transformée commence à se diviser au milieu de ses voisines au repos, pour former un nodule de cellules tumorales. (C) Les cellules de la tumeur envahissent la lame basale qui borde le tissu. (D) Les cellules tumorales atteignent le courant sanguin qui va les disperser dans les autres tissus de l'organisme. (Figure adaptée à partir de LODISH *et al*, 1995)

Lorsque la tumeur est circonscrite à un seul endroit par une capsule fibreuse, on parle d'une tumeur bénigne (Figure 3 A & B). Cette dernière n'est pas menaçante pour l'hôte à moins que son volume interfère avec le fonctionnement normal de l'organe ou

qu'elle produise des substances biologiques comme des hormones. On peut citer comme exemple de tumeurs bénignes les verrues. À ce stade les cellules tumorales ressemblent à des cellules normales. Les tumeurs deviennent malignes lorsque les cellules tumorales quittent leur tissu d'origine, envahissent un tissu voisin (Figure 3C) et pénètrent dans la voie sanguine ou lymphatique (Figure 3D) pour former des tumeurs secondaires ou métastases dans d'autres tissus de l'organisme. On peut alors dire que l'organisme est atteint d'un cancer. Les cellules d'une tumeur maligne ont une structure anarchique profondément modifiée par rapport au tissu d'origine.

La formation de cellules cancéreuses n'a pas une origine unique; de nombreux types de mécanismes cellulaires peuvent entraîner la formation d'une tumeur. Les mécanismes qui transforment une cellule normale en une cellule cancéreuse sont conditionnés par des facteurs chimiques (substances cancérogènes), physiques (radiations ionisantes) et viraux (oncogènes).

Selon l'organe atteint, le cancer se manifeste par une grande variété de signes cliniques, mais un diagnostic de plus en plus précoce, fondé essentiellement sur l'examen anatomopathologique (biopsie), permet d'instituer un traitement (chirurgie, radiations, chimiothérapie, immunothérapie) qui, dans de nombreux cas, amène la guérison. La plupart des agents utilisés dans la lutte contre le cancer sont des molécules qui causent des dommages à l'ADN, qui bloquent indirectement la synthèse d'ADN ou qui dérangent la stimulation hormonale de la croissance cellulaire (FOYE W.O., 1995).

1.4 Oncogènes

Les rétrovirus ont un rôle essentiel dans le processus de la cancérogenèse. Ces virus ont un génome composé d'ARN et ce dernier est utilisé pour synthétiser de l'ADN à l'aide de la transcriptase inverse («reverse transcriptase»). L'ADN est alors incorporé au génome de la cellule hôte et peut la rendre cancéreuse. Les gènes, provenant du virus, qui peuvent causer un cancer sont nommés oncogènes («v-*onc*»). Des études sur les rétrovirus ont permis la découverte au moins 20 oncogènes viraux différents (LODISH *et al*, 1995). Ces derniers peuvent être classés en cinq classes : (I) les facteurs de croissance (*sis*), (II) les récepteurs (*erb-A*, *erb-B*, *ros*, *fms*, *neu*), (III) les traducteurs intracellulaires (*src*, *raf*, *ras*), (IV) les facteurs de transcription nucléaires (*fos*, *myc*, *N-myc*, *myb*) et (V) les protéines régissant le cycle cellulaire (*RB* et *p53*). Ils peuvent être présents dans un rétrovirus et/ou une tumeur non virale et leur localisation cellulaire est très variée; membrane plasmique, cytoplasme, noyau.

Les protéines encodées par les oncogènes viraux sont homologues à des protéines cellulaires. Ces protéines sont générées par des gènes nommés proto-oncogènes («c-*onc*»). Les produits des *c-onc* jouent des rôles importants dans la régulation d'activités cellulaires. Une mutation dans un de ces gènes peut donc débalancer le cycle cellulaire et mener la cellule vers un état cancéreux. Il existe deux classes de gènes qui, lorsque mutés, peuvent contribuer à la formation d'un cancer : les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur. Les protéines produites à partir des gènes suppresseurs de tumeur (pRB, p53, pBRCA1 et pBRCA2) jouent un rôle dans plusieurs processus du cycle cellulaire. La protéine c-Myc provient de proto-oncogènes, l'ADN de ces derniers

peut être transloquée d'un site chromosomique lointain jusqu'au voisinage des gènes d'anticorps. À cet endroit le gène déplacé tombe sous la tutelle de la régulation des gènes d'anticorps et s'exprime de façon constitutive produisant la protéine oncogène (LODISH *et al*, 1995). Il n'y a donc plus de contrôle sur la production de la protéine. Une oncoprotéine induit un cancer soit parce qu'elle occupe un site inhabituel, soit parce qu'elle s'exprime à un niveau supérieur à la normale. D'ailleurs, il a été démontré que la protéine c-Myc est surexprimée dans plusieurs cancers (NILSSON J.A. et CLEVELAND J.L., 2003). De plus SHEEN J-H et DICKSON R.B. (2002) et SHEEN J.H. *et al* (2003) ont démontré respectivement que la surexpression de c-Myc altère le temps d'arrêt aux points de contrôle G1/S et G2/M menant à une entrée trop rapide dans les phases S et M. De ces mêmes études, les auteurs ont pu démontrer que la surexpression de c-Myc affectait à la hausse les niveaux protéiques de la cycline B1 et de CDK 1(cdc2).

2. RÉSEAU MYC/MAX/MAD

La protéine c-Myc fait partie du réseau Myc/Max/Mad. Ces protéines sont des familles de facteurs de transcription jouant un rôle important sur plusieurs processus cellulaires dont la croissance, la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire (AMATI B. et LAND H., 1994, HENRIKSSON M. et LUSCHER B., 1996, BOUCHARD C. *et al*, 1998 et FACCHINI L.M. et PENN L.Z., 1998). Ces facteurs de transcription sont des protéines nucléaires ayant un motif b-HLH-LZ (basic region-helix-loop-helix-leucine zipper) qui se lie sur l'ADN au niveau de la boîte E dont la séquence est CACGTG (BLACKWOOD E.M. et EISENMAN R.N., 1991). Les

protéines Myc et Mad doivent hétérodimériser avec la protéine Max afin de pouvoir lier l'ADN et exercer leur rôle régulateur transcriptionnel. Max, tant qu'à lui peut former un homodimère et se lier à l'ADN.

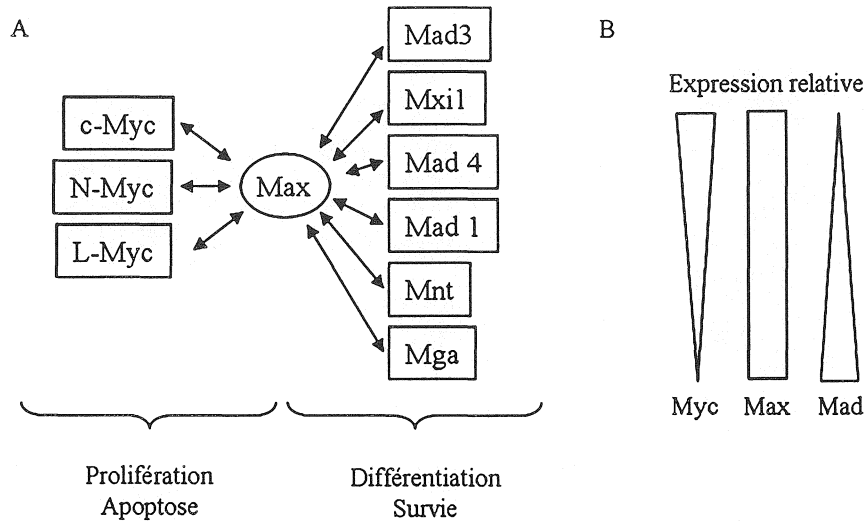


Figure 4. Le réseau Myc/Max/Mad. (A) Les flèches indiquent les interactions existantes entre les membres du réseau. (B) Expression relative des protéines du réseau Myc/Max/Mad (Figure adaptée à partir de LUSCHER B., 2001).

Comme il est indiqué dans la Figure 4A, les hétérodimères de la famille de Myc avec Max sont impliqués dans la prolifération et l'apoptose tandis que les hétérodimères de la famille de Mad avec Max agissent plutôt sur la différenciation et la survie cellulaire. Les membres de la famille de Mad ont donc une action diamétralement opposée à celle des membres de la famille de Myc, il est donc juste de dire que Mad est un antagoniste de Myc. Contrairement à Myc et Mad, qui ont une durée d'action variant de 10 à 30 minutes, Max semble être toujours présent dans la cellule. C'est-à-dire que Max est exprimé à des niveaux constants dans la cellule tandis que les niveaux des

protéines Myc et Max varient dans la cellule en fonction du cycle cellulaire (Figure 4B). L'activité cellulaire de Myc et Mad est fort probablement contrôlée par les niveaux d'expression de leur gène correspondant (HENRIKSSON M. et LUSCHER B., 1996, GRANDORI C. *et al*, 2000 et BLACKWOOD E.M. et EISENMAN R.N., 1992).

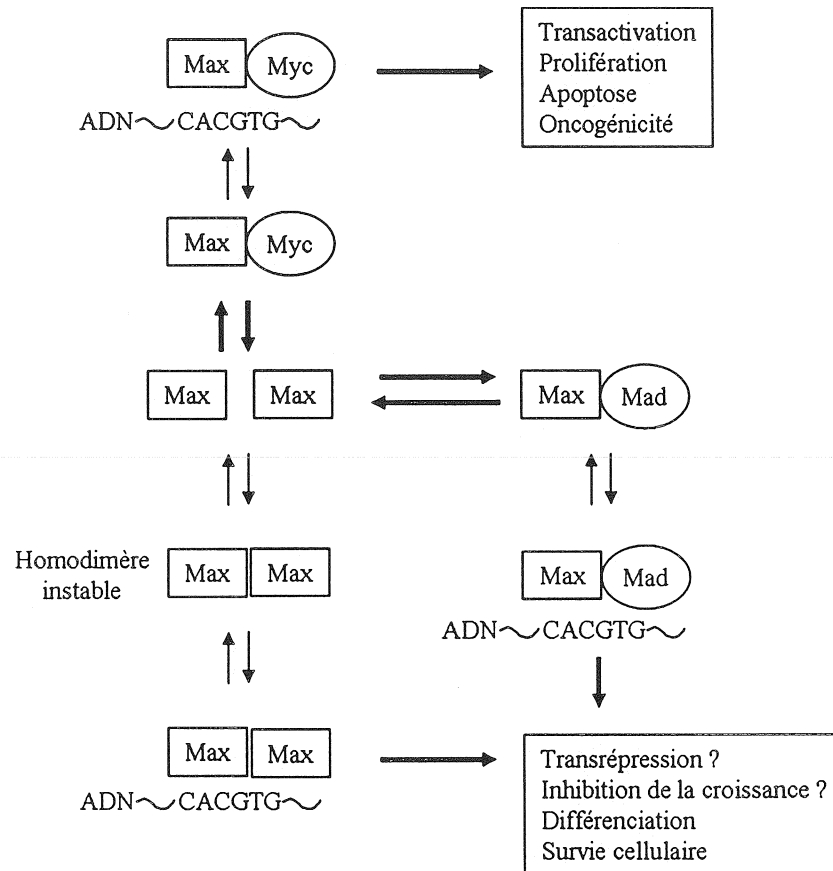


Figure 5. Modèle du réseau des facteurs de transcription Myc/Max/Mad ainsi que de leur association. (Figure adaptée à partir de AMATI B. ET LAND H., 1994)

Puisque la protéine Max peut dimériser avec elle-même pour former un homodimère ou hétérodimériser avec les protéines Myc ou Mad et que les niveaux de

Max sont stables comparativement à ceux de Myc et Mad, on pourrait se demander quelle forme est favorisée dans la cellule lorsque Myc (ou Mad) est présent? Est-ce l'homodimère Max-Max ou l'hétérodimère Myc-Max (ou Mad-Max)? Max va préférentiellement former un dimère avec Myc ou Mad lorsqu'ils sont présents due à la loi d'action de masse (Figure 5).

Nous avons préalablement discuté que la protéine c-Myc, qui en plus d'être impliquée dans l'apoptose, a une fonction oncogénique au niveau des cellules tumorales dans lesquelles elle est surexprimée (NILSSON J.A. et CLEVELAND J.L., 2003). Ces deux fonctions opposées de la protéine sont expliquées par l'hypothèse que c-Myc fonctionne d'une façon dose dépendante. Une augmentation, même légère, de l'expression de la protéine a un impacte majeur sur la cellule (OSTER S.K. *et al*, 2002). D'autres expliquent ce phénomène par le fait que différentes régions de c-Myc auraient des fonctions biologiques différentes (CHANG D.W. *et al*, 2000b, CONZEN S.D. *et al*, 2000 et NESBIT C.E. *et al* 2000).

Auparavant, nous avons mentionné que la cycline B1 et la CDK1 (cdc 2) étaient deux protéines, impliquées dans les points de contrôle du cycle cellulaire, dont l'expression était affectée à la hausse par la surexpression de c-Myc (SHEEN J.H. *et al*, 2003). Plusieurs études ont été faites afin de connaître d'autres cibles de c-Myc (DANG C.V., 1999, FACCHINI L.M., PENN L.Z., 1998 et GRANDORI C. *et al*, 2000). De ces dernières et plusieurs autres, une banque de données contenant les gènes ciblés par c-Myc a été générée et est accessible via internet (<http://www.myccancergene.org>). Parmi

les gènes retrouvés sur le site, on peut voir une grande quantité de cyclines (A2, B1, D1, D2, D3, E1, H) et de CDK (4, 6) qui sont affectées majoritairement à la hausse par la protéine c-Myc. Plusieurs de ces dernières sont impliquées dans le cycle cellulaire au niveau des points de contrôle. Il est donc normale de penser que la surexpression de la protéine c-Myc mènera à la transcription des gènes de ces protéines et qu'il y aura fort probablement une augmentation de l'expression de ces dernières menant à des changements de phosphorylation puisque le rôle des complexes CDK-cycline est de phosphoryler des protéines afin de les activer ou de les inhiber.

3. OUTILS PROTÉOMIQUES

3.1 La protéomique

La protéomique est le terme employé maintenant pour décrire l'étude du protéome d'un organisme, c'est-à-dire l'étude de toutes les protéines contenues dans une cellule ou dans un compartiment cellulaire tel que le cytoplasme ou le noyau. Pendant longtemps la recherche a misée sur le séquençage du génome de plusieurs organismes afin de comprendre la nature de certaines pathologies ou désordres. Maintenant, la recherche se concentre aussi sur les protéines qui sont générées à partir de ces mêmes gènes puisqu'un seul gène, par épissage alternatif, peut générer plusieurs protéines ayant des fonctions différentes. Le protéome contient donc une quantité astronomique d'information qui ne demande qu'à être élucidée. Les informations pouvant être obtenus du protéome sont souvent plus révélatrices que celle du génome puisque ce dernier ne peut pas vraiment nous indiquer ce qui se passe dans la cellule d'un côté moléculaire. Bien que l'information pouvant être obtenue du génome soit effectivement précieuse,

elle ne nous indique en rien ce qui se passe au niveau des protéines qui ont plusieurs rôles puisqu'une grande partie des protéines sont en fait des enzymes qui régissent plusieurs mécanismes cellulaires. Plusieurs méthodes, ou outils, ont déjà été mis en place afin d'étudier le protéome dont l'électrophorèse bidimensionnelle (2D-SDS-PAGE) et la spectrométrie de masse.

3.2 2D-SDS-PAGE

L'électrophorèse bidimensionnelle est une technique qui a été développée par O'FARRELL P.H. (1975) afin de séparer les protéines sur des gels de polyacrylamide en fonction de leur point isoélectrique (pI) et de leur masse. La première dimension correspond au pI qui est défini comme étant le pH auquel une protéine a une charge neutre et est déterminé par le nombre et le type de groupements chargés dans une protéine. À ce point, la protéine ne peut migrer dans un champ électrique. Les protéines sont des molécules ampholytes, c'est-à-dire qu'elles peuvent porter une charge nette positive, négative ou égale à zéro selon le pH de leur environnement. Pour chaque protéine il y a un pH spécifique auquel sa charge nette est zéro; ceci est le pI. Une protéine est chargée positivement dans une solution qui a un pH en dessous de son pI et est chargée négativement à des valeurs de pH au dessus de son pI.

Lorsqu'une protéine est soumise à un gradient de pH et est assujettie à un champ électrique, elle va migrer vers l'électrode avec la charge opposée. Durant cette migration, la protéine va soit acquérir ou perdre des protons. Tout au long de la séparation, sa charge nette et sa motilité vont diminuer et la protéine va ralentir.

Éventuellement, la protéine arrivera au point dans le gradient de pH qui est égal à son pI. À cet endroit, la protéine maintenant neutre s'immobilise dans le gradient. Si cette protéine diffusait dans une région où le pH est plus bas, elle serait protonée et forcée de retourner vers la cathode par le champ électrique. Si la protéine diffusait vers une région de pH plus grande que son pI, elle deviendrait chargée négativement et irait vers l'anode. De cette façon, les protéines sont condensées en des bandes bien définies dans le gradient de pH à leur pI individuel.

La deuxième séparation est faite à partir de la masse moléculaire de la protéine en utilisant des gels SDS-PAGE. Les protéines ayant été séparées sur une bande de gradient de pH immobilisé (IPG) dans la première dimension sont appliquées au gel de deuxième dimension et sont séparées par leur masse moléculaire perpendiculairement à la première dimension.

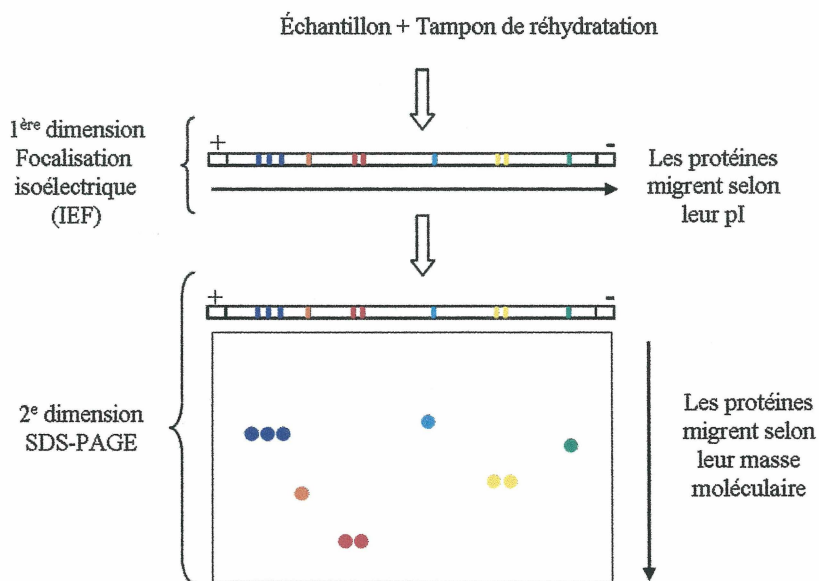


Figure 6. Schéma général d'une électrophorèse bidimensionnelle (2D-SDS-PAGE)

La figure 6 illustre la méthodologie à suivre lors d'un 2D-SDS-PAGE. L'échantillon est resuspendu ou mélangé dans un tampon de réhydratation (2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% Biolyte 3-10, 8M Urée) et ensuite appliqué sur une bande de gel contenant des points isoélectriques immobilisés. Un courant électrique est appliqué sur la bande de gradient de pH afin de permettre aux protéines de migrer vers leur point isoélectrique suite à quoi la bande est apposée sur un gel SDS-PAGE. Le contact entre la bande et le gel SDS-PAGE est fait à l'aide d'agarose liquide que l'on applique par dessus la bande. Une fois l'agarose figée, les protéines pourront passer de la bande au gel et migreront selon leur masse moléculaire. Cette technique permet par exemple de séparer deux protéines qui ont la même masse moléculaire mais pas le même pI. Les protéines seront retrouvées côtes à côtes à la même hauteur sur le gel SDS-PAGE. Une séparation d'une seule dimension sur gel SDS-PAGE n'aurait pas permis de constater la présence de deux protéines au même poids moléculaire.

3.3 La spectrométrie de masse

3.3.1 Définition et principe général

La spectrométrie de masse est devenue une technique quasi incontournable dans l'étude des peptides et des protéines. La spectrométrie de masse est une technique analytique qui est utilisée pour identifier des composés inconnus, quantifier des molécules connues et élucider les propriétés structurales et physiques d'ions. Cette technique est associée à de hauts niveaux de spécificité et sensibilité.

Un spectromètre de masse est un instrument qui peut séparer des atomes ou molécules chargées selon le ratio masse/charge (m/z). La masse relative de peptides, de protéines, d'ARN et de molécules synthétisées chimiquement peut être mesurée de cette façon. Le spectromètre de masse peut aussi être combiné à des digestions enzymatiques par des endopeptidases (trypsine, endopeptidase V8) ou des carboxypeptidases afin d'obtenir la cartographie par mesure de masses moléculaires du mélange peptidique obtenu suite à la digestion. Ceci, combiné à une recherche sur banques de données permet l'identification d'une protéine inconnue ou d'assigner une protéine à un gène.

