

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ANALYSE PROTÉOMIQUE DU PLASMA HUMAIN

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
MARGUERITE BUCHANAN

Février 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier en premier lieu mon directeur de recherche, Dr Richard Béliveau, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour sa motivation et son humanisme et pour m'avoir appuyée financièrement. J'aimerais remercier également Dr Édith Beaulieu et Dr Richard Desrosiers pour leur gentillesse et leurs nombreux conseils techniques et scientifiques. Je remercie également Dr Sylvie Lamy, Dr Dominique Boivin et Dr Denis Gingras pour leurs encouragements. Je remercie Julie Poirier et Constance Gagnon et toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler au laboratoire de l'UQÀM. Je voudrais remercier tous mes amis du laboratoire de Sainte-Justine, Mathieu, Valérie, Marisol, Geneviève, Xavier, Élodie, Claire, Karina, Jessica et Carine pour les bons moments que nous avons passés ensemble. Je remercie mon mari Jean-Luc Arseneau pour ses encouragements. Je dédie cette étude à la mémoire de mon neveu Sébastien Blackburn.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
RÉSUMÉ.....	ix
CHAPITRE I. INTRODUCTION.....	1
1.1 LE PLASMA.....	1
1.2 LE PROTÉOME.....	3
1.3 LE CANCER DU SEIN ET DES OVAIRES.....	4
1.4 BIOMARQUEURS TUMORAUX.....	5
1.5 LE FRACTIONNEMENT DU PLASMA.....	6
1.6 MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES PROTÉINES.....	7
1.7 PLATES-FORMES PROTÉOMIQUES POUR LA SÉPARATION ET L'IDENTIFICATION DES PROTÉINES.....	9
1.8 PLATES-FORMES TECHNOLOGIQUES POUR L'ANALYSE DES PROTÉINES OXYDÉES...	10
1.9 VOLET NUTRACEUTIQUE DES PROTÉINES OXYDÉES.....	11
1.10 BUT DU PROJET.....	12
CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	16
2.1 MATÉRIEL.....	16
2.2 MÉTHODES.....	18
2.2.1 Préparation du plasma.....	18
2.2.2 Fractionnement du plasma par chromatographie d'affinité.....	19
2.2.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS/PAGE.....	21
2.2.4 Électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide IEF/SDS.....	21
2.2.5 Coloration au Bleu brillant Coomassie G-250 des gels d'électrophorèse...	23
2.2.6 Coloration au nitrate d'argent des gels d'électrophorèse.....	23
2.2.7 Coloration Deep Purple des gels d'électrophorèse.....	24
2.2.8 Coloration Sypro Ruby des gels d'électrophorèse.....	24
2.2.9 Immunobuvardage de type Western.....	24

2.2.10	Modification des protéines oxydées avec le DNPH avant analyse par électrophorèse SDS/PAGE.....	25
2.2.11	Détection des protéines oxydées sur membrane de PVDF après transfert du gel d'électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS.....	25
2.2.12	Immunobuvardage de type Western des protéines oxydées.....	26
2.2.13	Préparation des extraits de légumes et de fruits.....	26
2.2.14	Protocole nutraceutique de phase aiguë.....	27
CHAPITRE III. RÉSULTATS.....		28
3.1	GEL 2-D DES PROTÉINES TOTALES DU PLASMA.....	28
3.2	MISE AU POINT DES GELS 2-D GRAND FORMAT APRÈS DÉPLÉTION DU PLASMA HUMAIN PAR LA COLONNE D'AFFINITÉ THE AGILENT MULTIPLE AFFINITY REMOVAL SYSTEM POUR ENLEVER LES SELS ET AUTRES SUBSTANCES INTERFÉRENTES DANS LES ÉCHANTILLONS.....	28
3.3	MISE AU POINT DES GELS 2-D GRAND FORMAT PAR L'AJOUT DE PAPIERS BUVARDS SUR LES ÉLECTRODES LORS DE LA FOCALISATION ISOÉLECTRIQUE APRÈS DÉPLÉTION DU PLASMA HUMAIN PAR LA COLONNE D'AFFINITÉ THE AGILENT MULTIPLE AFFINITY REMOVAL SYSTEM.....	29
3.4	ANALYSE COMPARATIVE DE DIVERSES PROCÉDURES D'AFFINITÉ POUR ENLEVER LES PROTÉINES LES PLUS ABONDANTES DU PLASMA.....	29
3.5	ANALYSE SUR GEL 2-D DU PLASMA HUMAIN DÉPLÉTÉ EN PROTÉINES ABONDANTES.....	30
3.6	COMPARAISON DE LA DISTRIBUTION SUR GELS 2-D DES PROTÉINES DU PLASMA HUMAIN OBTENUE AVEC DEUX MÉTHODES D'ANTICOAGULANTS.....	31
3.7	LE RÉACTIF HYDROXYÉTHYL DISULFIDE (DeSTREAK™) AMÉLIORE LA RÉOLUTION DES PROTÉINES DURANT L'ÉLECTROPHORÈSE DES GELS 2-D DU PLASMA HUMAIN DÉPLÉTÉ DES PROTÉINES ABONDANTES.....	32
3.8	COMPARAISON DE DIFFÉRENTES MÉTHODES DE COLORATION DES GELS 2-D DU PLASMA HUMAIN DÉPLÉTÉ DES PROTÉINES ABONDANTES.....	33
3.9	ANALYSE SUR GEL 2-D DE L'OXYDATION DES PROTÉINES ABONDANTES, ET PEU ABONDANTES FRACTIONNÉES PAR LA COLONNE D'AFFINITÉ IG _Y -12 ET DU PLASMA BRUT.....	34
3.10	ANALYSE SUR GEL 2-D DE L'OXYDATION DES PROTÉINES PEU ABONDANTES DU PLASMA DE DEUX INDIVIDUS FRACTIONNÉ PAR LA COLONNE D'AFFINITÉ IG _Y -12.....	34