De plus, la spectrométrie de masse permet la quantification des niveaux d'expression de protéines grâce à plusieurs méthodes dont le marquage protéolytique (YAO X. *et al*, 2001). Ce marquage est effectué grâce à l'utilisation d'eau $H_2^{18}O$, au lieu d'eau $H_2^{16}O$, dans le tampon de digestion lors d'un clivage à la trypsine. Cet enzyme, comme plusieurs autres (Glu-C, Lys-C), utilise une molécule d'eau afin de pouvoir cliver le lien amide. Ceci mène à l'incorporation d'une molécule d'oxygène ^{18}O lorsque de l'eau $H_2^{18}O$ est utilisée. L'incorporation d'une deuxième molécule d'oxygène ^{18}O sera faite grâce à un échange entre le milieu ($H_2^{18}O$) et l'oxygène du carboxyl de la partie C-terminale du peptide résultant du clivage (Figure 7). Ce marquage isotopique permet donc d'obtenir une différence de masse de 4 Da entre le peptide marqué (provenant de la cellule non traitée) et le non marqué (provenant de la cellule traitée). En résumé, un échantillon est digéré à l'aide de la trypsine dans un tampon fait d'eau $H_2^{16}O$ tandis que l'autre est digéré avec un tampon fait d'eau $H_2^{18}O$ pour marquer isotopiquement les extrémités C-terminales des peptides générés avec deux molécules

d'oxygène ^{18}O . Les deux échantillons peuvent alors être mélangés ensemble et le ratio isotopique entre le peptide marqué par rapport au non marqué est utilisé pour déterminer les changements de niveaux d'expression.

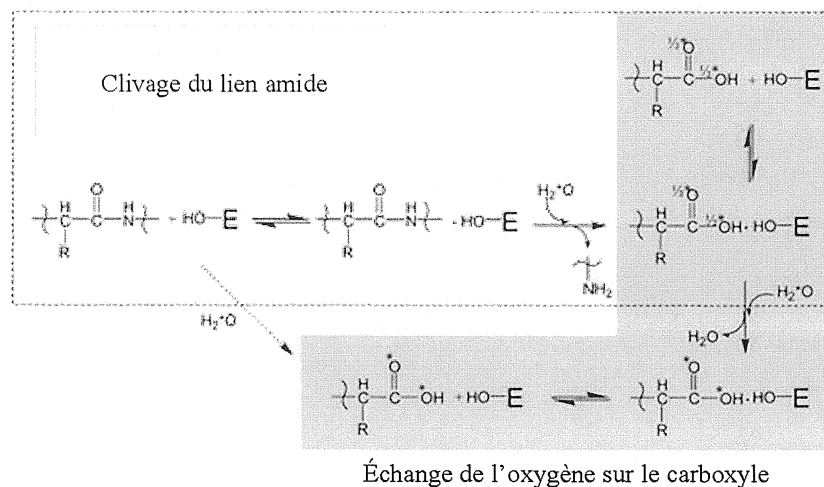


Figure 7. Incorporation de deux isotopes stables durant la protéolyse (Figure tirée de YAO X. *et al*, 2003)

Afin de déterminer la masse d'un échantillon à l'aide d'un spectromètre de masse, ce dernier doit être introduit dans l'appareil, qui est généralement sous vide, et être transformé en ion à l'état gazeux. Le spectromètre de masse est toujours constitué des parties suivantes (Figure 8) :

- une source d'ions : endroit où se produit le passage en phase gazeuse de l'échantillon à analyser, son ionisation et la décomposition des ions
- un analyseur : permettant de trier les ions en fonction de leur rapport m/z
- un détecteur : effectuant le compte des ions en leur associant leur rapport m/z
- un enregistreur : traitement du signal et visualisation des spectres

- un système de calibration : permettant d'attribuer la masse par rapport au ratio m/z

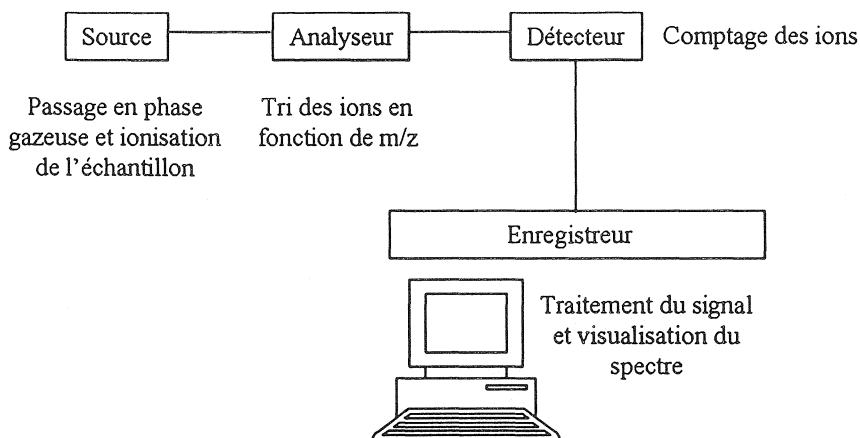


Figure 8. Principe d'un spectromètre de masse

3.3.2 Différents types d'ionisation

Il existe une grande variété de modes d'ionisation qui ont été développés au cours des années 1980. Au début des années 80, les composés étaient ionisés par impact avec des faisceaux primaires d'atomes ou d'ions très énergiques, avec les modes d'ionisation PDMS (pour Plasma Desorption Mass Spectrometry), FAB (pour Fast Atom Bombardment) et LSIMS (pour Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry). Ces techniques d'ionisation avaient par contre des limitations majeures comme la gamme de masse, la sensibilité et la suppression de signal. Deux autres modes d'ionisation sont apparus vers la fin des années 80 soit l'électrospray (ESI pour ElectroSpray Ionization) et le MALDI (pour Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) qui sont devenues les techniques de choix pour l'ionisation des protéines et des peptides.

3.3.3 MALDI

3.3.3.1 Ionisation

Le MALDI est un spectromètre de masse utilisé pour l'analyse de biomolécules telles les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les sucres ainsi que des polymères synthétiques. La masse moléculaire ainsi que des informations sur la structure peuvent être obtenues à partir de cet instrument. L'échantillon à analyser est mélangé avec de la matrice liquide et environ 1 μ l du mélange est appliqué sur une plaque d'acier inoxydable (cible) pour co-cristalliser. La cible est alors introduite dans l'appareil et le vide est fait. Des impulsions de laser (4 ns) dans le domaine de l'UV irradient la cible pour produire des peptides ionisés (Figure 9). La matrice absorbe l'énergie du laser et, en même temps, désorbe et ionise les ions moléculaires de l'échantillon (HILLENKAMP F., KARAS M., 1990). Il s'agit donc d'un transfert d'énergie de la matrice à l'échantillon. La matrice permet donc de minimiser la dégradation de l'échantillon qui pourrait être provoquée par l'absorption de l'énergie du laser.

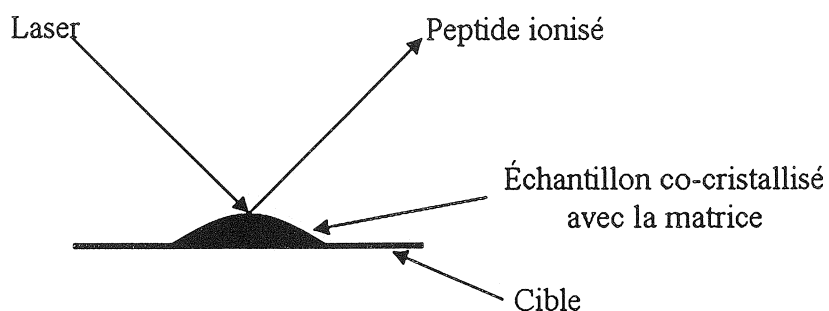


Figure 9. Schéma de l'ionisation d'un échantillon (peptide) par MALDI.

L'irradiation faite par le laser provoque l'éjection des molécules de l'échantillon ainsi que de la matrice en phase gazeuse. Les ions générés, majoritairement

monochargés de type $[M + H]^+$, sont accélérés par un champ électrique (recevant une énergie cinétique constante) et volent jusqu'au détecteur. Les ions les plus légers volent plus rapidement et atteignent le détecteur avant les ions plus lourds. En mesurant le temps de vol («time of flight») d'un ion et en utilisant une calibration appropriée, on peut obtenir la masse moléculaire. Ce ne sont pas tous les ions qui partent de la cible avec la même vitesse et cette variation peut mener à des limitations dans la résolution et la précision de masse. Afin de surmonter ceci, un réflectron est installé dans l'appareil. Ce dernier compense la distribution de vitesse initiale des ions et améliore donc la résolution.

3.3.3.2 Les matrices

Il existe plusieurs types de matrices (Tableau I) qui peuvent être utilisées avec le MALDI selon la molécule à analyser et le mode d'analyse. Parmi ces dernières, l' α -cyano et l'acide sinapinique sont les plus utilisées.

Tableau I. Exemples de matrices existantes ainsi que leur substrat.

Matrice	Substrat
Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique)	Protéines, peptides, polymères
Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -cyano)	Peptides, polymères
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB)	Sucres, peptides, nucléotides, polymères
2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP)	Oligonucléotides, peptides, glycoprotéines

Les matrices sont généralement sous la forme d'un produit solide ou cristallin et doivent être dissoutes dans un mélange d'eau et de solvant organique (acétonitrile, méthanol) pour obtenir une solution saturée en matrice. L'échantillon est alors généralement dilué avec un ratio molaire de 1 : 5000 dans la matrice.

La présence de contaminants dans l'échantillon tels que des sels, du tampon, du glycérol et leur quantité doit toujours être évaluée puisque ces derniers peuvent détériorer l'analyse. Le tableau II illustre certains des contaminants pouvant se retrouver dans un échantillon ainsi que les concentrations maximales tolérées par les matrices en général.

Tableau II. Concentration de contaminants généralement tolérés par les matrices.

Contaminant	Concentration maximale
Tampon phosphate	10 mM
Tris	50 mM
Détergents	0.1%
SDS	0.01%
Sels alcalins métalliques	0.5 M
Glycérol	1%
Bicarbonate d'ammonium	50 mM
Sodium azide	1 mM
Urée	0.5 M
DTT	0.5 M

3.3.4 Electrospray

3.3.4.1 L'ionisation

L'électrospray ou ESI (pour Electrospray Ionization) est une technique d'ionisation qui peut aussi être couplée à un spectromètre de masse (Figure 10A). L'échantillon à analyser n'est pas co-cristallisé dans une matrice, comme pour le MALDI, mais plutôt mis en solution dans une phase mobile, comme un mélange 1 : 1 d'eau et d'acétonitrile ou méthanol contenant un faible pourcentage d'acide (acétique ou formique). À ce moment l'échantillon est aspiré dans une seringue et injecté dans un capillaire (sous tension électrique) très fin à des débits très lents (de l'ordre du $\mu\text{l}/\text{min}$). L'échantillon sort du capillaire (sous tension) et forme un cône de Taylor à l'extrémité du capillaire. Le cône va s'étirer en un long filament qui va se décomposer et former un jet atomisé très fin à l'extérieur du spectromètre de masse à pression atmosphérique. À l'intérieur de ce jet atomisé ce trouve en fait de minuscules gouttelettes chargées contenant l'échantillon (Figure 10B) qui, par évaporation du solvant (1) et fission des gouttes à la limite de Rayleigh (2) (limite pour laquelle les répulsions électrostatiques des charges l'emportent sur la tension superficielle qui garantissait la cohésion de la goutte) dû au champ électrique, se transforment en ions ($[M + nH]^{n+}$) désolvatés par répétition des processus précédents (3). Les ions formés sont alors captés par des échantillonneurs et amenés vers l'analyseur où règne un vide poussé. Les ions analysés par le spectromètre de masse sont souvent des espèces multichargées. C'est-à-dire que la visualisation d'ions mono-, doublement et triplement chargés n'est pas rare. Il est facile de savoir à quelle espèce d'ion chargé nous avons à faire puisque la différence de masse

est respectivement de 1, 0,5 et 0,33 pour les forme mono-, doublement et triplement chargées.

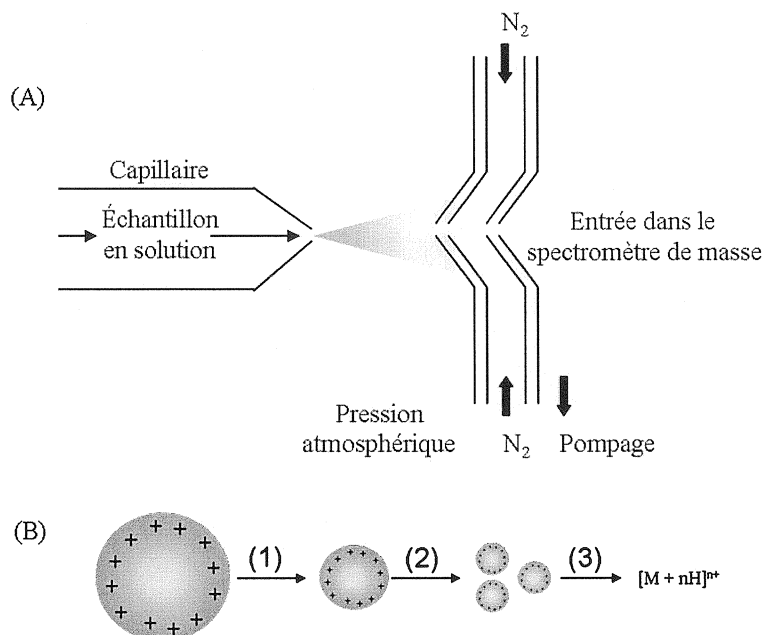


Figure 10. Principe de l'électrospray (A) et de la génération des ions (B).

Le spectromètre de masse peut aussi être couplé à un HPLC avant l'ESI. Ceci permet de séparer un mélange complexe sur des colonnes avant l'injection dans le spectromètre de masse. De cette façon, ce n'est pas l'échantillon en entier qui est injecté mais plutôt une petite partie à la fois.

3.3.5 L'analyseur en temps de vol

Le MALDI ainsi que l'électrospray sont généralement couplés à un analyseur de temps de vol ou TOF (pour time of flight). Le principe du TOF est le suivant : l'instrument pourra attribuer une masse à un ion grâce au temps qu'il prendra pour voler dans un tube de vol. Lorsqu'un échantillon, co-cristallisé avec de la matrice si nous

prenons l'exemple du MALDI, est introduit dans le spectromètre de masse, il se fait bombarder par un laser ce qui génère des ions. Ces derniers sont accélérés dans le tube de vol par un champ électrique qui est appliqué entre la cible et la grille d'extraction. En étant accélérés avec la même force, sur la même distance (I_{acc}), les ions acquièrent une énergie cinétique identique. Conséquemment, le temps de vol d'un ion sur une distance fixe (d) est proportionnel à la racine carrée du rapport masse/charge (m/z) : $t \propto \sqrt{m/z}$.

3.3.5.1 Modes linéaire et réflectron.

Une fois accélérés, les ions entrent dans le tube de vol qui a une distance fixe (longueur de 1-3 mètres). À cet endroit les ions vont se séparer selon leur vitesse. Les ions ayant le rapport m/z le plus petit se rendront au détecteur en premier.

Il existe deux types de détecteur dans le TOF: le détecteur linéaire (utilisé dans le MALDI) et le détecteur réflectron (utilisé dans le MALDI et l'ESI) qui sont tous deux illustrés dans la Figure 11. En mode linéaire les ions parcourent une distance inférieure à celle du mode réflectron. Cette augmentation de la distance, en mode réflectron, permet de contre-carrer la distribution d'énergie cinétique ainsi que la distribution spatiale des ions qui est observée en mode linéaire.

Qu'est-ce que la distribution d'énergie cinétique? Ce sont des ions qui n'acquièrent pas la même énergie cinétique initiale à partir d'un même endroit et qui, en mode linéaire, ont une différence de temps d'accélération menant à une entrée retardée dans le tube de vol. Par exemple, deux ions identiques, qui ont des vitesses initiales

opposées et qui sont accélérés à partir du même point, entreront dans le tube de vol à la même vitesse mais à des temps différents. Il y a dispersion dans le temps. Tandis que deux ions identiques, qui ont des vitesses initiales différentes et qui sont accélérés à partir du même point, entreront dans le tube de vol à des vitesses et des temps différents. Il y a dispersion dans le temps et en énergie. La distribution spatiale, tant qu'à elle, est causée par une énergie cinétique initiale qui n'est pas acquise à partir d'un même point causant une vitesse différente dans le tube de vol. Par exemple, deux ions identiques, ayant la même vitesse initiale, mais accélérés à partir de deux endroits différents, entreront dans le tube de vol à des vitesses et des temps différents. L'ion initialement plus distant du détecteur reste plus longtemps dans la zone d'accélération lui donnant une vitesse de vol plus élevée et donc un temps de vol plus court. Il y a donc dispersion dans le temps et en énergie. Ce sont là les limitations majeures du mode linéaire.

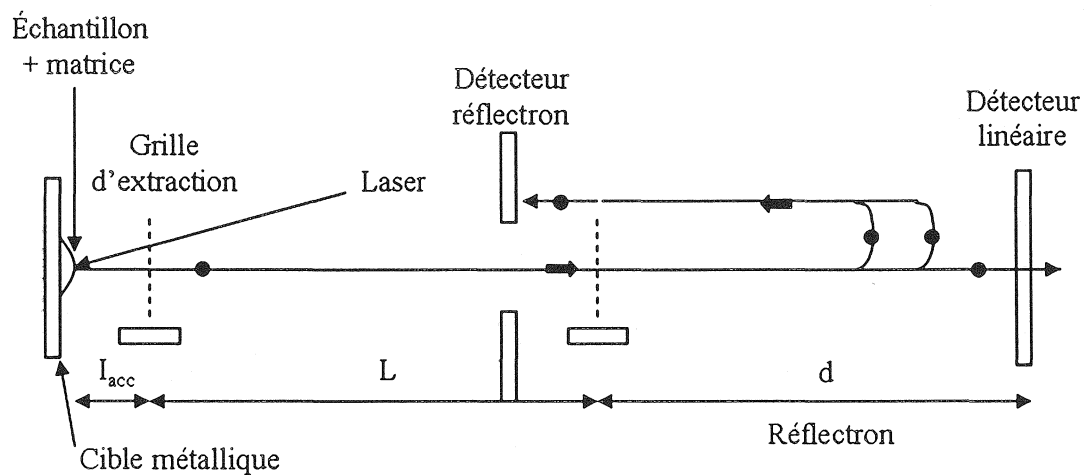


Figure 11. Schéma d'un spectromètre de masse MALDI-TOF avec un détecteur linéaire et un détecteur réflectron.

La dispersion d'énergie cinétique est outrepassée en mode réflectron tandis que la dispersion en temps ne l'est pas. Pourquoi? Parce que les ions, en mode réflectron, pénètrent dans un champ électrique qui s'oppose à leur progression puisqu'il est orienté dans la direction opposée au champ d'accélération. Un ion de plus grande énergie pénétrera dans le champ électrique réflectron plus loin et prendra plus de temps pour être réfléchi (faire demi-tour). L'ion le plus lent, lui, ira moins loin dans le champ électrique et sera réfléchi plus rapidement (Figure 10).

3.3.6 Spectrométrie de masse tandem (MS/MS)

La spectrométrie de masse tandem (ou MS/MS) combine généralement deux analyseurs permettant d'étudier la fragmentation des ions. Ceci permet d'obtenir non seulement la masse d'un peptide, par exemple, mais aussi des informations sur sa structure. Le principe est illustré à la Figure 12.

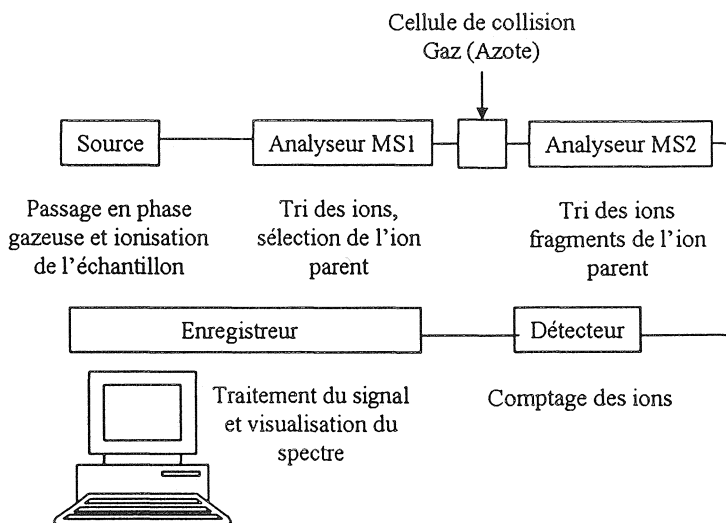


Figure 12. Principe d'un spectromètre de masse tandem

Les ions formés dans la source entrent dans le premier analyseur MS1. Parmi tous les ions observés, un ion parent est choisi. Seulement les ions ayant le rapport m/z choisi pourront passer du MS1 dans la cellule de collision contenant un gaz (généralement de l'azote). Les ions et les molécules de gaz vont alors entrer en collision entre eux ce qui résultera en une augmentation de l'énergie interne des ions menant à leur décomposition ou fragmentation. Cette fragmentation est due au bris des liens chimiques de la molécule permettant d'obtenir de nouveaux ions qui ont un nouveau rapport m/z qui peut être étudié dans le deuxième analyseur MS2. La fragmentation permet de déterminer la séquence de l'ion parent puisque le bris des liaisons se fait selon des règles bien déterminées.

3.3.7 Séquençage des peptides

Un peptide (Figure 13A) est composé d'acides aminés liés les uns aux autres par un lien amide (- CO - NH -). Chaque peptide est composé d'une extrémité N-terminale (NH₂) et d'une extrémité C-terminal (COOH).

Lorsque les peptides sont fragmentés, le lien amide est généralement celui qui est brisé. Le type d'ions observés dépend de plusieurs facteurs incluant la séquence primaire, la quantité d'énergie interne, la façon dont l'énergie a été introduite, etc. La nomenclature acceptée pour les ions de fragmentation (Figure 13B) a premièrement été proposée par ROEPSTORFF P. et FOHLMAN J. (1984)

Les fragments ne seront détectés que s'ils portent au minimum une charge. Si cette charge est retenue sur le côté N-terminal, l'ion est classé comme a, b ou c (Figure 14A). Si la charge est retenue du côté C-terminal, l'ion sera de type x, y ou z (Figure 14B). L'indice indique le nombre de résidus dans le fragment. Si la charge est délocalisée, les fragments prépondérants sont de type b et y. Les peptides obtenus suite à une digestion tryptique contiennent un résidu basique en C-terminal, soit une arginine ou une lysine, qui donnent des ions de fragmentation de type y de façon préférentielle. Lorsque des résidus basiques sont retrouvés un peu partout dans la séquence, les ions de fragmentation contenant des résidus basiques sont généralement plus intenses que les ions n'en contenant pas. C'est donc pourquoi les peptides ayant un résidu basique en N-terminal favoriseront les ions de fragmentation de type b de grande intensité aux ions de type y (TABB D.L. *et al*, 2004).

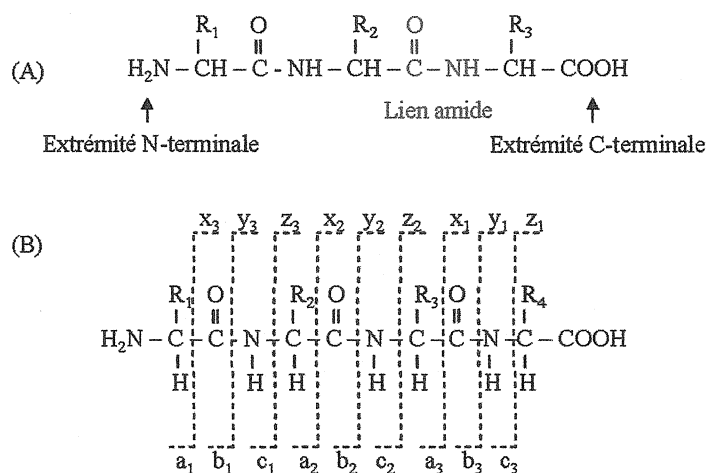


Figure 13. (A) Schéma d'un peptide. (B) Fragments N- et C-terminal générés après fragmentation en spectrométrie de masse.

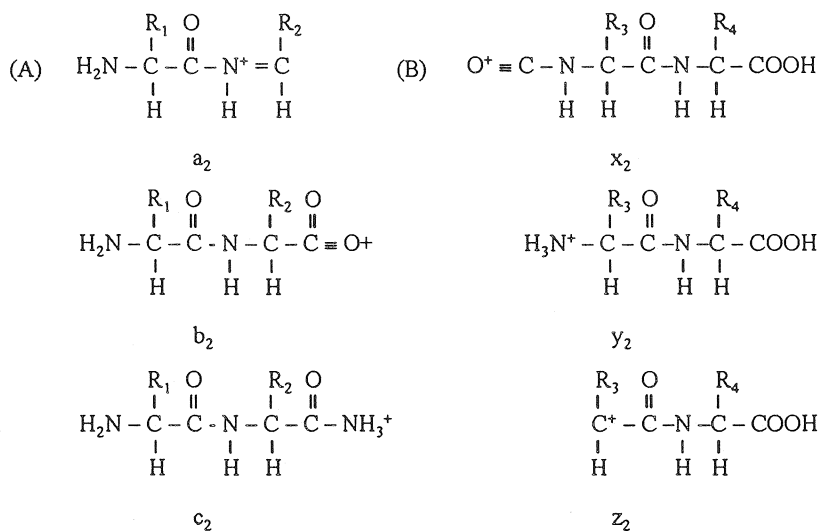


Figure 14. Ions générés par la fragmentation

4. PROJET DE RECHERCHE

4.1 Mise en situation

Puisque des changements des niveaux de phosphorylation et d'expression sont souvent le résultat d'un changement d'un état cellulaire à un autre (cellule normale versus cellule cancéreuse), une méthode permettant de visualiser ces changements et d'identifier les protéines affectées serait extrêmement utile afin d'effectuer une étude comparative qui permettrait de comprendre les mécanismes cellulaires et possiblement développer des approches thérapeutiques. Plusieurs méthodes existent déjà afin de faire ceci comme l'immuno-détection sur membrane et la digestion dans le gel couplée à la spectrométrie de masse. L'inconvénient de l'immuno-détection est qu'elle permet seulement de faire la détection de modifications post-traductionnelles, comme les phosphorylations, l'identification de la protéine à partir de la membrane utilisée ne peut se faire directement. De plus, deux gels doivent être utilisés pour faire la séparation de

l'échantillon afin d'en utiliser un pour faire un immunobuvardage de type Western. Une fois l'emplacement de la modification (ou de la protéine) déterminé, on doit par superposition découper sur le gel restant la protéine et ensuite tenter de l'identifier en faisant une digestion dans le gel et une analyse par spectrométrie de masse. Cette méthode demande donc deux fois plus de matériel. Il serait donc avantageux de développer une méthode permettant de coupler la membrane utilisée pour faire l'immuno-détection directement avec la spectrométrie de masse afin d'utiliser moins de matériel. Une fois la méthode mise au point nous pourrions l'appliquer pour tenter de faire une étude comparative sur des cellules ayant subies différents traitements.

4.2 Hypothèse

Sachant que la protéine c-Myc est surexprimée dans plusieurs types de cancers, serait-il possible de favoriser la formation d'un homodimère Max-Max à la formation du dimère Myc-Max ? De cette façon l'homodimère pourrait antagoniser l'effet du dimère Myc-Max. Myc aurait alors une action diminuée et des changements dans la cellule pourraient avoir lieu comme par exemple des changements des niveaux de phosphorylation ou des niveaux d'expression de certaines protéines. Une façon de pouvoir vérifier cette hypothèse serait de surexprimer la protéine Max dans des cellules puisqu'il a été démontré par KOSKINEN P.J. *et al* (1994) qu'une simple expression de Max peut empêcher les activités transcriptionnelles de Myc. Puisque la quantité de protéine Max serait augmentée dans ces cellules lors d'une surexpression, la formation d'un homodimère devrait se faire préférentiellement par rapport à la formation d'un

hétérodimère. Ce qui pourrait entraîner des changements au niveau protéines qui seraient observables avec la méthode développée.

4.3 Méthodologie

Afin de s'assurer que la protéine Max forme bel et bien un homodimère lorsqu'elle est surexprimée et non un hétérodimère avec Myc, la protéine Max a été modifiée par clonage moléculaire pour rendre les homodimères de Max thermodynamiquement plus stable et avec une plus grande affinité pour les séquences de la boîte E (NAUD J-F. *et al*, 2003). L'ADN des deux clones de Max générés a été insérée dans le vecteur inductible Pind-5 qui a été transfecté dans des cellules EcR 293. Ces cellules sont cultivées dans un milieu DMEM supplémenté en sérum fœtal bovin (FBS), lorsque de la ponastérone est ajoutée au milieu, la protéine Max est alors surexprimée dans les cellules et c'est à ce moment que des changements au niveau des protéines pourraient avoir lieu. Des outils protéomiques pourraient alors être utilisés pour identifier les protéines faisant face à des changements et quantifier ces changements.

4.4 But de l'étude

Le but de cette étude est donc de développer une méthode permettant le couplage de l'immunobuvardage de type Western avec la spectrométrie de masse. Cette méthode pourrait nous permettre de comparer des cellules dans lesquelles la protéine Max est surexprimée à des cellules n'ayant pas subi le traitement. Cette comparaison devra être faite en tentant de comparer les niveaux de phosphorylation et en essayant de quantifier

les changements dans les niveaux d'expression des protéines retrouvées dans des extraits nucléaires puisque Myc et Max sont des protéines nucléaires et que l'analyse de compartiments cellulaires permet une meilleure visualisation des changements.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Matériel

La BSA, l'anticorps contre la BSA (le lapin), la phosphorylase b (muscle de lapin), l'hémoglobine humaine, l'ovalbumine (poulet), la β -galactosidase (*E.Coli*), le PVP-40, l'acide 5-méthoxysalicylique et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Les anticorps contre l'ovalbumine (lapin) ainsi que pour la β -galactosidase ont été obtenus via Rockland (Gilberstville, PA., USA) et l'anticorps contre la transferrine de rat a été obtenu des laboratoires Cedarlane Ltd (Horby, ON, Canada). La trypsine provient de Promega (Madison, WI, USA). Les produits et accessoires pour l'électrophorèse ont été achetés chez Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). Les réactifs pour le ECL, l'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la HRP, l'anticorps anti-phosphotyrosine couplé à la HRP, la membrane nitrocellulose (pores d'une grandeur de 0,45 μ m) ainsi que les films Hyperfilm ECL ont été achetés chez Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfée, QC, Canada). Les Zip Tips C₁₈ ont été obtenus chez Millipore (Bedford, MA, USA) et l'anticorps anti-phosphosérine a été acheté chez Research Diagnostics. Le zwittergent 3-16 provient de Calbiochem (San Diego, CA, USA). L'encre d'Inde (Fount India ink) (Pellikan INC, Pembroke, MA) a été acheté dans un magasin d'arts local (Sherbrooke, QC, Canada). La zéocine ainsi que la ponastérone A ont été achetées chez Invitrogen life technologies. La phase inverse C18 a été achetée chez Varian Inc (USA)

1-D-SDS-PAGE

Les protéines standards (BSA, phosphorylase b, hémoglobine, ovalbumine et β -galactosidase) sont pesées et resuspendues avec la quantité appropriée d'eau afin d'obtenir une solution de 100 picomoles/ μ l. Les échantillons sont dilués à la concentration désirée dans du Laemmli et appliqués sur un gel SDS-PAGE de 7% à raison de 5 μ l/puit. La migration est effectuée à 100 V constants, 50 mA et 15 W.

Immunobuvardage de type Western et détection au ECL

Le transfert est effectué de façon semi-sec avec 25 V, 81 mA constants et 5 W. La membrane de NC avait été pré-rincée dans une solution aqueuse de 20% méthanol suivit d'une solution de 0.3% Tris/20% méthanol. Les papiers de transfert sont imbibés des solutions suivantes : 40 mM d'acide aminocaproïque/0,3% Tris, 0,3% Tris/20% méthanol et 3% Tris/20% méthanol. Suite au transfert, la membrane est rincée dans une solution aqueuse 20% méthanol, suivit par de l'eau distillée et bloquée avec une solution aqueuse contenant 0,5% Tween 20 et 0,1% d'acide acétique. La membrane peut alors être colorée avec une solution de PBS contenant 0,1% d'encre d'Inde, 0,05% Tween 20 et 1% d'acide acétique. Lorsque les bandes de protéines sont bien visibles, la membrane est alors rincée dans de l'eau puis dans le tampon aqueux à pH 7,6 contenant 150 mM NaCl, 10 mM Tris et 0,05% Tween 20. La membrane peut alors être incubée avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon aqueux pendant 2 heures, rincée avec le tampon aqueux et incubée pendant 1h avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP. On peut maintenant faire un ECL et développer un film afin de déterminer la position de ou des protéines contre lesquelles l'anticorps primaire était dirigé. Dans certains cas,

l'anticorps a été enlevé de la membrane après la réduction et l'alkylation en utilisant une solution aqueuse contenant 20% DMF et 1% HCOOH. Une deuxième détection au ECL a été faite afin de vérifier que les anticorps n'étaient plus présents. Les bandes immuno-reactives ont été découpées à l'aide d'un scalpel et mises dans des tubes Eppendorf de 0,5ml préalablement rincés avec de l'isopropanol.

Culture cellulaire des cellules EcR 293

Les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS contenant 400 $\mu\text{g/ml}$ de zéocine pour les cellules non transfectées. Les cellules transfectées avec le vecteur Pind-5 avec ou sans insert sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS contenant 200 $\mu\text{g/ml}$ de zéocine et 400 $\mu\text{g/ml}$ de G418. Le G418 est utilisé à partir d'une solution concentrée de 40 mg/ml dans 100 mM d'Hepes pH7,3. Les cellules sont induites avec de la ponastérone A. Cette dernière a été préparée comme suit : 250 μg de ponastérone A + 500 μl d'éthanol 100% filtré pour obtenir une concentration de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. De cette solution, 25 μl étaient ajoutés pour 5 ml de milieu.

Préparation des extraits nucléaires

Les extraits sont préparés selon DIGNAM D. *et al* (1983). Toutes les étapes sont faites sur glace. En résumé, centrifuger les cellules 10 minutes à 2 000 rpm à 4°C. Éliminer le milieu et resuspendre les cellules avec du PBS froid. Centrifuger 5 minutes à 2 000 rpm à 4°C. Resuspendre les cellules avec 5 volumes de culot avec le tampon A (10 mM Hepes pH 7,9, 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0,5 mM DTT). Centrifuger 5

minutes à 2 000 rpm à 4°C. Resuspendre les cellules avec 2 volumes de culot initial de tampon A. Lyser les cellules avec un homogénéisateur de verre avec piston de type B (7 ml). Centrifuger 10 minutes à 2 000 rpm à 4°C pour précipiter les noyaux. Resuspendre avec deux fois le volume du culot de noyaux à l'aide du tampon A. Centrifuger 20 minutes à 17 000 rpm à 4°C. Transférer les culots, sans les resuspendre, dans l'homogénéisateur et homogénéiser sur glace avec 1,8 ml de tampon C (20 mM Hepes pH 7,9, 20% glycérol, 420 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5mM DTT). Incuber 30 minutes à 4°C avec légère agitation. Centrifuger 30 minutes 17 000 rpm à 4°C et dialyser le surnageant dans 50 volumes de tampon D (0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT) pendant toute la nuit. Centrifuger 20 minutes à 17 000 rpm à 4°C. Aliquoter le surnageant et conserver à -80°C.

Préparation des homogénats de foie de rat

L'homogénéisation du foie de rat a été fait dans un homogénéisateur de tissus de 7 ml en verre (Wheaton Millville, NJ, USA) après l'ajout d'une solution 15 mM Tris-HCL pH 6,8 contenant 250 mM de sucrose et 1 mM d'EDTA.

Dosage protéique

La concentration protéique est déterminée par un dosage BCA (Pierce obtenu via Biolynx INC, Brockville, ON, Canada) après que l'échantillon ait été dilué avec une solution 1% SDS.

Focalisation isoélectrique (IEF) et équilibration des bandes

Mélanger l'échantillon au tampon de réhydratation (50 mM DTT, 2% CHAPS, 8M Urée, 0,2% Biolyte 3-10, trace de bromophénol bleu). Appliquer 185 µl (300 µg de protéines) à une bande de pH immobilisé d'une longueur de 11 cm et de pH 6-11. Recouvrir la bande d'huile minérale et la réhydrater de 12 à 16 heures. Mettre les bandes sur l'appareil d'IEF (Bio-Rad, ON, Canada) et faire la focalisation à une température de 20°C avec un courant maximum de 50 µA/bande. La première étape se fait de 0 à 250V pendant 20 minutes de façon linéaire, la deuxième de 250 à 8 000 V pendant 2,5 heures de façon linéaire et la dernière à 8 000V à raison de 20 000V·heure de façon rapide pendant 2,5 heures. Une fois la IEF faite, les bandes peuvent être conservées à -80°C ou être équilibrées immédiatement. Les bandes sont équilibrées avec le tampon d'équilibration (6M urée, 0,375 M Tris pH 8,8, 20% glycérol, 2% SDS) contenant 0,02 g/ml de DTT et ensuite avec le même tampon mais contenant cette fois-ci 0,025 g/ml d'iodoacétamide à la noirceur. Après ces deux étapes, les bandes peuvent être appliquées sur un gel avec un gradient de 8-16% ou de 10% polyacrylamide avec de l'agarose et la migration peut être faite selon les conditions décrites dans la section 1-D PAGE.

Digestion sur la membrane

Découper la bande de protéine et la mettre en petits morceaux. La protéine est réduite avec une solution de DTT 5 mg/ml à 37°C puis carbamidométhylée avec une solution d'iodoacétamide 25 mg/ml dans la noirceur. La membrane est alors rincée avec une solution de 100 mM NH_4HCO_3 contenant 10% d'ACN. La protéine est digérée pendant 3,5 heures avec une solution de trypsine, à une concentration de 10 ng/µl,

resuspendue avec soit une solution de 100 mM NH_4HCO_3 contenant 10% d'ACN et 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zwittergent 3-16 ou 100 mM NH_4HCO_3 contenant 40% DMF. Une fois la digestion terminée, l'échantillon est acidifié avec une solution d' HCOOH 5%, concentré sur un Zip Tip C_{18} et élué avec 1.2 μl de matrice α -cyano-4-hydroxycinnamic acide (20 mg/ml dans 45 : 55 ACN : 0,1% TFA) sur la plaque du MALDI-TOF-MS.

Digestion dans le gel

Découper la bande de protéine du gel et la mettre en petits morceaux afin d'augmenter la surface de contact. Le gel est ensuite incubé dans une solution de 100 mM NH_4HCO_3 suivit d'une deuxième incubation dans de l'ACN 100%. La protéine est ensuite réduite avec une solution de DTT 5 mg/ml à 37°C et carbamidométhylée avec une solution d'iodoacétamide 25 mg/ml à la noirceur. Le tout est lavé avec une solution de 100 mM NH_4HCO_3 contenant 50% d'ACN avec agitation. Par la suite, le gel est déshydraté avec de l'ACN 100% et réhydraté avec de la trypsine, à une concentration de 50 ng/ μl , resuspendue dans soit 50 mM NH_4HCO_3 contenant 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zwittergent 3-16 ou 100 mM NH_4HCO_3 contenant 40% DMF. Une fois la réhydratation terminée, le tampon est échangé pour 50 mM NH_4HCO_3 et le tout est incubé à 37°C toute la nuit. Le lendemain, l'échantillon est acidifié avec une solution d' HCOOH 10%, concentré avec un Zip Tip C_{18} et élué avec 1.2 μl de matrice α -cyano-4-hydroxycinnamic acide (20 mg/ml dans 45 : 55 ACN : 0,1% TFA) sur la plaque du MALDI-TOF-MS.

Précipitation des protéines

Ajouter 4 volumes d'acétone froid (-20°C) à un volume de protéine. Mélanger et mettre pour un minimum de 20 minutes à -20°C. L'échantillon peut être laissé plus longtemps si la concentration protéique est faible. Centrifuger 15 minutes, à 4°C, à 13 000 rpm. Retirer le surnageant et garder le culot. Inverser le tube pour faire sécher le culot. Resuspendre l'échantillon dans le tampon désiré.

Digestion en solution des extraits nucléaires

Les protéines, une fois précipitées à l'acétone, sont resuspendues avec 8 M urée, 200 mM Tris pH 8.0 pour obtenir une concentration protéique d'environ 72 µg/µl. Les protéines sont ensuite réduites avec du DTT à une concentration finale de 1,5 µg/µl et alkylées avec de l'iodoacétamide à une concentration finale de 4 µg/µl. L'échantillon est ensuite dilué quatre fois avec de l'eau et une quantité équivalente au volume final est ajouté de trypsine immobilisée sur des billes d'agarose. La digestion est faite pendant une période d'au moins 12 heures à 37°C avec agitation. L'échantillon est concentré avec un Zip Tip C₁₈ et la digestion est vérifiée sur le MALDI-TOF-MS. Si le spectre est approprié, l'échantillon est passé sur le Q-TOF.

Digestion en solution du BSA

Faire une solution de 200 pmol/µl dans 100 mM Tris pH8,0. Prendre 100 µl de cette solution et y ajouter 1µl de DTT 1M pour obtenir une concentration finale de 1,5 µg/µl. Incuber à 37°C pendant 45 minutes. Ajouter 16 µl d'iodoacétamide 25 mg/ml pour obtenir une concentration finale de 4 µg/µl. Incuber à la noirceur pendant 30

minutes. Diluer avec 100µl d'eau distillée. Ajouter de la trypsine pour obtenir un ratio enzyme : substrat 1 : 100 et digérer à 37°C toute la nuit.

Analyse sur spectromètre de masse

Les spectres MALDI ont été acquis à partir d'un spectromètre de masse ToFSpec 2E (Micromass, UK) dans le mode réflectron. Les voltages d'opération et du laser étaient à 20 kV et 2300 V respectivement. Les spectres obtenus par 2D-LC-MS/MS ont été obtenus à partir d'un spectromètre de masse Q-TOF 2 (Micromass, UK) couplé à un HPLC (Waters, USA).

Recherche sur banque de données

Les masses de peptide obtenues suite à l'analyse par spectrométrie de masse ont été utilisées pour faire une recherche sur le moteur de recherche Protein Prospector (<http://prospector.uscf.edu>) ou sur le moteur de recherche Mascot (<http://www.matrixscience.com>) en utilisant la banque de données NCBIInr. Les listes de masses obtenues suite au MS/MS ont été générées par le logiciel Masslynx 3.5.

RÉSULTATS

5.1 Stratégie

L'approche d'immuno-détection couplée à la spectrométrie de masse développée lors de cette étude est schématisée dans la Figure 15.