3.11	EFFET DE LA PRISE D'ALIMENTS ANTICANCÉREUX SUR LE NIVEAU D'OXYDATION DES PROTÉINES PEU ABONDANTES DU PLASMA FRACTIONNÉ PAR LA COLONNE D'AFFINITÉ IGY-12 ET ANALYSÉ SUR GELS 2-D DANS UN ÉCART DE PH DE 4 À 7.....	35
3.12	EFFET DE LA PRISE D'ALIMENTS ANTICANCÉREUX SUR LE NIVEAU D'OXYDATION DES PROTÉINES ABONDANTES DU PLASMA FRACTIONNÉ PAR LA COLONNE D'AFFINITÉ IGY-12 ET ANALYSÉ SUR GELS 2-D DANS UN ÉCART DE PH DE 4 À 7.....	36
	CHAPITRE IV. DISCUSSION.....	53
4.1	PLASMA HUMAIN EN TANT QUE MATÉRIEL DE RECHERCHE.....	53
4.2	FRACTIONNEMENT DU PLASMA HUMAIN, ÉTAPE PRÉALABLE À L'ÉTUDE DES PROTÉINES DU PLASMA.....	54
4.3	ISOLEMENT DU PLASMA À PARTIR DU SANG PRÉLEVÉ DANS DES TUBES CONTENANT LES ANTICOAGULANTS CTAD OU EDTA.....	56
4.4	PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS DE PROTÉINES PEU ABONDANTES ET ABONDANTES DU PLASMA ET MISE AU POINT DES GELS D'ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE (IEF/SDS) POUR LA PLATE-FORME PROTÉOMIQUE GELS 2-D.....	56
4.5	AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DE L'ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE IEF/SDS.....	60
4.6	AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE COLORATION.....	62
4.7	ANALYSE DE L'OXYDATION DES PROTÉINES DU PLASMA EN TANT QUE MODIFICATION POST-TRADUCTIONNELLE.....	64
4.8	PRÉVENTION DU CANCER PAR L'ÉLABORATION D'UN PROTOCOLE NUTRACEUTIQUE LIÉ À LA PRISE D'ALIMENTS ANTICANCÉREUX ET ANALYSE SUBSÉQUENTE DU NIVEAU D'OXYDATION DES PROTÉINES PEU ABONDANTES DU PLASMA.....	67
4.9	PERSPECTIVES.....	69
	CHAPITRE V. CONCLUSION.....	72
	BIBLIOGRAPHIE.....	74

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Proportion relative des protéines plasmatiques.....	2
Figure 3.1.	Gel 2-D des protéines totales du plasma.....	38
Figure 3.2.	Mise au point des gels 2-D grand format après déplétion du plasma humain par la colonne d'affinité The Agilent Multiple Affinity Removal System suivie par l'enlèvement des sels et autres substances interférentes dans les échantillons.....	39
Figure 3.3.	Mise au point des gels 2-D grand format par l'ajout de papiers buvards sur les électrodes lors de la focalisation isoélectrique après déplétion du plasma humain par la colonne d'affinité The Agilent Multiple Affinity Removal System.....	40
Figure 3.4.	Analyse comparative par SDS-PAGE de différentes méthodes pour enlever les protéines abondantes du plasma.....	41
Figure 3.5.	Analyse de la séparation des protéines du plasma par gels 2-D avec un large écart de pI.....	42
Figure 3.6.	Analyse de la séparation des protéines du plasma humain par gels 2-D avec un écart intermédiaire de pI.....	43
Figure 3.7.	Gels d'électrophorèse 2-D des protéines du plasma humain suite à la déplétion des protéines abondantes du plasma par diverses colonnes d'affinité.....	44
Figure 3.8.	Comparaison de la distribution sur gels 2-D des protéines du plasma humain préparées selon deux méthodes d'anticoagulants.....	45
Figure 3.9.	Effet du réactif DeStreak™ sur la résolution des protéines durant l'électrophorèse 2-D du plasma humain déplété des protéines abondantes.....	46

Figure 3.10.	Comparaison de différentes méthodes de coloration des gels 2-D pour révéler la distribution des protéines du plasma humain déplété des protéines abondantes.....	47
Figure 3.11.	Analyse sur gels 2-D de l'oxydation des protéines abondantes, et peu abondantes fractionnées par la colonne d'affinité IgY-12 et du plasma brut	48
Figure 3.12.	Analyse sur gels 2-D de l'oxydation des protéines peu abondantes du plasma de deux individus dans un écart de pH de 3 à 10.....	49
Figure 3.13.	Analyse sur gels 2-D de l'oxydation des protéines peu abondantes du plasma de deux individus dans un écart de pH de 4 à 7.....	50
Figure 3.14.	Effet de la prise d'aliments anticancéreux sur le niveau d'oxydation des protéines peu abondantes du plasma analysées sur gels 2-D dans un écart de pH de 4 à 7.....	51
Figure 3.15.	Effet de la prise d'aliments anticancéreux sur le niveau d'oxydation des protéines abondantes du plasma analysées sur gels 2-D dans un écart de pH de 4 à 7.....	52

LISTE DES ABRÉVIATIONS

APS	persulfate d'ammonium
BSA	albumine sérique de bœuf
CBB	bleu brillant Coomassie
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CTAD	citrate de sodium, théophylline, adénosine, dipyridole
DIGE	<i>differential gel electrophoresis</i>
DNPH	2,4-dinitrophénylhydrazine
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylènediamine tétraacétique
ESI	ionisation électrospray
HUPO	Human Proteome Organization
IEF	focalisation isoélectrique
IPG	<i>immobilized pH gradients</i>
MALDI-TOF	désorption/ionisation laser assistée par matrice – temps de vol
MS	spectrométrie de masse
MS/MS	spectrométrie de masse en tandem
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NO	oxyde nitrique
PAGE	gel d'électrophorèse de polyacrylamide
PBS	tampon sodium phosphate
pI	point isoélectrique
PVDF	difluorure de polyvinylidène
RNS	espèces réactives du nitrogène
ROS	espèces réactives de l'oxygène
SB3-10	N-décyl-N,-N-diméthyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SELDI-TOF	<i>surface enhanced laser desorption ionization – time of flight</i>
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthylènediamine
TRIS	Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane

RÉSUMÉ

Le sang est un milieu dynamique et complexe qui véhicule une grande quantité d'informations biochimiques et moléculaires. D'où, le but de notre projet qui est de trouver la méthode la plus efficace pour fractionner le plasma en protéines peu abondantes et en protéines abondantes et de mettre au point des gels 2-D afin de faciliter la découverte de biomarqueurs pour la détection précoce du cancer du sein ou de l'ovaire. La raison pour laquelle nous portons une attention particulière au fractionnement du plasma est que celui-ci est composé d'une grande quantité de protéines abondantes et celles-ci peuvent interférer dans notre recherche de biomarqueurs. L'hypothèse avancée est que les marqueurs tumoraux seraient présents en faible concentration dans le plasma parmi la fraction des protéines peu abondantes, qui constitue moins de 10% des protéines du plasma sanguin. Il s'agit donc de trouver la méthode de fractionnement du plasma la plus efficace pour la déplétion des protéines majeures. Trois colonnes d'affinité ont été comparées et validées par SDS/PAGE et IEF/SDS. Il s'agit des colonnes ProteoExtract™ Albumin/IgG Removal Kit, Agilent Multiple Affinity Removal System et ProteomeLab™ IgY-12 Spin Column Proteome Partitioning Kit. L'analyse des résultats confirme la capacité supérieure de déplétion et l'enrichissement accru des protéines peu abondantes du plasma par la colonne d'affinité ProteomeLab™ IgY-12 qui permet d'enlever douze protéines majeures. Deux méthodes de préparation du plasma avec les anticoagulants EDTA et CTAD ont été expérimentées. L'anticoagulant CTAD a été choisi en raison de ses capacités à stabiliser les plaquettes sanguines. Après une série de mises au point de techniques pour améliorer la reproductibilité et la résolution des gels 2-D, soit en ajoutant le réactif DeStreak™ dans les échantillons pour éviter les stries sur les gels 2-D et en plaçant des papiers buvards sur les électrodes pendant la focalisation isoélectrique pour éliminer les sels, quatre méthodes de coloration des protéines peu abondantes du plasma ont été comparées : le Bleu brillant Coomassie (G-250), le Deep Purple, le Sypro Ruby et le nitrate d'argent. La coloration la plus sensible était le nitrate d'argent tandis que le Deep Purple était préférable pour la quantification. Les protéines ont ensuite été étudiées selon l'une des modifications post-traductionnelles importantes, l'oxydation. En effet, la présence de tumeurs cancéreuses pourrait entraîner des variations dans les niveaux d'oxydation des protéines du plasma. La prévention contre le cancer a également été abordée sous l'angle de la répercussion de la consommation d'aliments anticancéreux sur le niveau d'oxydation des protéines plasmatiques.

En conclusion, notre étude est parvenue à rendre la plate-forme protéomique des gels 2-D IEF/SDS attrayante, reproductible et sensible pour la découverte éventuelle de biomarqueurs du cancer du sein et de l'ovaire. Notre projet a également démontré que l'étude des modifications post-traductionnelles comme l'oxydation peut s'avérer une grande source d'informations pour l'identification de biomarqueurs et que la consommation d'aliments anticancéreux semble influencer l'oxydation des protéines.

Mots clés : Protéome du plasma, fractionnement, enrichissement des protéines peu abondantes du plasma, gels 2-D, oxydation, modification post-traductionnelle, nutraceutique.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le plasma

Le plasma est la portion soluble du sang non-coagulé et il est constitué d'eau, d'urée, d'acides organiques, d'une grande variété de protéines correspondant à une concentration totale de 60 à 80 g/L. Les protéines qui composent le plasma sont entre autres l'albumine, les immunoglobulines, la transferrine, l'antitrypsine etc. ainsi que les protéines qui entrent dans le processus de la coagulation sanguine telles que le fibrinogène, dont la transformation en fibrine entraîne la coagulation (figure 1.1). Les protéines du plasma sanguin sont en majorité des glycoprotéines, à l'exception de l'albumine, de la pré-albumine et de quelques protéines peu abondantes. Le plasma humain est également composé de lipoprotéines dont la partie lipidique inclut des lipides neutres, des phospholipides, du cholestérol et leurs esters ainsi que des acides gras (Pelmont, 1996). En plus de ces éléments, environ 10 000 protéines seraient présentes dans le plasma, la plupart d'entre elles étant en faible abondance. L'analyse des protéines ou des peptides de faible abondance, représentant moins de 10% du total des protéines dans le plasma, de l'ordre du ng/mL, constitue un défi majeur (He et coll., 2005). Cette difficulté est causée principalement par la présence des protéines abondantes qui masquent les protéines peu abondantes du plasma. Les protéines ou les peptides de faible abondance peuvent résulter soit d'une fuite provenant des tissus, de la sécrétion normale d'une cellule suite à l'apoptose cellulaire ou à un dommage cellulaire ou de la sécrétion de protéines aberrantes issues d'une tumeur cancéreuse. Ces protéines peu abondantes et ces peptides représentent un bassin potentiel de biomarqueurs pour les diagnostics de différentes maladies (Thadikkaran et coll., 2005).

Le retrait de l'albumine et des autres protéines abondantes du plasma est essentiel pour l'enrichissement des protéines et peptides de faible abondance, leur détection et leur identification par diverses technologies de pointe. Il faut préciser par ailleurs que l'albumine est connue pour son rôle physiologique de transporteur d'acides gras, de lipoprotéines,

d'hormones, d'ions, de bilirubine, de cytokines, de peptides ainsi que de médicaments. L'albumine, en tant que transporteur de diverses molécules et substances, pourrait générer des informations pertinentes et la récupération des protéines abondantes lors du fractionnement du plasma ne doit pas être négligée. La récupération des protéines majeures doit être perçue dans l'optique de l'analyse des protéines et des peptides de faible abondance et des substances variées transportés par l'albumine et peut-être par d'autres protéines majeures dont le rôle dans le plasma pourrait être similaire à l'albumine (Veenstra et coll., 2005).

Le fractionnement du plasma en protéines peu abondantes et en protéines abondantes du plasma est une étape cruciale de la recherche de marqueurs tumoraux.

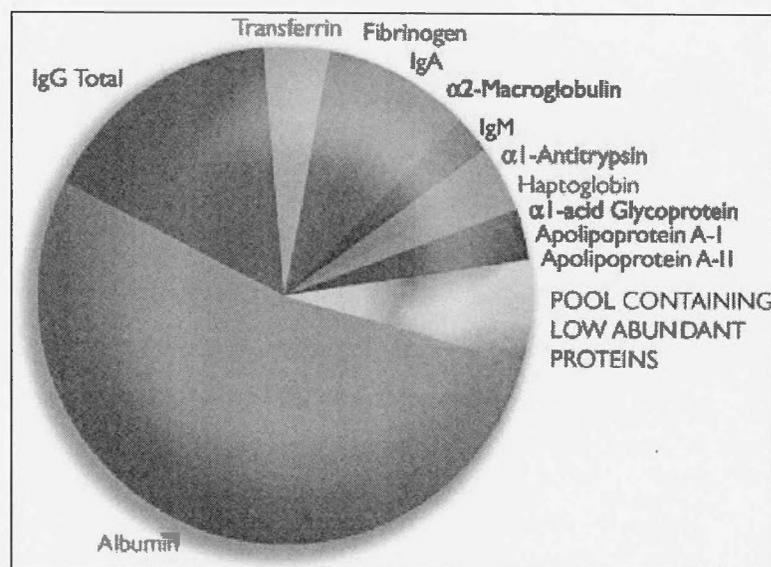


Figure 1.1. Proportion relative des protéines plasmatiques (tirée du site internet de Beckman Coulter, Inc.)

1.2 Le protéome

Le terme «protéome» est issu de la fusion des mots « protéine » et « génome » et a été prononcé pour la première fois en 1994 par Marc Wilkins lors de la 4^{ième} rencontre à Sienne portant sur les gels d'électrophorèse bidimensionnels (2-D) (Wilkins et coll., 1996). Le terme «protéome» décrit l'ensemble des protéines exprimées par le génome, que ce soit d'une cellule, d'un tissu, d'un fluide organique (plasma, liquide céphalorachidien, urine), d'un organe ou d'un organisme. Le protéome du plasma humain est présentement étudié par plusieurs groupes de recherche. Après la caractérisation du génome humain et la découverte de l'origine de nombreuses maladies liées à des gènes ou à des groupes de gènes défectueux, il a été régulièrement mentionné que c'est au niveau des protéines, de leurs structures et de leurs interactions avec d'autres protéines ou avec l'ADN, de leurs modifications post-traductionnelles et de leur expression qu'apparaît le phénotype de la maladie. Le plasma humain est facilement accessible et disponible pour l'analyse et est une source inépuisable d'informations puisque la plupart des cellules humaines sont en contact direct avec le sang et communiquent entre elles par l'intermédiaire de sécrétions endocrines et en diffusant des peptides et des protéines dans la circulation sanguine (Wetmore et coll., 2004). Différentes pathologies provoquent l'inflammation, la nécrose de tissus ainsi que l'apoptose cellulaire et déclenchent la sécrétion de nombreuses protéines, peptides et hormones.