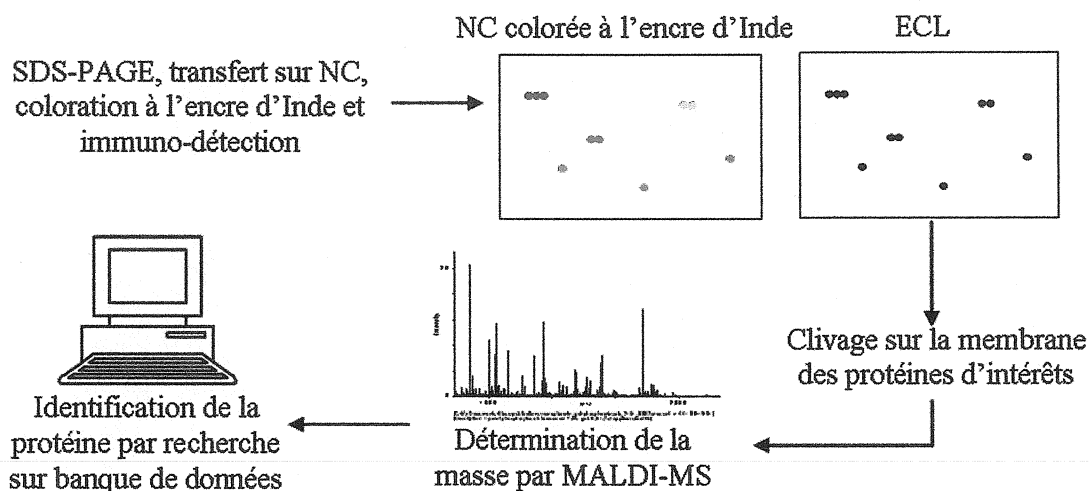


Figure 15. Approche d'immuno-détection couplée au MALDI-MS

Suite à l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose, bloquées et colorées avec un colorant compatible à l'immunodétection comme l'encre d'Inde (fount India ink). Il avait déjà été démontré par KLARSKOV K. et NAYLOY S. (2002) que la coloration avec l'encre d'Inde, après des modifications mineures au protocole, était compatible avec l'analyse de peptides obtenus après un clivage sur membrane sur MALDI-MS puisque le colorant ne semble pas s'associer aux protéines de façon covalente. Une fois la membrane colorée, elle est incubée avec des anticorps primaires spécifiques pour la protéine utilisée ou pour une modification post-traductionnelle d'intérêt. Un deuxième anticorps couplé à la HRP (pour Horse Radish Peroxidase) peut être utilisé pour détecter les protéines par ECL si nécessaire. Une fois

que les zones immunoréactives ont pu être assignées à la membrane colorée par superposition, les protéines d'intérêts peuvent être découpées et digérées par un clivage sur membrane. Les peptides générés sont analysés par MALDI-TOF-MS. Les masses monoisotopiques peuvent alors être utilisées pour faire une cartographie par mesure des masses moléculaires lorsque la séquence de la protéine est connue ou, être introduites dans une banque de données afin d'identifier la protéine.

Afin de développer la méthode présentée ici, un mélange de trois protéines a été préparé avec la BSA, la phosphorylase b (de lapin) et l'hémoglobine humaine. Les deux dernières protéines ont servi à déterminer la dilution appropriée pour l'anticorps dirigé contre la BSA afin de limiter le bruit de fond. Le mélange de protéines a été séparé sur SDS-PAGE et transféré sur une membrane de nitrocellulose. Après avoir bloqué la membrane dans une solution contenant du PVP-40, la membrane a été colorée avec l'encre d'Inde. Nous avons découvert plus tard que le Tween 20, habituellement utilisé dans les procédures d'immuno-détection, pouvait remplacer le PVP-40 dans la solution de blocage ainsi que dans les solutions de lavage.

5.2 Compatibilité avec des agents classiques d'immunobuvardage

Un exemple de résultats obtenus suite à une cartographie par mesure des masses moléculaires du clivage tryptique en solution ou sur membrane d'un pmol de BSA peut être vu aux Figures 14 à 19. Le programme de recherche MS-FIT (ProteinProspector) a été utilisé afin d'identifier la BSA (dans la banque de données protéique NCBI) et de déterminer le pourcentage de la séquence en acides aminés qui était couverte par les

masses des peptides utilisés pour faire la recherche. Bien que des variations dans le ratio signal/bruit des spectres de MALDI-MS ainsi que pour le pourcentage de la séquence couverte (typiquement moins de 5% pour le BSA) soient observées entre de mêmes échantillons, ces derniers n'influençaient pas l'identification protéique. Comme on pouvait s'y attendre, plus de peptides peuvent être observés dans le spectre du BSA digéré en solution Figure 16.

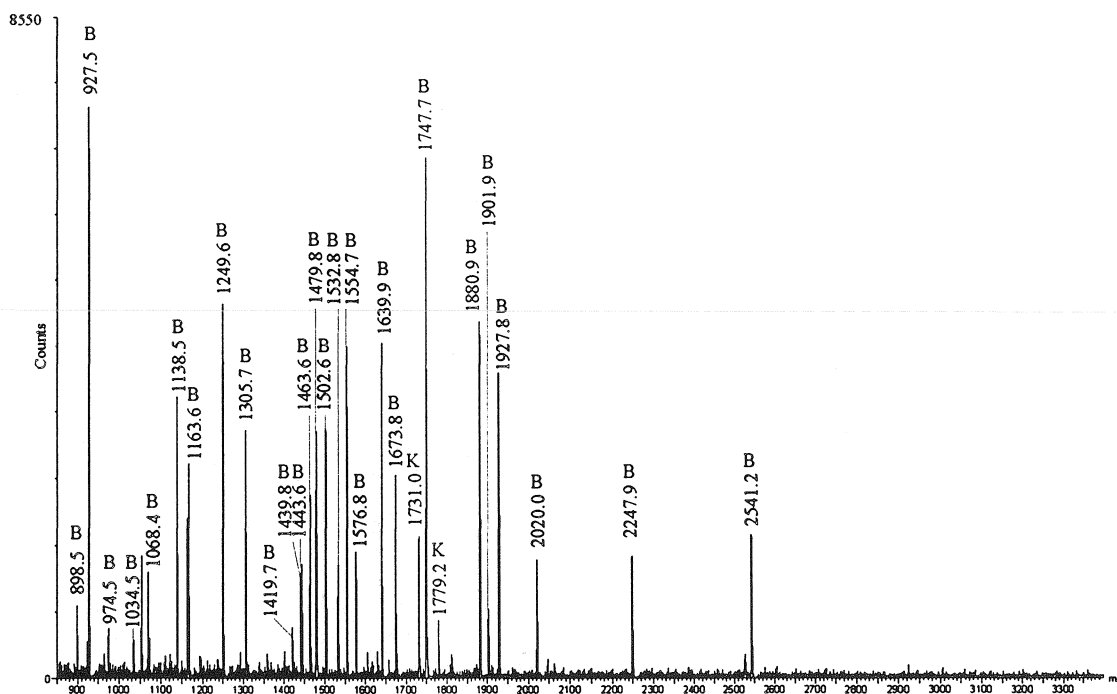


Figure 16. Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite à un clivage tryptique de 1 pmol BSA en solution. (B = BSA et K = kératine)

Les masses obtenues couvraient 51% de la séquence primaire du BSA. Malgré une diminution de l'intensité des spectres comparativement à celle obtenue suite à une digestion en solution, d'excellents spectres ont été obtenus suite à un clivage sur membrane en utilisant différentes conditions précédant l'immuno-détection comme on

peut le voir dans les Figures 16 à 21. Les spectres des Figures 17 et 18 montrent respectivement les résultats obtenus sans et avec coloration à l'encre d'Inde avant l'immuno-détection.

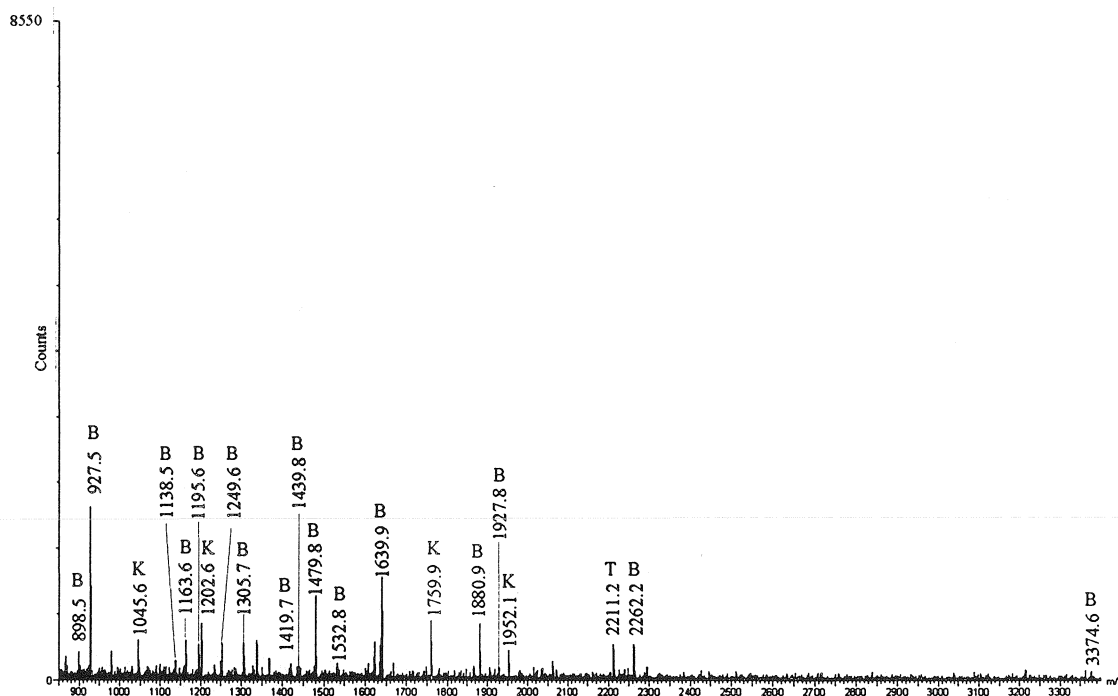


Figure 17. Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de 1 pmol BSA transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20 et immuno-déTECTÉE. (B = BSA, K = kératine et T = trypsine)

Comme il peut être observé, il n'y a pas de différence significative entre les spectres bien que le ratio signal/bruit soit inférieur dans la Figure 17, ce qui est probablement dû à la difficulté de déterminer l'emplacement exacte et délimité de la bande de protéine sans coloration. Le pourcentage de la séquence primaire du BSA couvert par les peptides obtenus suite au clivage tryptique avant coloration (46%) est supérieur au pourcentage obtenu après coloration (35%).

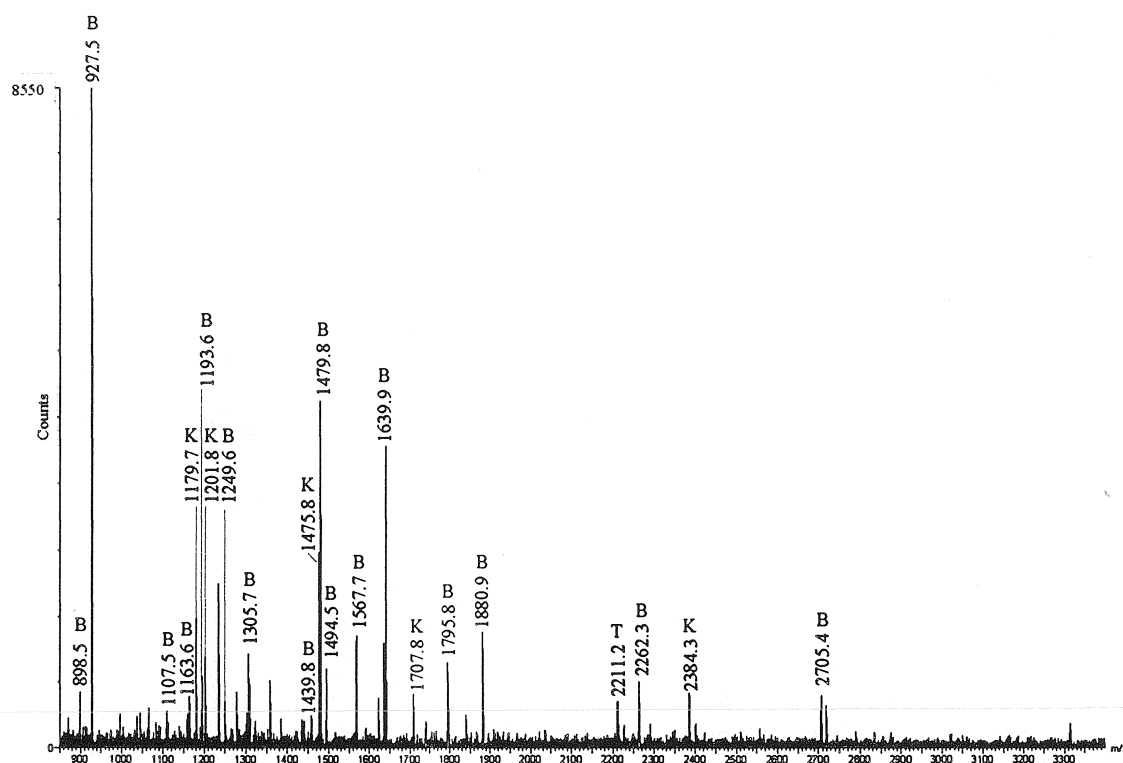


Figure 18. Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de 1 pmol BSA transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée. (B = BSA, K = kératine et T = trypsine)

Afin de nous assurer que les anticorps utilisés pour l'immuno-détection n'interféraient pas avec la qualité des spectres obtenus, une solution aqueuse contenant 20% DMF et 1% d'acide formique a été utilisée pour enlever les anticorps de la membrane suite à l'immuno-détection avant le clivage. Ceci a été confirmé par une deuxième exposition au réactif ECL qui n'a donné aucune bande. Bien que le spectre obtenu (Figure 19) contienne moins de pics attribuables à la présence de kératine, le

pourcentage de la séquence couverte du BSA (30%) est resté comparable à celui obtenu avant le retrait des anticorps (35%).

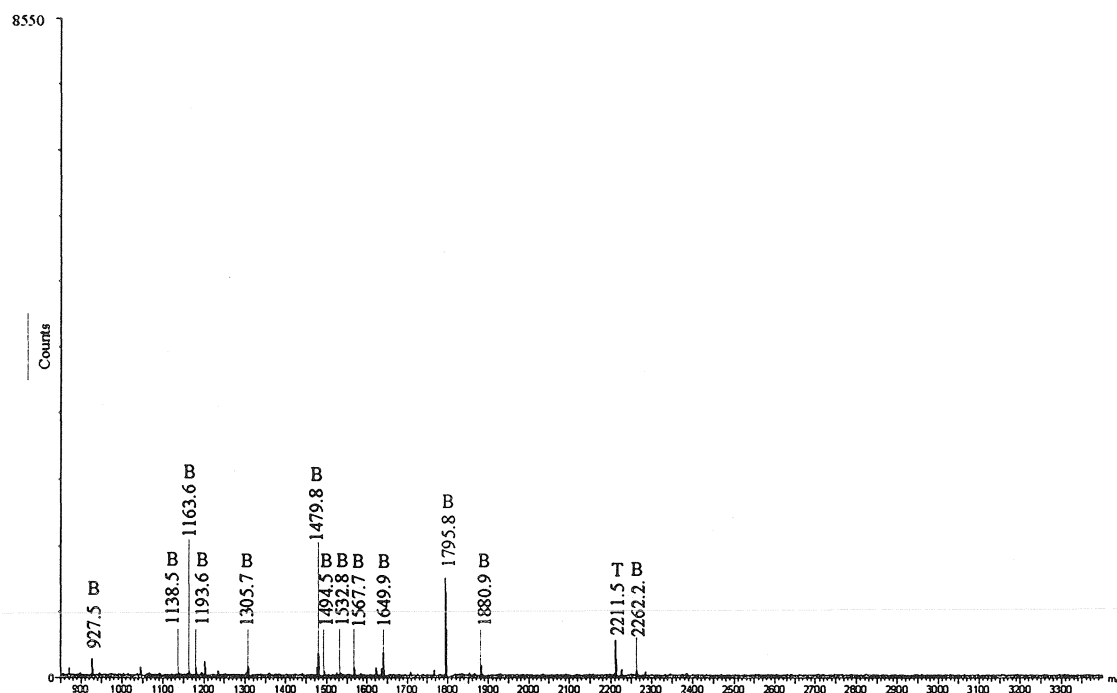


Figure 19. Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de 1 pmol BSA transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde, immuno-détectée et lavée avec une solution contenant DMF/HCOOH. (B = BSA et T = trypsine)

Nous avons tenté de bloquer la membrane de NC avec du PVP-40 (Figure 20) au lieu du Tween 20 avant la coloration à l'encre d'Inde et l'immuno-détection et avons obtenu des résultats similaires. Le pourcentage de la séquence couverte par les masses des peptides obtenus est de 35% lorsque le PVP-40 est utilisé ce qui est identique au pourcentage obtenu lorsque le Tween 20 est utilisé.

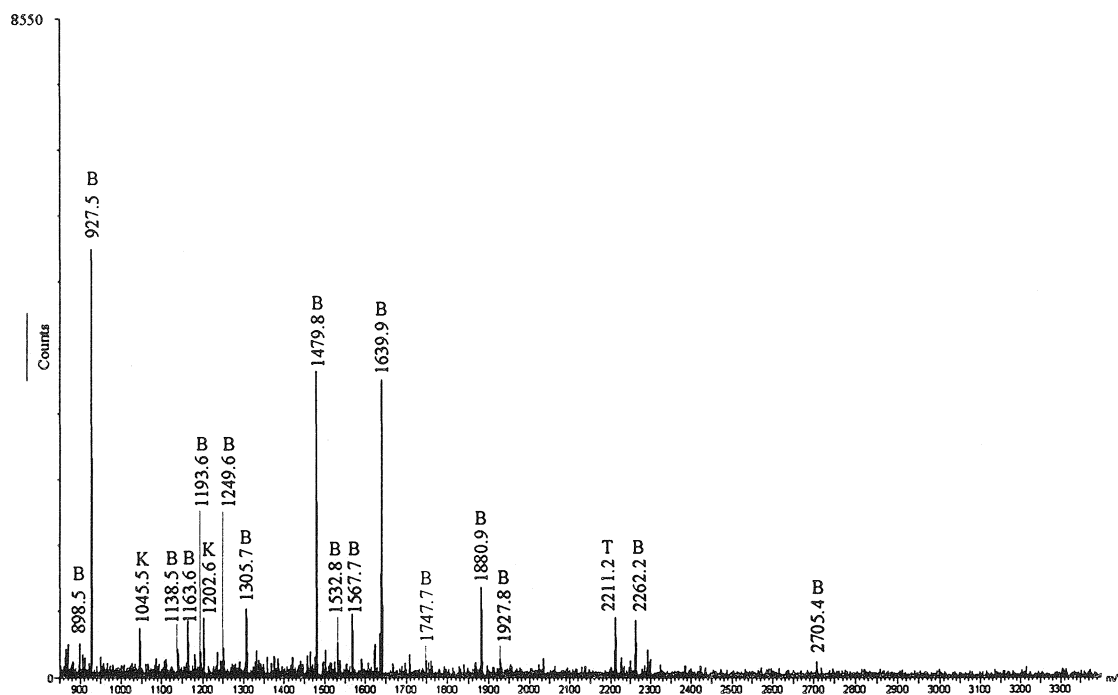


Figure 20. Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de 1 pmol BSA transférée sur membrane de NC, bloquée avec du PVP-40, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée. (B = BSA, K = kératine et T = trypsine)

Le lait en poudre est fréquemment utilisé afin de diminuer la liaison non spécifique des anticorps sur la membrane. Nous avons voulu nous assurer que la technique développée était aussi compatible avec un tel agent. Le spectre en Figure 21 a été obtenu suite à la digestion d'un pmol de BSA qui avait été transféré sur NC, bloqué avec du Tween 20, coloré avec l'encre d'Inde et immuno-détecté avec la même solution qu'avant mais cette fois-ci contenant 1% de lait en poudre. Le pourcentage de la

séquence couverte par les masses des peptides obtenus est de 20%, ce qui suffit pour l'identification protéique.