Le terme « protéomique » découle du mot « protéome », et désigne la nouvelle discipline dérivant de la génomique qui regroupe les activités de recherche destinées à rassembler l'information complète sur l'expression des protéines des organismes dont le génome a été identifié (Le grand dictionnaire terminologique de l'Office québécois de la langue française). La protéomique, par l'ensemble des technologies de pointe servant à l'analyse, la détection, la séparation, l'identification et à la quantification des protéines et de leurs isoformes, étudie la structure des protéines, leurs propriétés et caractéristiques, les interactions entre elles, les modifications post-traductionnelles etc.

L'organisme «HUPO», dont le terme est une abréviation de l'expression « Human Proteome Organisation », dont le siège social est à Montréal, a pour mission de définir et de promouvoir la protéomique par la coopération internationale et par diverses collaborations en soutenant le développement de nouvelles technologies et techniques et par la formation afin de mieux comprendre les maladies humaines (site internet de HUPO). HUPO chapeaute présentement sept projets scientifiques soit le protéome du foie humain (HLPP qui signifie « Human Liver Proteome Project »), le protéome du plasma humain (PPP qui signifie « Plasma Proteome Project ») et le protéome du cerveau humain (HBPP qui signifie « Human Brain Proteome Project »). Les autres projets sous la gouverne de HUPO ont trait à la standardisation des échantillons, des appareils, des résultats et de la présentation des données lors de congrès (PSI qui signifie « Proteomic Standards Initiative »), à promouvoir et faciliter l'utilisation des anticorps en recherche protéomique (HAI qui signifie « Human Antibody Initiative »), à établir des modèles fiables de maladies humaines chez la souris (MMHD qui signifie « Mouse Models of Human Disease »), et à étudier les protéines glycosylées responsables de maladies humaines (HGPI qui signifie « Human Disease Glycomics/Proteome Initiative »). Les principaux bénéficiaires de ces recherches scientifiques en protéomique sont la médecine clinique et la biologie moléculaire.

1.3 Le cancer du sein et des ovaires

Selon la Société canadienne du cancer et l'Institut national du cancer du Canada, les statistiques canadiennes sur le cancer prévoient que 153 100 nouveaux cas de cancer seront diagnostiqués en 2006 dont 78 400 cas chez les hommes et 74 700 cas chez les femmes. Il est estimé que 70 400 personnes décéderont du cancer dont 37 000 chez les hommes et 33 400 chez les femmes. De ce nombre total de nouveaux cas, 22 300 nouveaux cas de cancer du sein seront diagnostiqués dont 160 chez les hommes et 22 200 chez les femmes. Les décès sont évalués à 5 300 personnes dont 45 chez les hommes et 5 255 chez les femmes. En ce qui a trait au cancer des ovaires, 2 300 nouveaux cas seront diagnostiqués en 2006. De ce nombre de nouveaux cas, les décès sont évalués à 1 600 cas. Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes au Canada et il se situe au second rang du taux de mortalité après le cancer du poumon. Il est à noter que les statistiques tant canadiennes

qu'américaines indiquent une incidence à la hausse du nombre de cas de cancer du sein (Statistiques canadiennes sur le cancer, 2006). Ces statistiques éloquentes sont un argument décisif dans la nécessité de découvrir des marqueurs tumoraux précoces.

1.4 Biomarqueurs tumoraux

L'étude des biomarqueurs du cancer a débuté en 1847 par la découverte de Henry Bence Jones de protéines dans l'urine d'un patient atteint de myélome multiple. Ces protéines ont été identifiées cent ans plus tard comme étant la chaîne légère d'un anticorps produite par la tumeur. Il a été démontré cent quarante ans plus tard que cette protéine est détectable dans le sérum et un test diagnostique a été produit et approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) en 1998. Des hormones produites par les tumeurs ont aussi été détectées très tôt soit l'ACTH (hormone adrénocorticotrope), la calcitonine, et la hCG (la gonadotropine chorionique). Cependant, moins de dix protéines ont bénéficié de l'approbation de la FDA en tant que test diagnostique (Polanski et coll., 2006).

Un biomarqueur tumoral ou une signature protéique (profil protéique) est une protéine ou un peptide natif ou modifié ou un groupe de protéines ou de peptides provenant de la région de la tumeur ou de la tumeur elle-même, qui font suite au dérèglement cellulaire et qui sont des produits métaboliques, des protéines de phase aiguë, des enzymes, des produits de réaction associés aux tumeurs, des hormones et des antigènes associés aux tumeurs. Lorsqu'une cellule normale se transforme en cellule néoplasique, certaines protéines subissent des modifications : soit leur expression est augmentée ou diminuée, leur activité spécifique est détournée vers d'autres fins ou complètement altérée ou inhibée, leur localisation varie ou change complètement, tout cela entraînant un fonctionnement aberrant de la cellule (Srivastava et coll., 2005). La présence de ces biomarqueurs, l'élévation soudaine de leur concentration, ou leur absence dans le plasma, l'urine ou tout autre fluide biologique, est une indication de la formation d'une tumeur, de l'évolution de la maladie ou du suivi du traitement. Dans le cas du cancer du sein et de celui des ovaires, certains biomarqueurs sont déjà connus et utilisés en clinique. CA 15-3 et CA 125 sont des antigènes

extraits de tumeurs et caractérisés par des anticorps polyclonaux ou monoclonaux. CA 15-3 est un biomarqueur de l'adénocarcinome du sein. CA 15-3 a été approuvé par la FDA en février 1981 (Polanski et coll., 2006). CA 125 est un biomarqueur du cancer de l'ovaire, de l'endomètre ou des trompes. CA 125 a été approuvé par la FDA en juillet 1987 (Polanski et coll., 2006). CA 125 peut être augmenté lors de pathologies entraînant une irritation péritonéale (endométriose, fibrome sous-séreux, kyste bénin de l'ovaire). Cependant, ces biomarqueurs sont peu spécifiques et ne sont pas toujours l'indication de la présence d'un cancer mais peuvent indiquer un autre dysfonctionnement physiologique. Ces biomarqueurs sont également peu sensibles et peu fiables pour la détection précoce d'un cancer. Un biomarqueur ou une signature protéique (un profil protéique) doit être mesurable, quantifiable et reproductible. Les caractéristiques idéales d'un biomarqueur tumoral sont d'être 100% spécifique à un organe, 100% précis relativement à la différenciation entre des individus sains et ceux atteints d'une tumeur maligne spécifique. Ils doivent être capables de détecter tous les patients porteurs d'un cancer particulier à un stade très précoce dans le processus de l'évolution de la maladie. Les biomarqueurs doivent avoir une excellente corrélation entre la concentration du marqueur et les stades de la tumeur incluant rechute et rémission et la concentration du biomarqueur tumoral doit avoir valeur de pronostic (Randox® solutions diagnostic clinique).

1.5 Le fractionnement du plasma

La recherche de biomarqueurs tumoraux dans le plasma humain doit nécessairement être précédée du fractionnement du plasma puisque plusieurs protéines abondantes telles que l'albumine, dont la concentration sérique est de 42 g/L (55% des protéines totales) et les globulines, dont la concentration sérique est de 25 g/L (35% des protéines totales) (Béraud, 2001), empêchent la détection et l'identification de ces biomarqueurs potentiels vraisemblablement présents en faible concentration. La fraction des protéines peu abondantes du plasma correspond à moins de 10% du total des protéines. L'une des méthodes les plus utilisées pour fractionner le plasma en protéines peu abondantes et en protéines abondantes est la chromatographie d'affinité. Le principe de la chromatographie d'affinité est de retenir à

la colonne, au moyen d'anticorps ou d'un ligand spécifique fixé à une matrice inerte et poreuse, les protéines majeures du plasma. Après une succession de lavages pour concentrer les protéines d'intérêt, soit les protéines peu abondantes, les protéines majeures retenues par un ligand spécifique fixé à la colonne sont décrochées au moyen d'une solution d'élution. Chacune des fractions du plasma peut ensuite subir différents traitements, séparation et analyse.

1.6 Modifications post-traductionnelles des protéines

L'étude des protéines dans le but de découvrir des biomarqueurs tumoraux est très complexe et pour simplifier le processus, il est pertinent d'étudier les protéines par ce qui les distingue, par exemple selon leurs modifications post-traductionnelles. La probabilité de découvrir des biomarqueurs augmente en séparant différentes catégories de protéines. Il existe de nombreuses modifications post-traductionnelles chez les protéines dont la phosphorylation, l'oxydation, l'ubiquitination, la méthylation, la glycosylation, la farnesylation, la sialylation, l'acétylation, nitrosylation etc. Les modifications post-traductionnelles sont environ au nombre de deux cents et assez peu parmi ces modifications sont réversibles et reconnues importantes pour les processus biologiques (Raggiaschi et coll., 2005). Les protéines et les peptides du plasma peuvent également subir des modifications post-traductionnelles à la suite d'un stress, du sommeil, de l'entraînement sportif, des repas et de l'état de grossesse (Thadikkaran et coll., 2005).

Dans le processus de la transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse, divers mécanismes du métabolisme cellulaire sont détournés ou altérés pour rendre la cellule résistante à l'apoptose, accroître la prolifération de façon désordonnée et détacher la cellule cancéreuse de son environnement par la migration et l'invasion tumorale. Les modifications post-traductionnelles peuvent survenir à différents stades du développement de la tumeur cancéreuse et procurer des indices quant à l'étape précoce ou tardive de la transformation (Srivastava et coll., 2005). À titre d'exemple et pour démontrer l'importance de certaines modifications post-traductionnelles, l'une de ces modifications est la phosphorylation. La

phosphorylation est régulée de façon combinée et réversible par les kinases et les phosphatases, des enzymes essentielles constituant 2% de tous les gènes du génome humain. La phosphorylation contrôle plusieurs processus biologiques tels que le métabolisme, la transcription, la traduction, la progression du cycle cellulaire, le réarrangement du cytosquelette, le mouvement cellulaire, l'apoptose, la différenciation, la signalisation cellulaire, la communication intercellulaire, l'activation du système immunitaire et le fonctionnement du système nerveux (Raggiaschi et coll., 2005). Lorsque les kinases, qui catalysent le transfert des groupes phosphorylés, et les phosphatases, qui hydrolysent des liens phosphoesters, subissent des altérations, il en résulte des pathologies comme le cancer et la dégénérescence du cerveau (Raggiaschi et coll., 2005). Une autre de ces modifications post-traductionnelles est l'oxydation. Celle-ci peut être réversible lorsqu'elle est impliquée dans un processus normal biologique ou irréversible dans le cas d'un dommage permanent dû à un excès d'espèces réactives de l'oxygène dans l'organisme causé par un stress oxydatif. L'oxydation peut introduire des groupements carbonyles dans les protéines ou modifier des acides aminés spécifiques comme la cystéine.

Le stress oxydatif peut être causé par certaines pathologies comme dans la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, l'arthrite, le diabète, la dystrophie musculaire, le cancer etc. entraînant la nécrose des tissus et la mort. À titre d'exemple de l'oxydation en tant que modification post-traductionnelle, Chiarugi et coll., (2005) mentionne que les protéines tyrosines phosphatases, qui modulent la prolifération cellulaire, l'adhésion et la motilité, sont soumises à deux modifications post-traductionnelles au cours de la signalisation cellulaire ce qui affecte leur activité enzymatique. Ces deux modifications post-traductionnelles sont la phosphorylation de la tyrosine, qui correspond à l'activation de l'enzyme, et l'oxydation du thiol des résidus cystéines qui entraîne l'inactivation complète de l'enzyme. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) intracellulaires, incluant H_2O_2 , sont produites en réponse à une grande variété de stimulus tels que PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), l'insuline, certaines cytokines et intégrines (Chiarugi et coll., 2005).

Depuis une dizaine d'années, les espèces réactives de l'oxygène sont identifiées comme étant des médiateurs significatifs de la croissance cellulaire, de l'adhésion, de la différenciation et de l'apoptose. Les protéines ayant des résidus cystéines de faible pKa, qui sont susceptibles d'être oxydés par les espèces réactives de l'oxygène, peuvent être des facteurs de transcription comme le facteur nucléaire κ -B, la protéine activatrice 1 (activator protein 1), le facteur induisant l'hypoxie (hypoxia-inducible factor), p53, p21, les proto-oncogènes de la famille Ras (Ras family of proto-oncogenes) et plusieurs PTP (protéines tyrosine phosphatase) et PTK (protéines tyrosine kinase) (Chiarugi et coll., 2005). Le lien entre le déclenchement de la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse et l'oxydation en tant que modification post-traductionnelle n'est pas clairement établi mais cette éventualité est envisageable étant donné le rôle de l'oxydation par les espèces réactives de l'oxygène dans la régulation de certains mécanismes fondamentaux conduisant à la formation d'une cellule cancéreuse. L'étude du protéome par les modifications post-traductionnelles dans la fraction des protéines peu abondantes du plasma (à la suite du fractionnement du plasma qui permet un agrandissement de l'échelle dynamique des protéines peu abondantes) augmente les possibilités de découvrir des marqueurs tumoraux ou un profil protéique significatif (signature de la présence d'un cancer) pour la détection précoce du cancer, le diagnostic, le pronostic et le suivi du traitement.