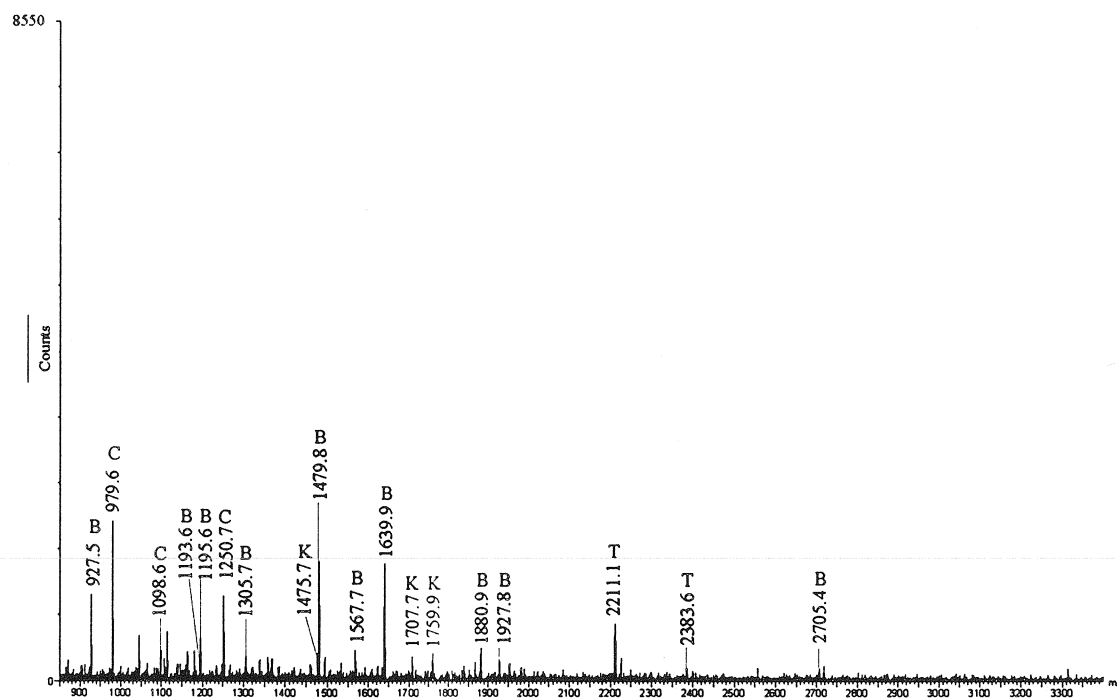


Figure 21. Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de 1 pmol BSA transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée avec 1% de lait en poudre inclus dans la solution. (B = BSA, K = kératine, C = caséine et T = trypsine)

En plus des peptides tryptiques du BSA, de la kératine et des fragments d'autodigestion de la trypsine, des peptides d'une masse de 978,6 Da, 1097,6 Da et 1249,7 Da ont pu être observés sur le spectre de la Figure 21. Ces derniers sont dus à la caséine contenue dans le lait en poudre qui n'a pas totalement été enlevée durant les étapes de lavage. Par contre, puisqu'ils peuvent être observés sur un contrôle (Figure

22), ils n'interfèrent pas avec l'analyse des peptides inconnus puisque le BSA a quand même été identifié malgré son faible pourcentage de séquence comparativement aux autres spectres obtenus. Un tableau comparatif (Tableau IV) des peptides observés suite au clivage de 1 pmol de BSA par la trypsine avec les différentes conditions peut être vu en Annexe I.

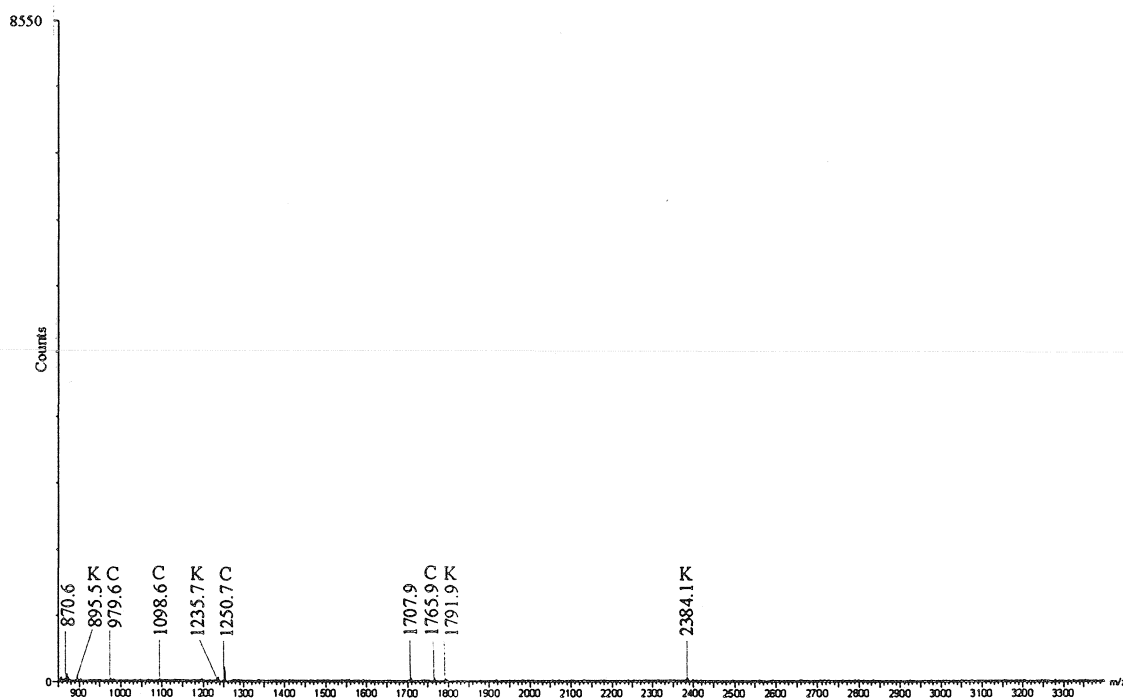


Figure 22. Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage d'un morceau de membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée avec 1% de lait en poudre inclus dans la solution. (K = kératine et C = caséine)

5.3 Sensibilité

Pour démontrer la sensibilité de la présente approche, 100 femtomoles de BSA ont été appliquées sur un gel SDS-PAGE pour être ensuite traité par le même protocole qu'illustré en Figure 19. Le spectre obtenu en Figure 23 nous permet de voir plusieurs peptides qui peuvent être attribués au BSA ainsi que l'image obtenue après le ECL. Il faut noter que lorsque de petites quantités (inférieures à 1pmol) sont utilisées, il est important de prendre toutes les précautions afin d'éviter la contamination à la kératine. Un rinçage systématique des embouts de pipettes et des tubes utilisés pour les réactions avec de l'isopropanol ou de l'acétonitrile aide énormément.

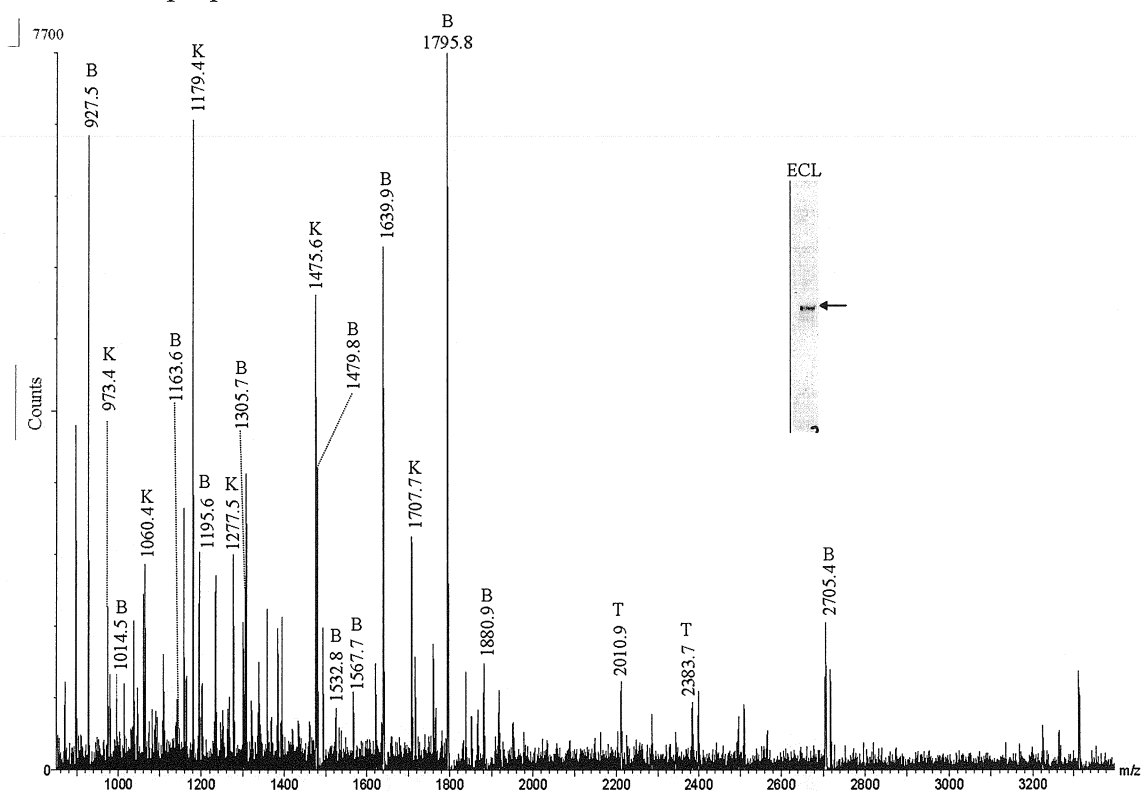


Figure 23. Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de 100 femtomol de BSA transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée.

(B = BSA, K = kératine et T = trypsine)

5.4 Cartographie par mesure des masses moléculaires

Afin de démontrer les applications possibles de la méthode développée, la β -galactosidase (*E.Coli*), l'ovalbumine (provenant du poulet) et la transferrine (contenue dans du sérum de rat) ont été séparées par SDS-PAGE. Toujours en suivant les mêmes procédures que précédemment, les protéines ont été transférées sur NC, bloquées, colorées, immuno-détectées et clivées sur membrane par la trypsine. Les spectres obtenus pour ces trois protéines (Figures 24, 25 et 26) ont permis d'identifier sans ambiguïté les trois protéines. Le pourcentage de la séquence couverte était de 31% pour la β -galactosidase, 30,5% pour la transferrine et 25% pour l'ovalbumine.

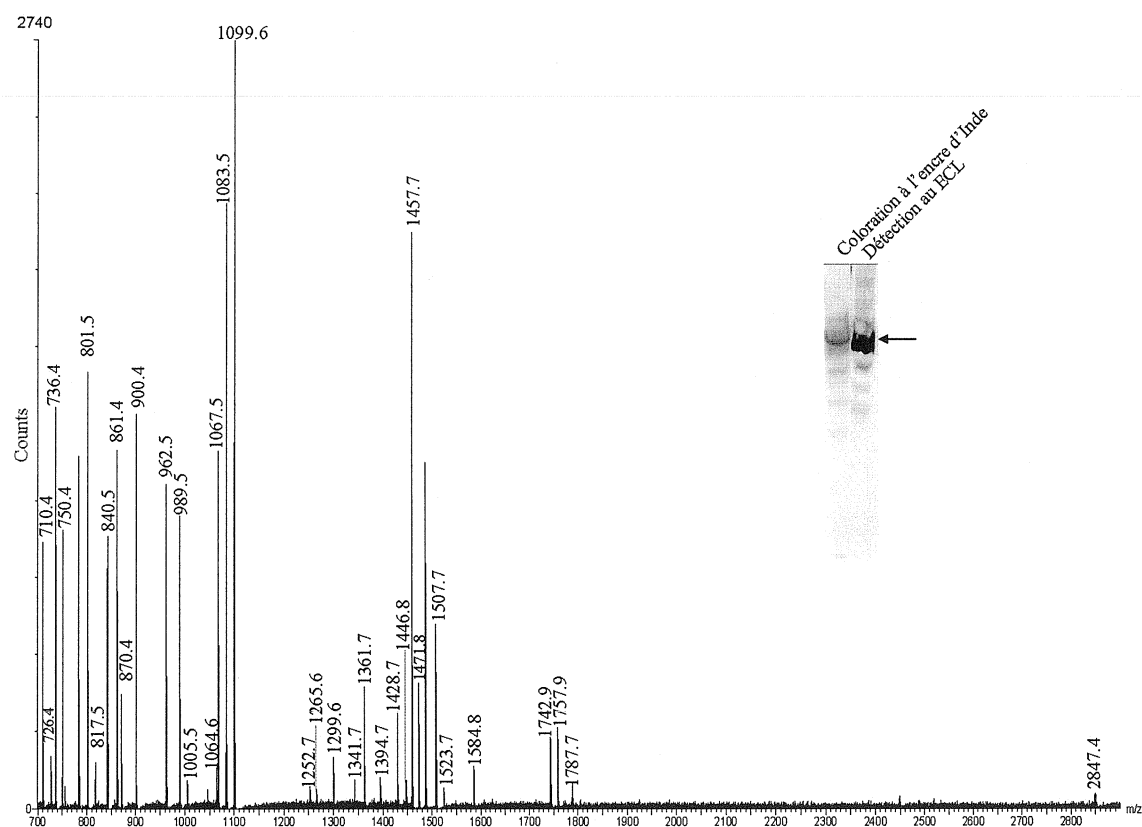


Figure 24. Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de la β -galactosidase transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée.

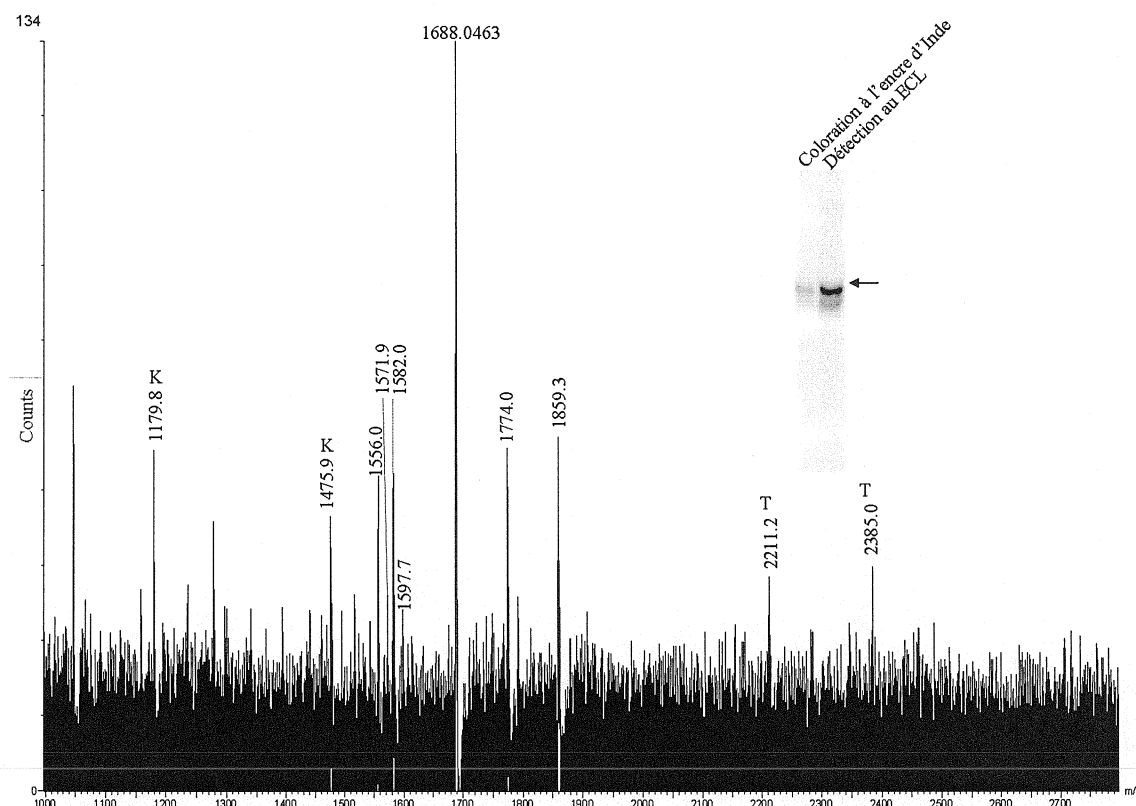


Figure 25. Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de l'ovalbumine transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, coloré avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée.

Ces pourcentages sont légèrement inférieurs à ceux obtenus lorsque aucune immunodétection n'est faite. Dans ce cas, le pourcentage de la séquence couverte est respectivement de 32,5%, 40,5% et 35,5% pour la β -galactosidase, la transferrine et l'ovalbumine. Bien de des quantités comparables de β -galactosidase et d'ovalbumine aient été utilisée, une différence significative entre l'intensité de signal des deux protéines est observée. Plusieurs facteurs, incluant une variabilité dans l'efficacité des transferts du gel à la membrane, des différences d'affinité de liaison à la membrane de nitrocellulose et/ou une protéolyse inefficace des glycoprotéines peuvent avoir

contribués à cette différence d'intensité entre l'ovalbumine et la β -galactosidase. Le retrait des anticorps avec la solution aqueuse contenant 20% DMF et 1% d'acide formique n'a pas amélioré la qualité des résultats pour ces protéines et a même eu l'effet contraire, c'est-à-dire de diminuer l'intensité du signal obtenu. Tout ceci confirme donc les résultats obtenus pour la BSA.

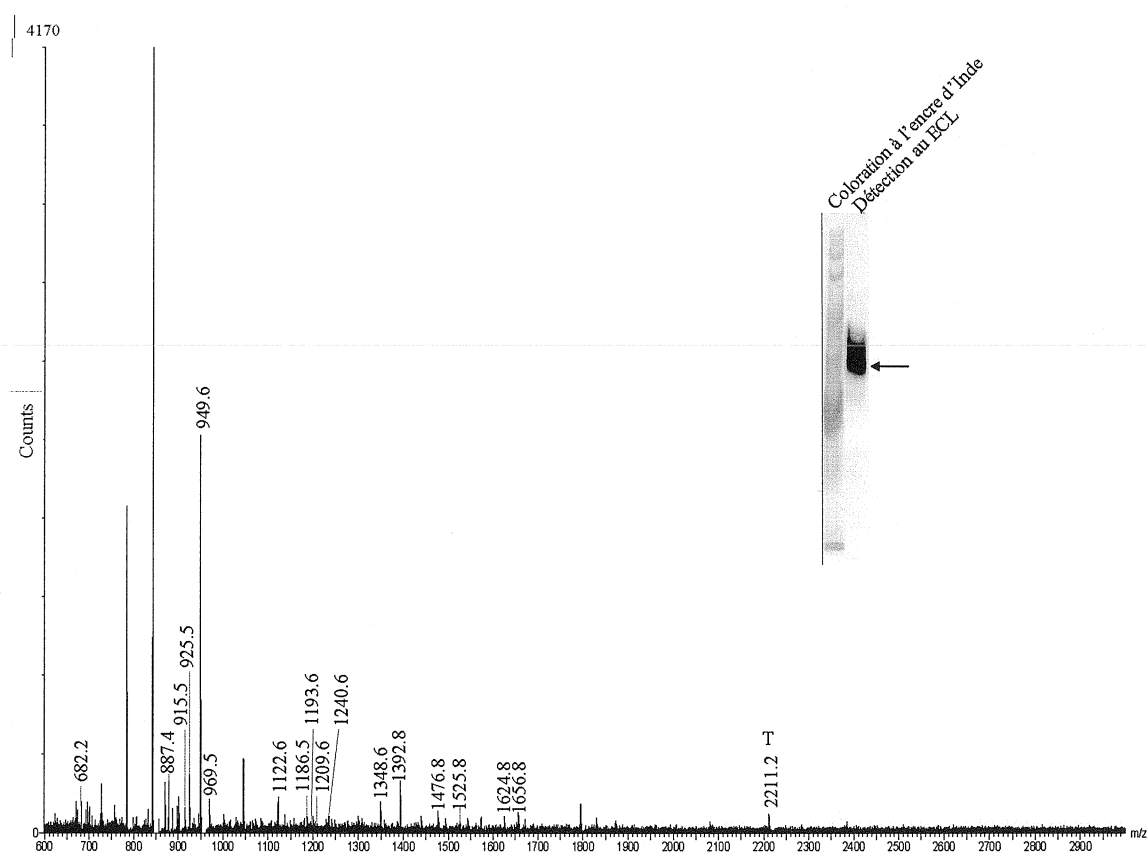


Figure 26. Peptides obtenus par MALDI-TOF-MS suite au clivage tryptique de la transferrine, provenant du sérum de rat, qui avait été transférée sur membrane de NC, bloquée avec du Tween 20, colorée avec de l'encre d'Inde et immuno-détectée.

5.5 Identification de protéines phosphorylées sur le résidu tyrosine

Puisque la phosphorylation est une importante caractéristique des protéines dans de nombreux processus cellulaires, nous avons voulu évaluer si notre approche pouvait être utilisée sur un extrait de tissu pour détecter la présence de protéines phosphorylées. Nous avons séparé les protéines d'un homogénat de foie de rat par 2D-SDS-PAGE, transféré le tout sur NC, bloqué avec du Tween 20 et coloré la membrane avec l'encre d'Inde (Figure 27 A). Afin de déterminer quelles protéines étaient phosphorylées, nous avons utilisé un anticorps monoclonal antiphosphotyrosine couplé à la HRP. Suite à la détection au ECL, la zone immuno-réactive indiquée par une flèche sur la Figure 27 B a été découpée de la membrane de NC et clivée sur membrane par la trypsine.