1.7 Plates-formes protéomiques pour la séparation et l'identification des protéines

Pour la séparation des protéines, les techniques suivantes sont principalement utilisées : le SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide) qui permet la résolution des protéines selon leur poids moléculaire; la technique du gel 2-D qui sépare les protéines selon leur point isoélectrique pour la première dimension, et selon leur poids moléculaire sur gel de polyacrylamide (SDS/PAGE) pour la deuxième dimension; la technique du HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) qui sépare les protéines selon leurs propriétés physico-chimiques; et la chromatographie d'affinité qui sépare les protéines selon leur affinité à un ligand fixé à la colonne de chromatographie (Béraud, 2001).

Parmi les stratégies utilisées pour la séparation des protéines, il y a la combinaison multidimensionnelle impliquant plusieurs méthodes automatisées de séparation des protéines et des peptides. À titre d'exemple, on peut utiliser la chromatographie liquide échangeuse d'ions (LC) en tandem avec la méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC), le tout couplé au spectre de masse. Cette dernière stratégie de combinaison multidimensionnelle intitulée « MudPIT » qui signifie « technologie multidimensionnelle d'identification de protéines », permet de résoudre des solutions complexes de protéines en couplant deux méthodes (bidimensionnelle) de chromatographie liquide ou trois méthodes (tridimensionnelle) de chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (MS) ou spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) sans avoir préalablement séparé les protéines par gel 2-D. Ces techniques de criblage à haut débit aussi appelées « stratégies shotgun » (« détection à l'aveugle ») se veulent très rapides et génèrent de grandes quantités d'informations sur les protéines et peptides du plasma et sont complémentaires aux gels d'électrophorèse bidimensionnelle (IEF/SDS) (He et coll., 2005).

D'autres approches technologiques les plus récentes en analyse protéomique sont associées aux biopuces à protéines (« protein arrays ») et aux biopuces à anticorps (« antibody arrays »). Ces technologies permettent l'analyse de dizaines de milliers d'échantillons en parallèle. Les biopuces à protéines sont composées de protéines recombinantes qui sont disposées de façon ordonnée sur une petite surface. Pour les biopuces à anticorps, ce sont des expériences immunologiques miniaturisées conçues pour analyser de grandes quantités de protéines et d'anticorps (Srivastava et coll., 2005).

1.8 Plates-formes technologiques pour l'analyse des protéines oxydées

Dans le cas de l'analyse des protéines selon leurs modifications post-traductionnelles, l'une des méthodes utilisées pour l'analyse des protéines oxydées est de modifier les groupements carbonyles intégrés dans les protéines en faisant réagir ceux-ci avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH). Les protéines peuvent ensuite être identifiées par immunobuvardage de type Western en utilisant des anticorps anti-DNP. Lorsque des acides

aminés sont modifiés par oxydation, la spectrométrie de masse est utilisée pour confirmer la modification (Aldred et coll., 2004). D'autres méthodes sont suggérées pour l'analyse des protéines oxydées parmi lesquelles il y a la méthode d'identification et de quantification des carbonyles des protéines oxydées par l'utilisation d'une étiquette (tag): O-ECAT (« oxydation-dependent carbonyl-specific Element-Coded Affinity Mass Tag ») suivie de la purification et de l'analyse des protéines d'intérêt par nanoLC-FTICR-MS (« nanoliquid chromatography-Fourier transform ion cyclotron resonance-mass spectrometry ») (Lee et coll. 2006).

1.9 Volet nutraceutique des protéines oxydées

L'oxydation des protéines est une modification post-traductionnelle qui peut varier selon l'état physique de la personne, son niveau d'entraînement, son âge, son état de santé et par la qualité des aliments ingérés. La littérature mentionne les bienfaits d'une bonne alimentation en fruits et légumes, vin, chocolat noir, thé vert et autres pour la prévention du cancer (Béliveau et Gingras, 2005). Les nombreuses réactions et modifications possibles subies par les protéines du plasma humain et causées par les molécules anticancéreuses et parfois antioxydantes provenant des aliments anticancéreux doivent être rigoureusement étudiées au niveau du plasma, pour appuyer les arguments en faveur d'une bonne alimentation et pour connaître en temps réel le rôle dynamique dans le plasma de l'action de ces molécules sur les modifications post-traductionnelles des protéines de faible abondance du plasma humain. Actuellement, les résultats de l'action des molécules anticancéreuses d'origine alimentaire portent sur des données scientifiques validées en culture cellulaire. Il serait intéressant d'ajouter à ces découvertes majeures l'apport d'une analyse au niveau du plasma humain.

L'action des molécules anticancéreuses qui sont dans certains cas également antioxydantes peut être vérifiée par les variations à la hausse ou à la baisse de l'oxydation en tant que modification post-traductionnelle des protéines peu abondantes du plasma. Les protéines oxydées contiennent des groupements carbonyles et leur détection s'effectue par

l'ajout de DNPH qui se fixe aux carbonyles des protéines oxydées comme décrit ci-dessus. La méthode utilisée pour étudier les variations de l'oxydation des protéines du plasma est l'immunobuvardage par détection spécifique des groupements carbonyles des protéines oxydées au moyen des anticorps anti-DNP.

Le terme « nutraceutique » est une contraction des mots « nutrition » et « pharmaceutique » et fait référence à l'ingrédient actif présent à l'état naturel dans un aliment qui procure un effet bénéfique et préventif pour la santé (Le grand dictionnaire terminologique de l'Office québécois de la langue française). Parmi ces molécules naturelles phytochimiques, on retrouve les isoflavones du soja, le resvératrol des raisins, la curcumine de l'épice curcuma, les isothiocyanates et indoles du brocoli ou les catéchines du thé vert etc. qui sont tous des polyphénols (Béliveau et Gingras, 2005). L'équipe de notre laboratoire a établi un protocole nutraceutique de prise d'aliments anticancéreux suivie de prélèvements sanguins à intervalles réguliers pour vérifier les variations de l'oxydation des protéines du plasma.

Le volet nutraceutique du projet d'analyse protéomique du plasma humain devrait apporter des informations précieuses à l'action d'une excellente alimentation et répondre à certaines interrogations concernant les molécules anticancéreuses qui sont aussi dans certains cas antioxydantes. Malgré le peu d'analogies apparentes entre les capacités antioxydantes des molécules phytochimiques et leurs vertus anticancéreuses qui sont davantage établies, il est tout de même intéressant de s'attarder à l'étude de l'action antioxydante des molécules phytochimiques des fruits et légumes, chocolat noir, thé vert, etc. en rapport à la synergie possible avec leurs propriétés antioxydantes.

1.10 But du projet

Dans le contexte général de la lutte contre le cancer, différentes stratégies sont préconisées. Certaines stratégies sont appliquées au niveau de la biologie moléculaire et de la signalisation cellulaire pour arrêter la progression du cancer. Certaines stratégies sont

destinées à la destruction des cellules cancéreuses par la radiothérapie, la chimiothérapie et la découverte de nouvelles molécules synthétiques. Dans notre laboratoire, nous travaillons à la détection précoce du cancer par la recherche de marqueurs tumoraux ainsi qu'à la prévention du cancer par la nutrathérapie.

La recherche sur les marqueurs tumoraux dans le plasma est cruciale pour permettre le dépistage précoce du cancer. Cependant, la détection de ces marqueurs tumoraux et leur identification sont contrecarrées par la supériorité en quantité des protéines majeures du plasma. L'amélioration et l'affinement des méthodes de fractionnement du plasma, d'analyse, d'identification et de détection et leur standardisation sont essentiels à la poursuite et au succès de cette recherche des protéines d'intérêt clinique.

Le fractionnement efficace du plasma humain est une condition préalable au dépôt des échantillons sur gels d'électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS parce que la présence de l'albumine et des immunoglobulines et d'autres protéines majeures du plasma, empêche la détection des protéines peu abondantes du plasma sur gel de polyacrylamide et l'identification et la quantification des protéines peu abondantes par les méthodes employées.

La découverte de protéines d'intérêt clinique exige que les gels d'électrophorèse bidimensionnelle (IEF/SDS) soient effectués de façon très rigoureuse. Ils doivent être reproductibles, d'une grande précision, d'une résolution impeccable, sans stries apparentes ni de protéines aux contours flous et imprécis ce qui ne peut être réalisé qu'en contrôlant tous les paramètres de traitement des échantillons : le prélèvement sanguin, l'isolement du plasma, le fractionnement du plasma et jusqu'à la préparation minutieuse et constante des gels d'électrophorèse bidimensionnelle et de leur coloration. La standardisation de toutes ces étapes est cruciale pour parvenir éventuellement à découvrir soit un biomarqueur seul, un groupe de biomarqueurs ou bien un profil ou une « signature » protéique signalant de façon précoce, spécifique et précise la présence d'un cancer du sein ou des ovaires ou de toute autre forme de cancer. Éventuellement, l'utilisation de logiciels d'analyse pour comparer des gels d'électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS sur lesquels auront été déposés des échantillons

de plasma de personnes atteintes du cancer du sein ou des ovaires et de personnes en santé permettra de déterminer des variations d'expression de certaines protéines qui pourraient être des biomarqueurs potentiels.

Une comparaison de trois méthodes de fractionnement du plasma a d'abord été réalisée pour distinguer la méthode la plus efficace. Trois colonnes de chromatographie d'affinité ont été expérimentées, soit ProteoExtract™, The Multiple Affinity Removal System et ProtéomeLab™ IgY-12, et leurs produits d'élution, soit les protéines abondantes et/ou peu abondantes ont été séparées par gels d'électrophorèse SDS/PAGE et IEF/SDS afin de valider la méthode la plus efficace. De multiples mises au point ont été pratiquées pour améliorer la qualité des échantillons de protéines abondantes et peu abondantes du plasma obtenus par élution après le fractionnement du plasma par chromatographie d'affinité. Nous avons également accordé une grande importance à la mise au point des gels d'électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS pour en assurer la reproductibilité. Plusieurs détails techniques ont été considérés comme l'élimination des sels. La présence des sels dans les tampons d'élution ou inhérents au plasma peut compliquer la focalisation isoélectrique et la migration des protéines sur gel. Ceci nous a amenés à essayer différentes méthodes dont la précipitation des protéines et la dialyse.

L'oxydation des protéines en tant que modification post-traductionnelle a également été explorée au cours du projet d'analyse protéomique du plasma humain étant donné les possibilités remarquables de découvrir des protéines d'intérêt clinique que pourrait apporter l'analyse d'une modification post-traductionnelle en tant que sous-fractionnement des protéines peu abondantes du plasma. Dans le cadre de la prévention du cancer, un protocole nutraceutique a été élaboré afin de vérifier le niveau d'oxydation des protéines de chacune des fractions du plasma humain après l'apport d'aliments sains antioxydants et anticancéreux.

L'objectif de notre projet, qui est un volet de la vaste recherche subventionnée par Génome Québec sur la détection précoce du cancer du sein et des ovaires par des marqueurs tumoraux plasmatiques, est donc de choisir la méthode de chromatographie d'affinité la plus

efficace pour le fractionnement du plasma humain, en protéines peu abondantes et en protéines abondantes, la méthode étant choisie après comparaison de trois méthodes de fractionnement par chromatographie d'affinité; de déterminer la méthode de préparation du plasma avec les anticoagulants EDTA et CTAD la plus appropriée à nos études; de procéder à la mise au point des gels d'électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS de grand format (18 cm) et de petit format (7 cm) après le dépôt sur gel des échantillons récoltés par la méthode de chromatographie d'affinité la plus efficace; d'explorer l'oxydation des protéines en tant que modification post-traductionnelle dans les fractions des protéines peu abondantes et abondantes du plasma.

D'autre part, dans le cadre de la prévention du cancer par la nutrathérapie, notre objectif est d'évaluer le niveau d'oxydation des protéines dans les fractions des protéines peu abondantes et abondantes du plasma humain après ingestion d'aliments anticancéreux et antioxydants.

Les résultats du présent mémoire serviront à rédiger un article qui sera bientôt soumis à une revue scientifique.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Le matériel de recherche utilisé lors du projet d'analyse protéomique du plasma humain provient du sang de deux volontaires féminins en santé. Le sang a été récolté dans des tubes stériles de prélèvement sanguin (13 x 75 mm) BD Vacutainer® CTAD (un anticoagulant formé de citrate de sodium, théophylline, adénosine et dipyramidole qui minimise l'activation des plaquettes) de 4,5 mL de BD Vacutainer™ (Plymouth, Royaume-Uni) achetés chez VWR International (Ville Mont-Royal, Qc, Canada) et dans des tubes stériles de prélèvement sanguin (13 x 100 mm) de 6,0 mL de BD Vacutainer® Spray Coated K₂EDTA (Plymouth, Royaume-Uni) distribués par VWR International (Ville Mont-Royal, Qc, Canada).

Les colonnes de chromatographie d'affinité utilisées pour le fractionnement du plasma sont la colonne ProteoExtract™ Albumin/IgG Removal Kit de Calbiochem (La Jolla, CA, États-Unis), la colonne Agilent Multiple Affinity Removal System de Agilent Technologies (Wilmington, DE, États-Unis) et la colonne d'affinité ProteomeLab™ IgY Spin Column Proteome Partitioning Kit de Beckman Coulter, Inc. (Mississauga, On, Canada).