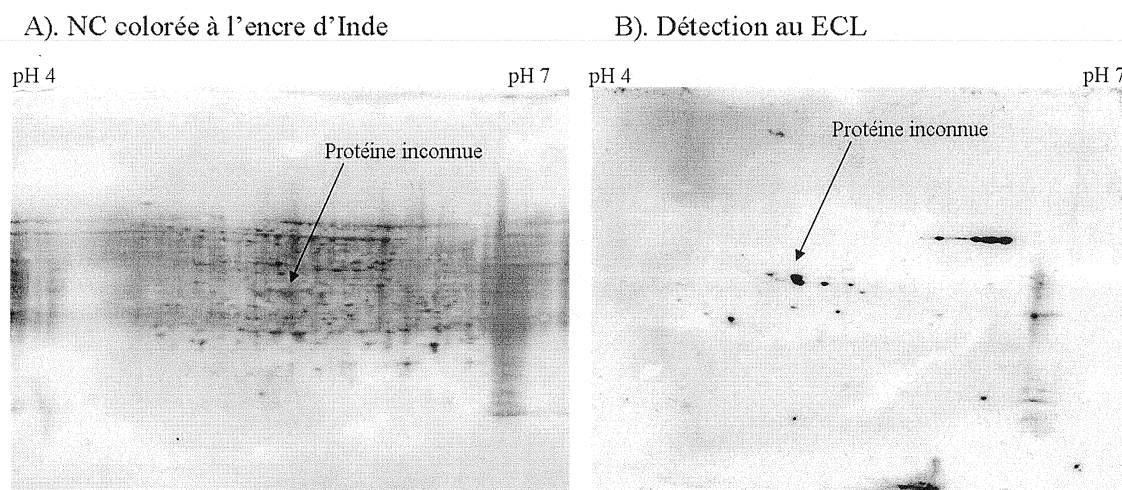


Figure 27. Identification de protéines phosphorylées suite à une séparation par 2D-SDS-PAGE d'un homogénat de foie de rat. (A) Membrane de NC bloquée au Tween 20 et colorée à l'encre d'Inde. (B) Détection des protéines phosphorylées sur le résidu tyrosine par anticorps monoclonal antiphosphotyrosine-HRP (dilution 1/750).

Les masses des peptides obtenus par MALDI-MS (Figure 28) suite à la digestion tryptique sur membrane ont été utilisées pour effectuer une recherche sur la banque de données SwissProt du programme de recherche MS-Fit (ProteinProspector). La protéine a été identifiée comme régucalcine (ou senescence marker protein 30) avec 46% de la séquence protéique couverte. L'identification de la protéine a aussi été reconfirmée par nano-LC-MS/MS grâce à la fragmentation des peptides ayant une masse de 1190,6 Da et 1268,7 Da obtenus à partir d'une digestion dans le gel d'une autre expérience effectuée avec les mêmes conditions de séparation mais où le gel avait été coloré au bleu de Coomassie G250.

La régucalcine est une protéine qui lie le calcium (Ca^{2+}) et qui a un rôle multifonctionnel comme protéine inhibitrice sur les voies de signalisation intracellulaires (YAMAGUCHI M., 2000 a, b). L'ARNm de la régucalcine ainsi que la protéine elle-même sont présentes en grande quantité dans le cortex du foie et du rein (SHIMOKAWA N., YAMAGUCHI M., 1992 et YAMAGUCHI M., ISOGAI M., 1993) ce qui explique pourquoi nous avons pu l'identifier dans l'homogénat de foie de rat. La régucalcine joue aussi un rôle dans le maintien de l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire et dans l'inhibition de plusieurs protéines kinases et tyrosines kinases dépendantes du Ca^{2+} . De plus, elle affecte les protéines phosphatases, l'oxyde nitrique (NO) synthase (IZUMI T. *et al*, 2003) et contrôle l'augmentation de la synthèse de l'ADN et de l'ARN nucléaires dans les cellules en prolifération (TSURASAKI Y., YAMAGUCHI M., 2002 a,b). Enfin, la régucalcine a aussi un effet de suppression sur la mort cellulaire et l'apoptose (IZUMI T., YAMAGUCHI M., 2004).

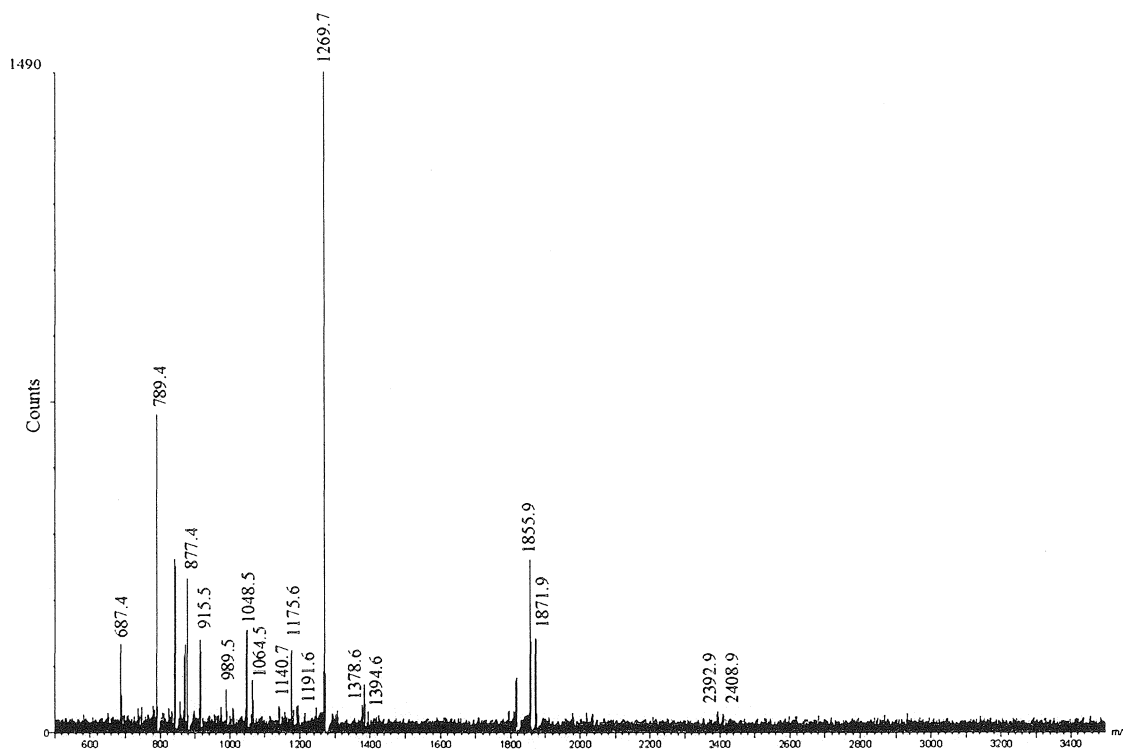


Figure 28. Peptides tryptiques obtenus par MALDI-MS suite à l'immuno-détection effectuée à la Figure 27.

5.6 Extraits nucléaires EcR 293

Puisque la méthode développée lors de cette étude a fait ses preuves pour l'identification de protéines provenant d'un tissu (homogénat de foie de rat), nous avons décidé de l'utiliser afin d'étudier des extraits nucléaires de cellules EcR 293. L'étude d'un compartiment cellulaire, au lieu de la cellule totale, permettra de mieux visualiser les changements pouvant se produire dans la cellule à un endroit précis et d'éviter de retrouver plus d'une protéine au même emplacement sur le gel lors de la séparation. L'idée générale préconisée afin d'identifier les protéines des extraits nucléaires provenant des cellules EcR 293 est illustrée à la Figure 29. Des extraits nucléaires sont préparés et utilisés pour effectuer trois expériences différentes. La première est une

séparation par 2D-SDS-PAGE, suivie d'un transfert sur membrane de NC et immuno-détection des protéines phosphorylées. La deuxième est une digestion en solution des extraits suivie d'un 2D-LC-MS/MS. Ces deux expériences mèneront à une recherche sur banques de données afin d'identifier un maximum de protéines nucléaires. La troisième expérience sera de tenter de quantifier des changements de niveaux d'expression de protéines lorsque la protéine Max est surexprimée dans les cellules EcR 293 à l'aide d'un marquage protéolytique comme expliqué préalablement dans l'introduction.

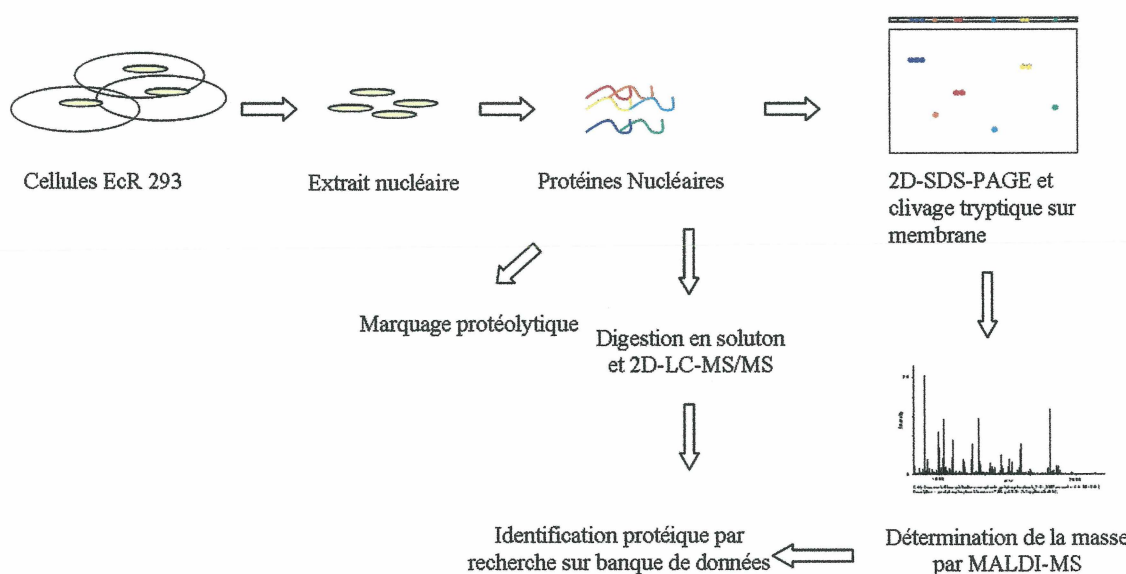


Figure 29. Schéma général de l'approche utilisée avec les extraits nucléaires provenant des cellules EcR 293.

5.6.1 Identification de protéines phosphorylées.

Les protéines, contenues dans les extraits nucléaires, ont été séparées par 2D-SDS-PAGE à l'aide d'une bande de pH 6-11 pour la 1^{ère} dimension et sur un gel 10% SDS-PAGE pour la 2^e dimension. Elles ont été transférées sur une membrane NC et nous avons utilisée la méthode que nous avons développée, soit le couplage du transfert

sur NC avec le clivage enzymatique sur membrane. Brièvement, la membrane de NC a été bloquée avec du Tween 20, colorée à l'encre d'Inde et utilisée afin d'effectuer la détection des protéines phosphorylées sur un résidu sérine avec un anticorps monoclonal antiphosphosérine (dilué 1/1000). Afin de pouvoir visualiser les protéines avec la méthode de détection ECL, un deuxième anticorps, dirigé contre les IgG de lapin, couplé à la HRP (dilué 1/100000) a été utilisé. Le film obtenu à partir de cette détection peut être vu à la Figure 30.

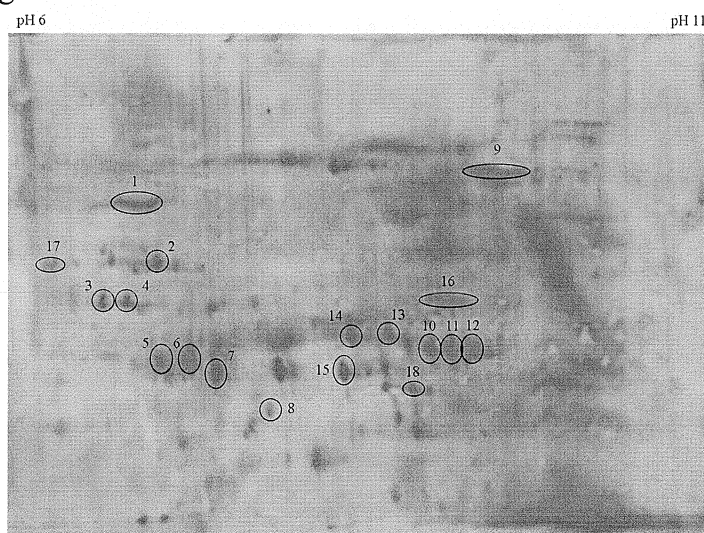


Figure 30. Extrait nucléaire de cellules EcR 293 séparé par 2D-SDS-PAGE. Une bande de pH 6-11 (gauche à droite) et un gel 10% SDS-PAGE ont été utilisés. Le film obtenu après détection au ECL de protéines phosphorylées sur le résidu sérine grâce à un anticorps monoclonal antiphosphosérine et un anticorps anti-IgG de lapin couplé à la HRP est représenté ainsi que les zones qui ont été découpées afin d'effectuer une identification suite à un clivage tryptique sur membrane.

Les zones immuno-réactives qui pouvaient être vues sur la membrane de NC colorée à l'encre d'Inde ont été découpées et soumises à un clivage tryptique sur membrane. Le résultat des identifications protéiques peut être visualisé dans le Tableau III. Toutes les zones découpées ont généré d'excellents spectres. Dix-sept zones sur dix-huit ont été identifiées à partir des spectres obtenus par MALDI-TOF-MS suite à un clivage enzymatique à la trypsine. Au total, onze protéines ont été identifiées à partir de la banque de données NCBI sur le programme de recherche MS-Fit (ProteinProspector). Les pourcentages de séquences couvertes varient entre 28% et 76%. Grâce à un programme de prédiction de sites de phosphorylation (CBS NetPhos 2.0 server, www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/), nous avons pu déterminer que toutes les protéines identifiées contiennent plusieurs sites potentiels de phosphorylation sur le résidu sérine, qui avait été ciblé par l'anticorps anti-phosphosérine. De plus, en observant les masses des peptides obtenus sur les spectres de MALDI-MS nous avons pu constater que certains peptides pourraient effectivement être phosphorylés. Cette information ne peut être obtenue qu'en spécifiant au moteur de recherche la possibilité que des peptides soient phosphorylés. Malheureusement, on ne peut spécifier que seul le résidu sérine peut être phosphorylé. Nous avons utilisé la banque de données des gènes cibles de c-Myc (<http://www.mycancergene.org>) afin de déterminer si certaines des protéines identifiées en faisaient partie. Les gènes des protéines : énoïase 1, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, hnRNP A1, hnRNP A2/B1 et malate déshydrogénase, sont tous des cibles de c-Myc. Ces protéines pourraient donc être potentiellement affectées par un changement de niveau d'expression de la protéine c-Myc.

Tableau III. Sommaire des résultats obtenus pour l'identification des protéines phosphorylées sur la sérine isolées à partir d'extraits nucléaires des cellules EcR293.

# Zone	Protéine Identifiée	Masse (Da)	% de la séquence couverte	Sites de phospho- sérine prédits
1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	60188	38	19
2	Enolase 1	47169	76	8
3	BUB3 homolog	36955	55	11
4	BUB3 homolog	36955	52	11
5	Glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase	36054	58	11
6	Glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase	36054	60	11
7	Glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase	36054	28	11
8	Heat shock protein 70 kDa	70053	28	18
9	Keratin 1	66067	40	55
10	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	34196	49	22
11	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	34196	60	22
12	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	34196	48	22
13	Glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase	36054	57	11
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	36006	54	12
14	Glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase	36054	63	11
	Malate dehydrogenase	35532	48	9
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	36006	48	12
15	---	---	---	---
16	Poly(A) polymerase gamma	82803	14	32
17	Heat shock protein 60 kDa	61055	38	12
18	Aldolase A	39332	49	4

5.6.2 Identification de protéines nucléaires par 2D-LC-MS/MS.

Les extraits nucléaires, obtenus à partir des cellules EcR 293, ont été précipités avec de l'acétone et resuspendus dans un tampon pH 8.0 contenant 8M Urée et 200mM Tris. Une réduction des ponts disulfures avec du DTT et une alkylation avec de l'iodoacétamide (pour que les ponts ne puissent se reformer) ont été faites avant de diluer l'échantillon quatre fois pour obtenir une concentration finale d'urée de 2M et de Tris de 50 mM. De la trypsine immobilisée sur billes d'agarose a alors été ajoutée afin de faire un clivage en solution. La trypsine étant fixée sur les billes, l'échantillon n'avait qu'à être centrifugé pour éliminer la trypsine du mélange. Lorsque le clivage fut terminé et confirmé par MALDI-TOF-MS, l'échantillon a été concentré à l'aide d'une colonne C18 fixée à la point de l'embout de pipette (Zip Tip C₁₈) et élué avec un mélange 50 :50 eau : isopropanol. Le volume de l'échantillon est réduit en l'introduisant dans un speedvac, afin de diminuer la quantité d'isopropanol dans l'échantillon, et une solution aqueuse contenant 1% d'ACN, 1% d'isopropanol et 0,2% d'acide formique est ajouté afin de dilué l'échantillon la concentration désirée. Une fois l'échantillon fin prêt, il est utilisé pour faire du 2D-LC-MS/MS illustré en Figure 31. Les peptides sont passés dans une colonne échangeuse d'ions (cations) (polysulfoethyl A ion exchange, The Nest Group, US), où ils sont élués avec des concentrations croissantes d'acétate d'ammonium dans 0.2% d'HCOOH et séparés sur une colonne capillaire, d'une longueur de 7cm long et un diamètre intérieur de 75 µm, remplie d'une phase inverse de C18 (Microsorb 5 µm, 310 Å (Varian)). Les chromatogrammes obtenus suite au 2D-LC-MS/MS peuvent être vu à la Figure 32.

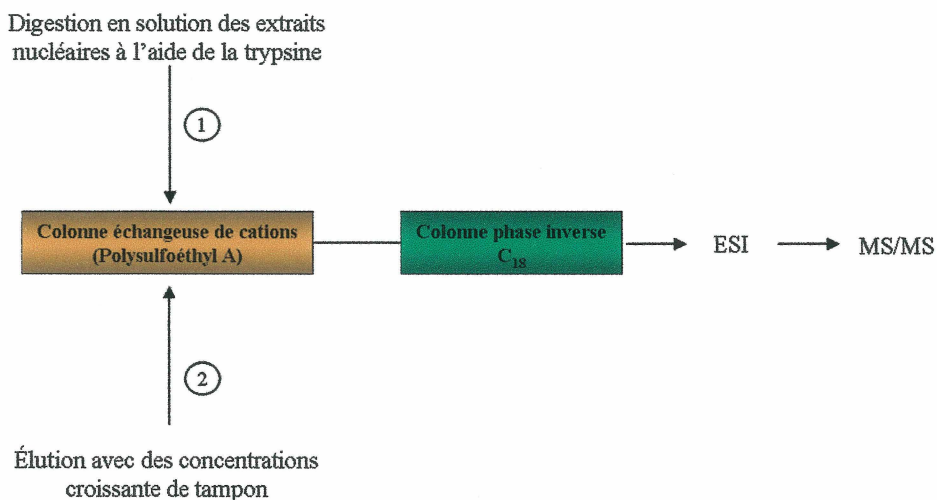


Figure 31. Schéma général du 2D-LC-MS/MS

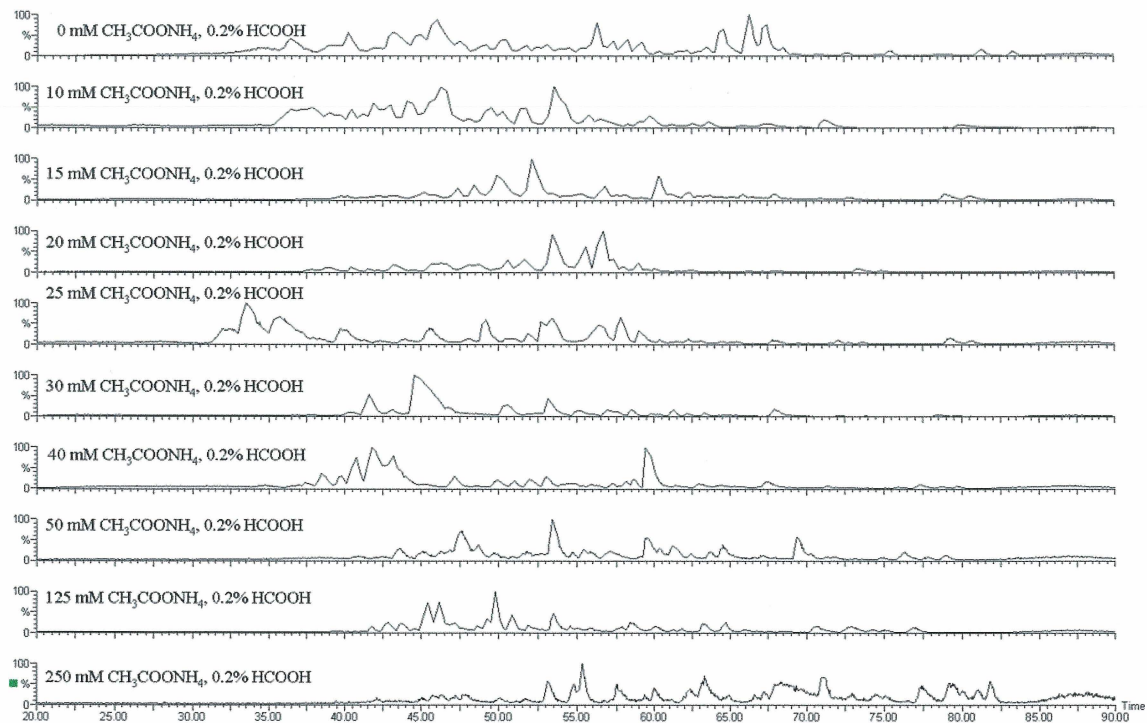


Figure 32. Chromatogrammes obtenus suite au 2D-LC-MS/MS des extraits nucléaires digérés en solutions. Les peptides ont été élués avec des concentrations croissantes d'acétate d'ammonium dans 0,2% HCOOH.

Les masses des ions de fragmentation obtenues à partir des ions parents choisis ont été introduites dans le moteur de recherche MASCOT afin de faire une identification protéique à partir de la banque de données NCBI. Une centaine de protéines ont pu être identifiées à partir des données obtenues du 2D-LC-MS/MS (voir Annexe II, Tableau V). Ces données nous permettront d'identifier à quelle protéine appartiennent les peptides observés lors du 2D-LC-MS/MS et ainsi nous faciliteront la tâche lors de la détermination des changements de niveaux d'expression des protéines entre les cellules EcR 293 normales et celles dans lesquelles la protéine Max est surexprimée puisque que la méthode visée passe par un marquage protéolytique des peptides et non des protéines entières.

5.6.3 Marquage protéolytique

En se basant sur la méthode de marquage protéolytique présentée dans la section 4.3 de l'introduction, les extraits nucléaires ont été digérés avec de la trypsine dans des tampons contenant soit $H_2^{16}O$ ou $H_2^{18}O$ afin de déterminer les changements d'expression des protéines dans les cellules EcR 293 comparativement aux cellules EcR 293 surexprimant la protéine Max. Le clivage par la trypsine, après les acides aminés arginine ou lysine, génère une extrémité C-terminale contenant deux atomes d'oxygène. La coupure du lien amide permet l'incorporation d'un atome d'oxygène marqué (^{18}O) puisqu'elle requiert l'utilisation d'une molécule d'eau. Par échange avec le milieu un deuxième atome d'oxygène marqué peut être introduit à l'extrémité C-terminale. Malheureusement, l'incorporation de 2 atomes ^{18}O a été incomplète et ne nous a pas permis de comparer de façon appropriée les niveaux d'expression de différentes

protéines. Un exemple est présenté en Figure 33. Si l'on examine le bas de la figure, plus particulièrement à droite, la masse monoisotopique des peptides digérés dans de l'eau normale est indiquée en bleu. Les pics suivant représentent la distribution isotopique de ce même peptide. Lorsque l'on observe maintenant le haut de la figure, plus particulièrement à droite, on peut observer un amas de pics. Parmi ces derniers on peut observer deux masses indiquées en bleues qui correspondent à la masse monoisotopique du peptide non marqué retrouvé en bas mais cette fois-ci additionnée de la masse d'un ou deux atomes de ^{18}O . Idéalement, nous aurions voulu retrouver seulement un peptide marqué ayant une masse monoisotopique correspondant à la masse monoisotopique du peptide non marqué additionnée de la masse de deux atomes de ^{18}O . Aucun des peptides observés n'avaient une incorporation de deux atomes de ^{18}O , même après 20h d'incubation avec de la trypsine et un remplacement du tampon pour un tampon frais.

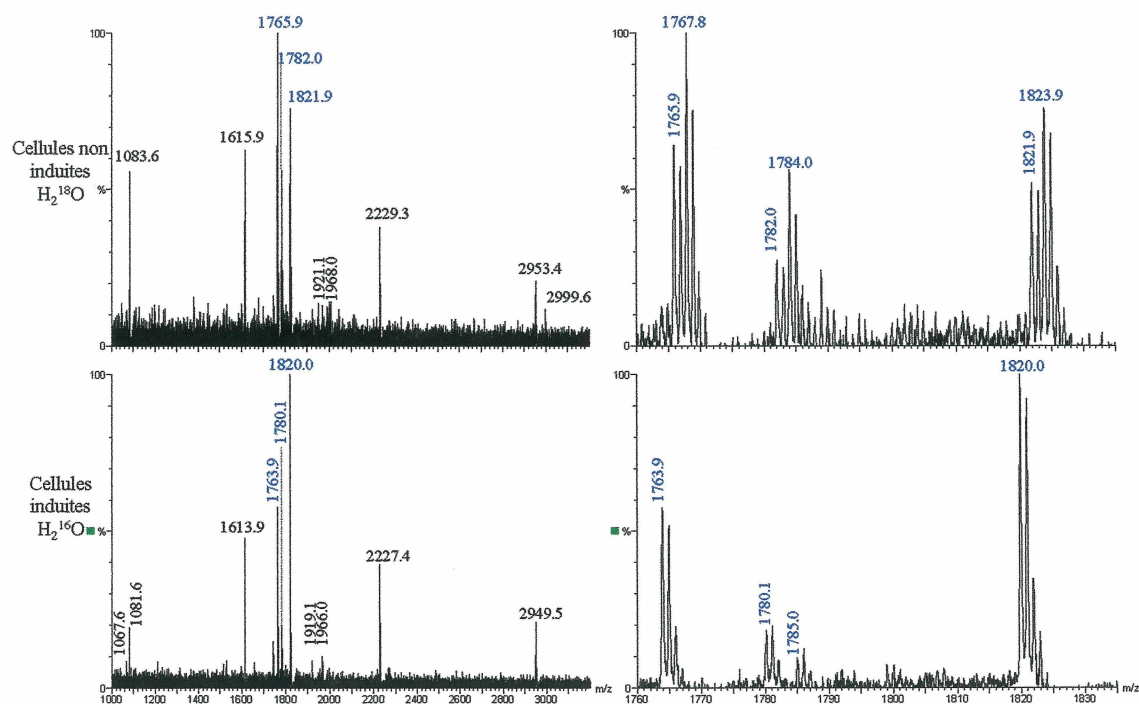


Figure 33. Incorporation partielle de deux atomes de ^{18}O déterminée par MALDI-TOF-MS sur des extraits nucléaires digérés à l'aide de la trypsine.

DISCUSSION

Le but premier de cette étude était de développer une méthode permettant d'associer l'immunobuvardage de type Western à la spectrométrie de masse. Cette méthode permet de pouvoir cibler certaines protéines ou modifications post-traductionnelles et d'ensuite les identifier. Une fois cette méthode développée, une comparaison entre les cellules EcR 293 dans lesquelles la protéine Max est surexprimée aux cellules EcR 2933 n'ayant pas subi aucune modification pourrait être faite en comparant les niveaux de phosphorylation et en essayant de quantifier les changements dans les niveaux d'expression des protéines retrouvées dans des extraits nucléaires.

Pour ce faire, nous avons d'abord développé une méthode nous permettant de détecter des protéines grâce à un immunobuvardage de type Western avec des anticorps monoclonaux dirigés contre une protéine ou une modification post-traductionnelle comme la phosphorylation. Une fois la position de la protéine déterminée sur la membrane, elle peut être découpée et clivée à l'aide de la trypsine afin d'obtenir un spectre de masses pouvant être utilisé dans des banques de données pour identifier la protéine en question. Nous avons élaboré la méthode en utilisant premièrement une protéine standard : la BSA. Afin de s'assurer que la méthode développée serait compatible avec la spectrométrie de masse, plusieurs conditions ont été testées lors de l'immunobuvardage de type Western.

Nous avons d'abord effectué une digestion en solution du BSA afin d'avoir une idée globale du pourcentage de la séquence en acides aminés qui pouvait être couverte

par les masses des peptides obtenus par MALDI-TOF-MS. Naturellement, ce pourcentage est supérieur à tous ceux obtenus suite au clivage sur membrane puisqu'il n'y a qu'une seule étape à faire suite au clivage en solution avant de déposer l'échantillon sur la cible du MALDI soit de mélanger la BSA avec de la matrice α -cyano.

Le clivage sur membrane de 1 pmol de BSA nous a permis de déterminer que notre approche était compatible avec plusieurs réactifs déjà utilisés lors de l'immuno-détection. Nous avons aussi pu déterminer les endroits dans les manipulations où une perte d'échantillon pourrait avoir lieu. Le premier clivage sur membrane a été fait sans la coloration avec l'encre d'Inde. Le spectre obtenu donne le plus haut pourcentage de séquence couverte après la digestion en solution comparativement aux autres conditions utilisées. Il est donc évident que l'ajout d'étapes de rinçage lors de la coloration ainsi que lors de l'immuno-détection mène fort probablement à une perte de matériel sur la membrane et que ceci se répercute sur le nombre de peptides qui peuvent être obtenus sur le spectre MALDI-TOF-MS. Par contre, lorsque la membrane n'est pas colorée à l'encre d'Inde, il est beaucoup plus difficile de découper seulement la bande de BSA en prenant un minimum de membrane puisque l'emplacement de la bande est déterminé par une superposition du film développé avec la membrane. Il est donc beaucoup plus avantageux de colorer la membrane au tout début ou après avoir fait l'immuno-détection de façon à pouvoir visualiser la bande de protéine et la découper. Il est possible de recolorer la membrane si la coloration s'est trop estompée ou d'utiliser des colorants plus sensibles comme des colorants fluorescents (BERGGREN K. *et al*, 1999) ou à

l'argent (VAN OOSTVEEN I. *et al*, 1997) qui sont tous deux compatibles avec la spectrométrie de masse.

Deux composés qui sont utilisés dans plusieurs protocoles d'immuno-détection, le Tween 20 et le PVP-40, ont été testés. Les résultats obtenus pour ces derniers sont identiques en terme de pourcentage de la séquence couverte et extrêmement semblables lorsque l'on observe les peptides qui ont été identifiés avec ces deux produits. Le Tween 20 et le PVP-40 sont donc deux agents qui peuvent être utilisés avec la méthode développée.

L'utilisation d'anticorps lors de l'immuno-détection n'interfère en rien avec la digestion tryptique ou l'identification protéique puisque lorsque ces derniers sont retirés de la membrane, avant la digestion, avec une solution contenant du DMF et de l'acide formique, le pourcentage de la séquence couverte obtenue est similaire ou inférieur à celui obtenu lorsque les anticorps ne sont pas retirés. Encore une fois ceci peut être expliqué par les étapes de lavage qui sont ajoutées au protocole, lorsque l'on veut retirer les anticorps, qui peuvent mener à une perte additionnelle de protéine. L'identification de la protéine n'est pas affectée en soit, mais le pourcentage de la séquence couverte est diminué. Nous recommandons donc de ne pas retirer les anticorps de la membrane puisque le résultat obtenu est meilleur, mais ceci peut être fait quand même lorsque nécessaire.

Nous avons tenté d'identifier les peptides obtenus suite au clivage tryptique qui pourraient provenir des anticorps (immunoglobulines) et n'avons pas pu en trouver un seul. Ceci suggère que la dilution utilisée pour les anticorps ainsi que la quantité retrouvée liée à la surface de la membrane n'est pas suffisante pour obtenir des peptides en assez grande quantité pour être visualisés sur un spectre de MALDI-MS. Ceci pourrait effectivement être le cas si les bandes visualisées par ECL contenaient une mono-couche d'anticorps et plusieurs couches de l'antigène soit la protéine. La surface de liaison des anticorps ($\sim 72 \text{ nm}^2$) comparativement à celle de la membrane recouverte de protéines ($\sim 4 \text{ mm}^2$) nous laisse croire que la quantité maximale d'anticorps pouvant être retrouvés liée sur une bande de protéine serait de 84 fmoles. Cette quantité devrait en fait être inférieure lorsque l'on tient compte de l'encombrement stérique provenant de tous les anticorps liés au même endroit. Il est donc normal qu'aucun peptide tryptique provenant des anticorps ne puisse être observé. Ni la coloration à l'encre d'Inde, ni la détection faite à l'aide du réactif ECL interfèrent avec l'analyse MALDI-TOF-MS.

Le lait en poudre, un autre produit fréquemment utilisé lors d'immuno-détection, a été le dernier produit que nous avons testé. Les résultats obtenus suite à l'utilisation de ce dernier se sont avérés être les moins bons concernant le pourcentage de la séquence couverte pour la BSA. C'est que le lait en poudre contient de la caséine qui peut, elle aussi, être digérée par la trypsine et générer des peptides. Ces derniers sont visibles sur le spectre de masse, mais peuvent aussi être vus sur un échantillon contrôle et donc n'interfèrent pas avec l'identification protéique. Nous n'avons pas essayé d'autres agents pour bloquer la membrane, mais il est fort probable que des résultats similaires

pourraient être obtenus. Le choix de quel agent à utiliser dépend donc du protocole utilisé pour l'immuno-détection.

La sensibilité de notre méthode a été démontrée avec l'analyse de 100 fmoles de BSA. Puisque deux bandes de BSA étaient obtenues suite à la migration sur SDS-PAGE et l'immuno-détection en utilisant un anticorps monoclonal (voir Figure 23), et que seulement la plus intense a été découpée, la quantité actuelle de BSA digérée et analysée par MALDI-TOF-MS est en fait inférieure à 100 fmoles. Comme l'analyse par spectrométrie de masse requiert des quantités de protéines qui sont supérieures à celles requises pour faire une immuno-détection, il faudrait améliorer les conditions afin de s'assurer de pouvoir identifier des protéines moins abondantes. Nous pensons que ceci pourrait être fait en réduisant le volume de matrice utilisée pour éluer l'échantillon à partir de la colonne C₁₈, afin de concentrer l'échantillon dans un plus petit volume, et de faire cristalliser l'échantillon sur une cible ayant une plus petite surface.

Nous avons remarqué que lorsque nous travaillons avec des quantités d'échantillon inférieures aux picomoles, il est essentiel de s'assurer de travailler dans des conditions avec le moins de kératine possible lorsqu'un environnement sans contaminations, comme ceux utilisés pour la confection des puces d'ordinateurs, ne peut être utilisé. Ceci peut être fait en filtrant toutes les solutions et en rinçant les embouts de pipette ainsi que les tubes utilisés avec des solvants organiques comme l'acétonitrile ou l'isopropanol. Cette dernière étape permet non seulement d'éliminer la kératine, mais

aussi de se débarrasser des polymères qui peuvent être obtenus en utilisant du matériel en plastique comme les tubes et les embouts.

Trois autres protéines standard ont été utilisées afin de vérifier la méthode développée. La β -galactosidase, l'ovalbumine et la transferrine ont été traitées de la même façon que la BSA. Une identification protéique a pu être faite pour tous les spectres de masse obtenus à partir du clivage tryptique sur membrane. Encore une fois, les anticorps ont été retirés afin de s'assurer qu'ils ne causaient pas d'interférence et nous avons pu constater une diminution de la séquence couverte par les masses des peptides obtenus. Ce qui confirme les résultats obtenus avec la BSA.

L'utilisation combinée du 2D-SDS-PAGE avec des anticorps dirigés contre des modifications post-traductionnelles est un outils pratique pour suivre des changements globaux dans un groupe de protéines. Nous avons appliqué, avec succès, la méthode développée lors de cette étude à des protéines phosphorylées sur les résidus tyrosine et sérine qui avaient été séparées par 2D-SDS-PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose afin d'effectuer une immuno-détection en utilisant des anticorps monoclonaux. Le tout a été effectué sur un homogénat de foie de rat ainsi que sur des extraits nucléaires de cellules EcR 293. Par contre, puisque les échantillons utilisés sont d'une très grande complexité et que la quantité d'échantillon pouvant être appliquée sur une bande de pI d'une longueur de 11 cm est limitée, il est évident que notre approche se limite aux protéines les plus abondantes dans le mélange de protéines. L'identification de protéines de faible abondance requiert des étapes d'enrichissement ou un système de

2D-SDS-PAGE qui permet la séparation d'une plus grande quantité d'échantillon (plus grand gel, bande de pI avec un écart de pH inférieur), ce dont nous n'étions pas munis lors de cette étude. De plus, la détection et l'identification de protéines demandent que l'anticorps approprié soit disponible. L'approche développée ici est très utile pour l'identification de protéines avec les modifications post-traductionnelles, bien que des détails supplémentaires sur le site de modification ne peuvent être obtenus que si les peptides contenant cette modification sont détectés par MALDI-TOF-MS, ce qui n'est pas toujours le cas puisque seulement une partie de la séquence en acides aminés est couverte avec les masses obtenues. La méthode a été développée spécifiquement pour analyser des protéines liées sur une membrane de nitrocellulose, une deuxième étude faite par une autre étudiante dans le laboratoire est en cours afin de tenter d'obtenir des résultats avec une membrane de PVDF qui a un pouvoir de liaison supérieur à celui de la NC.

Les protéines découpées à partir du 2D-SDS-PAGE des homogénats de foie de rat et des extraits cellulaires des cellules EcR 293, lorsqu'un anticorps anti-phosphotyrosine ou anti-phosphosérine était utilisé, ont générées d'excellents spectres permettant leur identification. L'utilisation du programme de prédiction de sites de phosphorylation nous a permis de confirmer que les protéines identifiées à partir des extraits nucléaires contenaient effectivement des sites de phosphorylation sur la sérine. De plus, deux recherches sur banque de données ont été faites, la première sans spécifier aucune autre modification que la carbamidométhylation (faite par l'iodoacétamide) et une deuxième en spécifiant aussi la possibilité d'avoir des peptides

phosphorylés sur la sérine. Dans les deux cas, la même protéine a pu être identifiée. Enfin, l'utilisation de la banque de donnée sur les gènes cibles de c-Myc nous a permis de déterminer que certains des gènes des protéines identifiées étaient une cible de la protéine c-Myc.

L'identification des protéines des extraits nucléaires des cellules EcR 293 par 2D-LC-MS/MS suite à une digestion tryptique en solution a permis d'obtenir une liste de protéines contenues dans le mélange. Naturellement, certaines des protéines identifiées n'ont pas une localisation cellulaire au niveau du noyau, mais ceci était prévisible puisque la méthode utilisée pour préparer les extraits n'est pas parfaite. Des «contaminations» provenant d'autres compartiments cellulaires étaient prévisibles. Bien que la liste de protéines identifiées soit impressionnante, elle est loin d'être exhaustive. Les protéines identifiées ici sont encore les protéines les plus abondantes dans le mélange. Afin de pouvoir identifier les protéines moins abondantes l'utilisation d'une liste d'exclusion permettant de sélectionner de nouveaux peptides qui n'ont pas été utilisés lors de la fragmentation est une première étape à faire. Une sélection sur colonne de cuivre (IMAC) pourrait être envisagée (REN D. *et al*, 2003 ; 2004). Le cuivre permettrait de lier seulement les peptides contenant les résidus histidine ou cystéine qui ne sont pas les acides aminés les plus retrouvés dans les protéines. De cette façon, le mélange complexe de peptides obtenus suite à une digestion en solution serait raffiné avant d'être introduit dans le système 2D-LC-MS/MS. Puisque moins de peptides seraient présents dans le mélange, des peptides qui n'avaient pas été choisis lors de la première identification parce qu'ils n'étaient pas assez intenses comparativement aux

autres pourraient être choisis. L'identification des protéines les moins abondantes est essentielle puisqu'il est fort probable que ce sont ces protéines qui sont le plus affectées par la surexpression de la protéine Max.

Nous avons tenté d'effectuer une quantification des niveaux d'expression des protéines contenues dans les extraits nucléaires de cellules EcR 293 normales comparativement à des extraits de cellules dans lesquelles la protéine Max a été surexprimée. Malheureusement, le marquage protéolytique en utilisant de l'eau contenant un isotope différent de l'atome d'oxygène (^{18}O) n'a pas été complet. L'incorporation de deux atomes d'oxygène ^{18}O ne s'est pas faite à 100% ce qui rendait la tâche difficile puisqu'il n'y avait pas une différence de 4 Da entre les peptides non marqués et marqués. Nous avons tenté de pousser la réaction en incubant plus longtemps le mélange avec la trypsine et en changeant le tampon pour du tampon frais mais en vain.

Nous pensons que la meilleure façon de pouvoir quantifier les changements de niveau d'expression serait de faire un marquage *in vivo* comme ONG S.E. *et al* (2002), SHENG G. *et al* (2003) ou EVERLEY P.A. *et al* (2004) l'ont fait. Pour ce faire, les cellules sont cultivées dans deux milieux n'ayant que pour seule différence les acides aminés. Un milieu est constitué d'acides aminés normaux (ou légers) tandis que l'autre est constitué de certains acides aminés qui sont marqués (ou lourds). Ces acides aminés peuvent être marqués en substituant des hydrogènes pour du deutérium, du carbone 12 (^{12}C) pour du carbone 13 (^{13}C), de l'azote 14 (^{14}N) pour de l'azote 15 (^{15}N) ou encore

une combinaison de toutes ces possibilités. Ces isotopes ne sont pas radioactifs donc aucune contamination radioactive n'est à craindre avec le matériel utilisé. Il suffit seulement de s'assurer que le ou les acides aminés marqués pourront donner une différence de masse suffisamment grande pour qu'il n'y ait pas superposition entre le peptide non marqué et le peptide marqué. Lors d'une telle expérience, il est aussi bon d'effectuer le marquage sur les cellules traitées et non traitées. C'est à dire que les cellules non traitées, non marquées, sont comparées avec les cellules traitées, marquées, et vice-versa. De cette façon une différence du niveau d'expression sera plus facile à identifier sur un peptide lorsque les extraits nucléaires auront été digérés en solution et analysé par 2D-LC-MS/MS.

Si le marquage *in vivo* est impossible, une autre méthode développée par la compagnie Amersham est disponible. Cette technique, DIGE, consiste à marquer avec des sondes fluorescentes (Cy2, Cy3, Cy5) les protéines d'extraits nucléaires des deux traitements différents, dans notre cas, de mélanger les deux extraits et de les faire migrer ensemble par 2D-SDS-PAGE. Une fois la migration terminée, les protéines peuvent être visualisées en utilisant deux longueurs d'ondes d'excitation différentes. Un appareil peut alors superposer les images et quantifier de façon qualitative les protéines. La superposition des images permet aussi de visualiser l'apparition et la disparition de certaines protéines.

CONCLUSION

Nous avons développé une technique permettant d'utiliser les membranes utilisées pour l'immuno-détection afin d'effectuer une identification protéique par MALDI-TOF-MS. Cette méthode a été développée avec la BSA, comme protéine standard, suivie de la β -galactosidase, l'ovalbumine et la transferrine. La combinaison de l'immunobuvardage de type Western avec la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-MS, comme nous l'avons démontré lors de cette étude, élimine le besoin d'effectuer une comparaison entre les protéines détectées sur une membrane et les protéines colorés sur un deuxième gel. De plus, puisqu'une seule séparation est nécessaire, la quantité d'échantillon et le temps requis pour l'analyse s'en trouvent réduits.

Nous avons pu appliquer cette technique à des extraits nucléaires de cellules EcR 293 à partir desquels nous avons identifier plusieurs protéines dont plusieurs sont des cibles de c-Myc. La technique comporte par contre une limitation aux protéines les plus abondantes vu la quantité de protéines qui peut être appliquée sur la bande de pI utilisée pour le 2D-SDS-PAGE. Afin de remédier à ce problème des bandes de pI avec des écarts de pH plus petits et des gels plus grands pourraient-être utilisés.

À l'aide du 2D-LC-MS/MS, nous avons pu identifier près d'une centaine de protéines contenues dans les extraits nucléaires. Ces dernières sont naturellement les plus abondantes et une étape d'enrichissement devra être effectuée afin de pouvoir

identifier les protéines les moins abondantes dans un mélange aussi complexe. L'utilisation d'une liste d'exclusion des peptides déjà utilisés pour faire la fragmentation sera aussi très profitable.

La quantification des protéines qui auraient pu être surexprimées ou sous-exprimées par la surexpression de la protéine Max n'a pas donné les résultats escomptés. L'incorporation d'un isotope différent de l'oxygène ne s'étant pas fait à 100% a rendu difficile la quantification. Ceci pourra être remédié par l'utilisation d'autres méthodes comme le marquage *in vivo* ou la méthode de DIGE.

La quantification des niveaux de protéines ainsi que la détermination des changements de niveaux de phosphorylation et l'identification protéique, en utilisant la méthode présentée ici ainsi que les autres méthodes proposées, nous permettront non seulement de mieux comprendre les phénomènes se produisant dans la cellule, mais de pouvoir poser des hypothèses sur le rôle des protéines qui auront été identifiées.

ANNEXE I

Tableau IV. Résultats comparatifs de MALDI-TOF-MS obtenus pour le BSA avec différentes conditions lors de l'immunobuvardage de type Western.

Début et fin	Séquence du peptide	Masse mono-isotopique calculée [M + H ⁺] (Da)	Peptides observés selon la technique					
			Digestion en solution	Sans encre d'Inde	Encre d'Inde	Retrait des anticorps	PVP 40	Lait en poudre
Leu ⁴⁸³ -Lys ⁴⁸⁹	LCVLHEK	898.5	•	•	•		•	
Tyr ¹⁶¹ -Arg ¹⁶⁷	YLYEIAR	927.5	•	•	•	•	•	•
Asp ³⁷ -Lys ⁴⁴	DLGEEHFK	974.5	•					
Asn ¹²³ -Lys ¹³⁰	NECFLSHK	1034.5	•					
Gln ⁴¹³ -Lys ⁴²⁰	QNCDQFEK	1068.4	•					
Ser ³¹⁰ -Lys ³¹⁸	SHCIAEVEK	1072.5	•					
Glu ⁵⁸⁸ -Lys ⁵⁹⁷	EACFAVEGPK	1107.5			•			
Cys ⁴⁹⁹ -Arg ⁵⁰⁷	CCTESLVNR	1138.5	•	•		•	•	
Lys ⁵⁴⁸ -Lys ⁵⁵⁷	KQTALVELLK	1142.7			•			
Leu ⁶⁶ -Lys ⁷⁵	LVNELTEFAK	1163.6	•	•	•	•	•	
Cys ⁴⁶⁰ -Arg ⁴⁶⁸	CCTKPESER	1166.5	•					
Asp ²⁵ -Arg ³⁴	DTHKSEIAHR	1193.6			•	•	•	
Cys ²²³ -Arg ²³²	CASIQKFGER	1195.6		•				•
Phe ³⁵ -Lys ⁴⁴	FKDLGEEHFK	1249.6	•	•	•		•	
His ³⁶¹ -Arg ³⁷¹	HPEYAVSVLLR	1283.7			•			
His ⁴⁰² -Lys ⁴¹²	HLVDEPQNLIK	1305.7	•	•	•	•	•	•
Ser ⁸⁹ -Lys ¹⁰⁰	SLHTLFGDELCK	1419.7	•	•			•	
Arg ³⁶⁰ -Arg ³⁷¹	RHPEYAVSVLLR	1439.8	•	•	•	•		
Tyr ²⁸⁶ -Lys ²⁹⁷	YICDNQDTISSK	1443.6	•	•				
Thr ⁷⁶ -Lys ⁸⁸	TCVADESHAGCEK	1463.6	•					
Leu ⁴²¹ -Arg ⁴³³	LGEYGFQNALIVR	1479.8	•	•	•	•	•	•
Glu ¹⁰⁶ -Lys ¹¹⁷	ETYGDMADCCEK	1494.5			•	•		
Glu ³⁷⁵ -Lys ³⁸⁶	EYEATLEECCA	1502.6	•	•				

Leu ²⁹⁸ -Lys ³⁰⁹	LKECCDKP LLEK	1532.8	•	•		•	•	
Asp ³⁸⁷ -Lys ³⁹⁹	DDPHACYSTVFDK	1554.7	•					
Asp ³⁴⁷ -Arg ³⁵⁹	DAFLGSFLYEYSR	1567.7		•	•	•	•	•
Leu ¹³⁹ -Lys ¹⁵¹	LKDPNTLCKEFK	1576.8	•					
Lys ⁴³⁷ -Arg ⁴⁵¹	KVPQVSTPTLVEVSR	1639.9	•	•	•	•	•	•
Gln ¹¹⁸ -Lys ¹³⁰	QEPERNECFLSHK	1673.8	•					
Tyr ¹⁸⁴ -Lys ¹⁹⁷	YNGVFQECQAEDK	1747.7	•	•			•	
Asp ³⁸⁷ -Lys ⁴⁰¹	DDPHACYSTVFDK LK	1795.8			•	•		
Arg ⁵⁰⁸ -Lys ⁵²³	RPCFSALTPDETYVPK	1880.9	•	•	•	•	•	•
Asn ¹²³ -Lys ¹³⁸	NECFLSHKDDSPDLPK	1901.9	•					
Cys ⁵⁸¹ -Lys ⁵⁹⁷	CCAADDKEACFAVEGPK	1927.8	•	•		•	•	•
Leu ¹³⁹ -Lys ¹⁵⁵	LKDPNTLCDEFKADEK	2020.0	•	•				
Glu ²⁶⁷ -Lys ²⁸⁵	ECCHGDLLECADDRADLAK	2247.9	•	•				
Met ¹ -Arg ¹⁹	MKWVTFISLLLLFSSAYS R	2262.2		•	•	•	•	
Gln ¹¹⁸ -Lys ¹³⁸	QEPERNECFLSHKDDSPDLPK	2541.2	•					
His ⁵⁵⁸ -Lys ⁵⁸⁰	HKPKATEEQLKTVMENFVAFVDK	2705.4			•		•	•
Tyr ¹⁸⁴ -Lys ²¹¹	YNGVFQECQAEDKGACLLPKIET MREK	3374.6		•				
Pourcentage de la sequence couverte (%)			51	46	35	30	35	20

ANNEXE II

Tableau V. Protéines identifiées par 2D-LC-MS/MS à partir des extraits nucléaires des cellules EcR 293.

Protéine identifiée	Masse (Da)	% de la séquence couverte
Abnormal spindle protein ASP	413192	41
Adenylate kinase	26689	83
Adenylate kinase 2	22422	79
Aldolase A; fructose-bisphosphate aldolase	39851	59
Aminoacyl-tRNA synthetase cytokine	42155	73
Beta-myosin heavy chain	134206	77
BiP protein	71002	57
5C5	19874	73
Chain A, Rotamer Strain as a determinant of protein structural specificity	8560	94
Calpastatin isoform a	76925	54
CTCL tumor antigen se''-2	88554	86
DNA binding protein	36086	65
DNA topoisomerase 1	91125	53
Dual specificity protein phosphatase 13	48033	52
Electron transfer flavoprotein, alpha polypeptide	35400	63
ErbB3 binding protein EBP1	38320	63
ER-60 protein: protein disulfide isomerase	57147	54
Eukaryotic translation elongation factor 1(guanine nucleotide exchange protein)	71820	55
Eukaryotic translation initiation factor 5A	17049	79
Ezrin (p81)(cytovillin)	69470	63

FUSE binding protein 2 (KH-type splicing regulatory protein)	73458	58
Glucocorticoid receptor AF-1 specific elongation factor	46582	48
Glucose related protein 58kDa	57146	54
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36201	68
GTP binding protein	24668	57
Heat shock 10 kDa protein	10925	100
Heat shock 60 kDa protein (chaperonin)	61187	76
Heat shock 70 kDa protein	73920	69
HMG-1: High motility group (non histone chromosomal)	26788	78
HMG-1L10	42588	67
hnRNP AB	30683	73
hnRNP C	36171	76
hnRNP D	38581	57
hnRNP H	49484	41
hnRNP K	51281	54
hnRNP M	44296	86
Interleukin enhancer binding factor 3 (Nuclear factor of activated T cells-90)	95781	40
Kinesin family member 5C; Kinesin, heavy chain	109997	55
Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	35965	69
Meiosis-specific nuclear structural protein 1	60632	87
Mitochondrial ribosomal protein L12	21593	70
Mitosis specific chromosome segregation protein	84703	50
Moesin	67892	55
M-phase phosphoprotein 4	67102	63
Myosin heavy chain alpha	45237	89
Myosin	223946	59
Nasopharyngeal epithelium specific protein 1	65803	75
Neuroblast differentiation associated protein AHNAK (Desmoyokin)	312580	40

110 kDa NFAR (nuclear factor associated) protein	95988	45
Non-metastatic cells-2 protein (NM23B)	17401	94
Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23)	36171	65
Nucleoside triphosphate chain A	17270	80
Oncogene PTI-1	43139	31
p37 AUF1	31690	83
Peptidylprolyl isomerase A (Cyclophilin A)	18229	100
Peroxiredoxin 1: natural killer enhancing factor A	22324	70
Peroxiredoxin 3: antioxidant protein 1: thioredoxin-dependent peroxide reductase	28017	52
Phosphoglycerate kinase 1	45098	76
Phosphoglycerate kinase 2	45166	65
Phospholipase C-alpha	57065	50
Prolyl 4-hydroxylase, beta subunit; v-erb-a avian erythroblastic leukemia viral oncogene	57480	61
Protein disulfide isomerase	13363	95
RAD 50 (hsRAD50)	139145	68
RAN protein	27202	52
Ras-related nuclear protein	24579	57
Ribosomal protein L7	29280	75
Ribosomal protein L7L12, mitochondrial	21593	53
Ribosomal protein L13a	23574	81
60S Ribosomal protein L19	23565	75
60S Ribosomal protein L21	14341	91
Ribosomal protein L36	12303	97
Ribosomal protein S6	28850	67
Ribosomal protein S27a	14411	80
Ribonucleoprotein	73857	63
Ribonucleoprotein La (Autoantigen La)	46979	86
RIKEN cDNA	26559	80

RNA-binding protein AUF1	31409	64
Scaffold attachment factor B	97215	49
Serine/arginine nuclear matrix protein 1	102284	41
Serin protease inhibitor Kazal-type 5 precursor	124444	43
SMCI: chromosome segregation protein	143743	71
SMC6 protein	127216	68
Splicing factor, arginine/serine rich (pre-mRNA splicing factor SRP40)	31359	64
SR rich protein	3313	63
Sumo-1	33328	60
SWI/SNF2 L1 – related matrix associated actin dependant regulator of chromatin	123211	66
TGFB-induced factor 2-like	21029	85
Thioredoxin peroxidase	30749	54
Thymopoietin	76016	60
Thyroid hormone binding protein precursor	57468	62
Transformation upregulated nuclear protein	51321	41
Translational control protein 80	83718	49
Troponin I	21496	61
TRPP	57899	64
Tyrosyl-tRNA synthetase	59448	81
Ubiquitin	16450	85
Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1	25151	78
U3 small nucleolar RNA-associated protein 11	30485	73
Uracil DNA glycosylase	35698	62

REMERCIEMENTS

Je désire remercier mes directeurs de recherche Dr Klaus Klarskov et Dr Pierre Lavigne, le Département de Pharmacologie ainsi que mes organismes de soutien : l'Université de Sherbrooke, CRSNG, le NSERC, les Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) et le CIHR, sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé.

Je remercie aussi toutes les personnes qui m'ont accompagnée au quotidien durant ces années de travail, spécialement mes parents Claude & Monique.

Et finalement, je remercie les correcteurs de cet ouvrage : Dr Klaus Klarskov, Dr Pierre Lavigne, Dr Michel Grandbois et Dr Nathalie Rivard.

LISTE DES RÉFÉRENCES

AMATI B., LAND H. (1994) Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, différenciation and death, *Current Opinion in Genetics & Development*, **4**, 102-108

BLACKWOOD E.M., EISENMAN R.N. (1991) Max: A helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc, *Science*, **251**, 1211-1217

BLACKWOOD E.M., EISENMAN R.N. (1992) Regulation of Myc: Max complex formation and its potential role in cell proliferation, *Tohoku J. Exptl. Med.*, **168**, 195-202

BOUCHARD C., STALLER P., EILERS M. (1998) Control of cell proliferation by Myc, *Trends in Cell Biology*, **8**, 202-206

BERGGREN K., STEINBERG T.H., LAUBER W.M., CARROLL J.A., LOPEZ M.F., CHERNOKALSKAYA E., ZIESKE L., DIWU Z., HAUGLAND R.P., PATTON W.F. (1999) A luminescent ruthenium complex for ultrasensitive detection of proteins immobilized on membrane supports, *Analytical Biochemistry*, **276(2)**, 129-143

CONZEN S.D., GOTTLOB K., KANDEL E.S., KHANDURI P., WAGNER A.J., O'LEARY M., HAY N. (2000) Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of c-Myc: transrepression correlates with acceleration of apoptosis, *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 6008-6018

CHANG D.W., CLAASSEN G.F., HANN S.R., COLE M.D. (2000b) The c-Myc transactivation domain is a direct modulator of apoptotic versus proliferative signals, *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 4309-4319

DANG C.V. (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism, *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 1-11

DIGNAM J.D., LEBOVITZ R.M., ROEDER R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei, *Nucleic Acids Research*, **11**, 1475-1489

EVERLEY P.A., KRIJGSVELD J., ZETTER B.R., GYGI S.P. (2004) Quantitative cancer proteomics: stable isotope labelling with amino acids in cell culture (SILAC) as a tool for prostate cancer research, *Molecular and Cellular Proteomics*, **3**(7), 729-735

FACCHINI L.M., PENN L.Z. (1998) The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights, *FASEB Journal*, **12**, 633-651

FOYE W.O. (1995) *Cancer Chemotherapeutic Agents* : American Chemical Society : Washington, DC, 529-576

GRANDORI C., COWLEY S.M., JAMES L.P., EISENMAN R.N. (2000) The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **16**, 653-699

GU S., PAN S., BRADBURY E.M., CHEN X. (2003) Precise peptide sequencing and protein quantification in the human proteome through in vivo lysine-specific mass tagging, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **14**(1), 1-7

HARTWELL L., WEINERT T.A. (1989) Checkpoints : Controls that ensure the order of cell cycle events, *Science*, **246** : 629-634

HENRIKSSON M., LUSCHER B. (1996) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation, *Advances in Cancer Research*, **68**, 109-182

HILLENKAMP F., KARAS M. (1990) Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization, *Methods in Enzymology*, **193**, 280-295

HUNTER T., PINES J. (1994) Cyclins and cancer II : cyclin D and CDK inhibitors come of age, *Cell*, **79** : 573-582

IZUMI T., TSURUSAKI Y., YAMAGUCHI M. (2003) Suppressive effect of endogenous regucalcin on nitric oxide synthase activity in cloned rat hepatoma H4-II-E cells overexpressing regucalcin, *Journal of Cellular Biochemistry*, **89**, 800-807

IZUMI T., YAMAGUCHI M. (2004) Overexpression of regucalcin suppresses cell death in cloned rat hepatoma H4-II-E cells induced by tumor necrosis factor- α or thapsigargin, *Journal of Cellular Biochemistry*, **92**, 296-306

KLARSKOV K., NAYLOR S. (2002) India ink staining after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and in conjunction with western blots for peptide mapping by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **16(1)**, 35-42

KOSKINEN P.J., VASTRIK I., MAKELA T.P., EISENMAN R.N., ALITALO K. (1994) Max activity is affected by phosphorylation at two NH₂-terminal sites, *Cell Growth & Différenciation*, **5**, 313-320

LODISH, BALTIMORE, BERK, ZIPURSKY, MATSUDAIRA, DARNELL, *Biologie moléculaire de la cellule*, DeBoeck Université, États-Unis (1995) pp.1249-1268

LUSCHER B. (2001) Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network, *Gene*, **277**, 1-14

NAUD J-F., GAGNON F., WELLINGER R., CHABOT B., LAVIGNE P. (2003) Improving the Thermodynamic Stability of the Leucine Zipper of Max Increases the Stability of its b-HLH-LZ : E-box complex, *Journal of Molecular Biology*, **326**, 1577-1595

NESBIT C.E., TERSAK J.M., GROVE I.E., DRZAL A., CHOI H., PROCHOWNIK E.V. (2000) Genetic dissection of c-Myc apoptotic pathways, *Oncogene*, **19**, 3200-3212

NILSSON J.A., CLEVELAND J.L. (2003) Myc pathways provoking cell suicide and cancer, *Oncogene*, **22(56)**, 9007-9021

O'FARRELL P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *Journal of Biological Chemistry*, **250**, 4007-4021

ONG S.E., BLAGOEV B., KRATCHMAROVA I., KRISTENSEN D.B., STEEN H., PANDEY A., MANN M. (2002) Stable isotope labelling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics, *Molecular and Cellular Proteomics*, **1(5)**, 376-386

OSTER S.K., HO C.S.W., SOUCIE E.L., PENN L.Z. (2002) The myc oncogene: marvellously complex, *Advances in Cancer Research*, **84**, 81-154

REN D., PENNER N.A., SLENT B.E., MIRZAEI H., REGNIER F. (2003) Evaluating immobilized metal affinity chromatography for the selection of histidine-containing peptides in comparative proteomics, *Journal of Proteome Research*, **2**, 321-329

REN D., PENNER N.A., SLENTZ B.E., REGNIER F.E. (2004) Histidine-rich peptide selection and quantification in targeted proteomics, *Journal of Proteome Research*, **3**, 37-45

REED S.I. (1997) Control of the G1/S transition, *Cancer Surveys*, **29**, 7-23

ROEPSTORFF P., FOLHMAN J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, *Biomed. Mass Spectrom.*, **11(11)**, 601

SHEEN J-H., DICKSON R.B (2002) Overexpression of c-Myc alters G1/S arrest following ionizing radiation, *Molecular and cellular biology*, **22(6)**, 1819-1833

SHEEN J-H., WOO J.K., DICKSON R.B (2003) c-Myc alters the DNA damage-induced G2/M arrest in human mammary epithelial cells, *British Journal of Cancer*, **89(8)**, 1479-1485

SHIMOKAWA N., YAMAGUCHI M. (1992) Calcium administration stimulates the expression of calcium-binding protein regucalcin mRNA in rat liver, *FEBS Letters*, **305**, 151-154

SNUSTAD D.P. et SIMMONS M.J., Principles of Genetics, Second Edition, Wiley J & Sonc Inc, État-Unis (2000), p.28

TABB D.L., HUANG Y., WYSOCKI V.H., YATES III J.R. (2004) Influence of basic residue content on fragment ion peak intensities in low-energy collision-induced dissociation spectra of peptides, *Analytical Chemistry*, **76**, 1243-1248

TSURUSAKI Y., YAMAGUCHI M. (2002a) Suppressive role of endogenous regucalcin in the enhancement of deoxyribonucleic acid synthesis activity in the nucleus of regeneration rat liver, *Journal of Cellular Biochemistry*, **85**, 516-522

TSURUSAKI Y., YAMAGUCHI M. (2002b) Role of endogenous regucalcin in nuclear regulation of regenerating rat liver: Suppression of the enhanced ribonucleic acid synthesis activity, *Journal of Cellular Biochemistry*, **87**, 450-457

VAN OOSTVEEN I., DUCRET A., AEBERSOLD R. (1997) Colloidal silver staining of electroblotted proteins for high sensitivity peptide mapping by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, **247(2)**, 310-318

VERMEULEN K., VAN BOCKSTAELE D.R., BERNEMAN Z.N. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell Proliferation*, **36(3)**, 131-149

YAMAGUCHI M., ISOGAI M. (1993) Tissue concentration of calcium-binding protein regucalcin in rats by enzyme-linked immunoadsorbent assay, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **122**, 65-88

YAMAGUCHI M. (2000a) Role of regucalcin in calcim signalling, *Life Science*, **66**, 1769-1780

YAMAGUCHI M. (2000b) The role of regucalcin in nuclear regulation of regenerating liver, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **276**, 1-6

YAO X., FREAS A., RAMIREZ J., DEMIREV P.A., FENSELEAU C. (2001) Proteolytic ¹⁸O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus, *Analytical Chemistry*, **73**, 2836-2842