Le dosage de protéines est effectué par Micro BCA™ Protein Assay Kit de Pierce (Rockland, IL) et (à l'occasion) par EZQ® Protein Quantitation Kit de Molecular Probes™ Invitrogen detection technologies (Eugene, OR). Les produits utilisés pour la fabrication de gels d'électrophorèse SDS/PAGE et bidimensionnels IEF/SDS soit l'acrylamide, le Tris et l'urée proviennent de Roche Diagnostics (Laval, Qc, Canada). Le bis-acrylamide provient de Rose Scientific (Mississauga, Ontario, Canada). La glycine est un produit de Fisher Scientific (Ville-St-Laurent, Qc, Canada). Le chlorure de sodium, le glycérol, le dithiothréitol (DTT), l'iodoacétamide, la thiourée, le CHAPS, le N-Décyl-N,-N-Diméthyl-3-Ammonio-1-propane-

sulfonate (SB3-10) et le sulfate d'ammonium sont de Sigma-Aldrich (Oakville, On, Canada). Le 2-mercaptoéthanol est un produit de GE Healthcare (Baie-d'Urfé, Qc, Canada). Le sodium dodécyl sulfate (SDS), le bleu de bromophénol, le Bleu brillant Coomassie (CBB) G-250, Bleu brillant Coomassie R-250, le *N,N,N',N'*-tétraméthylènediamine (TEMED), l'ammonium persulfate (APS) et l'agarose proviennent de Bio-Rad (Mississauga, On, Canada). Tris-HCl provient de VWR International (Ville Mont-Royal, Qc, Canada). Les produits chimiques nécessaires à la coloration des gels soit le méthanol (grade ACS), l'éthanol, l'acide acétique, le formaldéhyde, le nitrate d'argent, le thiosulfate de sodium pentahydrate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) et le carbonate de sodium sont de VWR International (Ville Mont-Royal, Qc, Canada). Le colorant Deep Purple Total Protein Stain provient de GE Healthcare (Baie-d'Urfé, Qc, Canada). Le colorant Sypro® Ruby Protein Stains provient de Bio-Rad (Mississauga, Ontario). Les gels colorés au Bleu brillant Coomassie G-250 ont été numérisés par l'appareil ImageScanner II de GE Healthcare (Baie-d'Urfé, Qc, Canada). Les gels colorés aux colorants fluorescents Deep Purple Total Protein Stain et Sypro® Ruby Protein Stains ont été numérisés par l'appareil Typhoon Scanner de GE Healthcare (Baie-d'Urfé, Qc, Canada) à l'Institut de recherche en biotechnologie du Conseil national de recherches du Canada (IRB-CNRC) (Montréal, Qc, Canada).

Protéines standards : Natural unstained SDS-PAGE standards Broad Range étaient de Bio-Rad Laboratories (Ville Mont-Royal, Qc, Canada). Les appareils et produits suivants utilisés pour les gels bidimensionnels IEF/SDS sont de GE Healthcare (Baie-d'Urfé, Qc, Canada): les gels Immobiline™ DryStrip (18 cm) et (7 cm), DeStreak Reagent, IPG buffers, Immobiline™ DryStrip Cover Fluid et les appareils d'électrophorèse Multiphor™ II Electrophoresis System dont l'appareil Ettan IPGphor isoelectric focusing system, l'appareil Ettan DALTsix Electrophoresis System (26 x 20 cm) ainsi que le MultiTemp III Thermostatic Circulator et le EPS 601 Power Supply II.

Les membranes de PVDF BioTrace de Pall Life Sciences (Pensacola, FL) (0,45 µm de porosité) (PVDF signifie difluorure de polyvinylidène) sont utilisées lors du transfert humide de type Western. Le produit Albumine Bovine Serum (BSA), Fraction V, cristalline, de US

Biologicals distribué par Tekniscience (Terrebonne, Qc) est utilisé pour le blocage des membranes. Les films utilisés pour la détection sont de type Fuji X-Ray Film. Pour le transfert humide de type Western l'appareil suivant est utilisé : Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad Laboratories (Mississauga, Ontario) pour des gels d'électrophorèse de 7,5 x 10 cm. La solution pour l'obtention du signal de chimioluminescence est le réactif Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus de Perkin Elmer (Boston, MA).

La détection des protéines oxydées du plasma s'effectue au moyen du produit OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit de Chemicon International, Inc., une division de Serologicals® Corporation (Temecula, CA). Le tampon sodium phosphate (PBS) utilisé pendant le processus de détection des protéines oxydées est composé de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (monobasique monohydrate), de Na_2HPO_4 (dibasique) et de Tween 20 polysorbate Research Grade achetés chez Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, On., Canada). Lorsque les protéines dans les bandes de gel IPG étaient dérivées au 2,4-dinitrophénylhydrazine après la focalisation isoélectrique, le produit 2,4-dinitrophénylhydrazine contenant 30% d'eau (DNPH) provenant de Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, On., Canada) était utilisé au lieu du produit DNPH du kit OxyBlot™.

Les légumes dans le cadre du volet nutraceutique de l'étude ont été achetés au marché Jean-Talon. Les fruits congelés de marque Europe's Best Brand et le chocolat noir 85% de marque Lindt ont été achetés dans les épiceries. Le thé vert japonais de marque Yumiya a été acheté à la pharmacie Jean Coutu de l'Hôpital Sainte-Justine.

2.2 Méthodes

2.2.1 Préparation du plasma

Le sang de volontaires féminins en santé a été prélevé dans des tubes stériles de prélèvement sanguin BD Vacutainer® contenant les anticoagulants CTAD ou EDTA. Les tubes de prélèvement BD Vacutainer® CTAD de 4,5 mL sont centrifugés à 2 000 x g pendant

10 minutes à 4°C. Le surnageant est filtré avec un filtre de difluorure polyvinylidène (PVDF) de 0,45µm de Millipore (Fisher, Ville St-Laurent, Qc). Les tubes de prélèvement BD Vacutainer® EDTA de 6,0 mL sont centrifugés à 2 000 x g pendant 10 minutes à 4°C et les surnageants obtenus sont centrifugés une deuxième fois. Le plasma est réparti en aliquotes et congelé à -80°C.

2.2.2 Fractionnement du plasma par chromatographie d'affinité

Trois différentes colonnes de déplétion ont été utilisées dans cette étude et les protocoles des fabricants ont été suivis. La colonne de chromatographie d'affinité ProteoExtract™ Albumin/IgG Removal Kit qui permet d'éliminer l'albumine et les immunoglobulines G a été utilisée pour fractionner le plasma. Les étapes d'élution ont été effectuées par gravité. La colonne est équilibrée avec un volume de 850 µL de tampon de liaison (ProteoExtract Albumin/IgG Binding Buffer). Un volume de 30 µL de plasma est dilué douze fois avec le tampon de liaison avant le dépôt sur la colonne. La colonne est lavée deux fois avec 600 µL de tampon de liaison. Les volumes des fractions non liées à la colonne et les volumes de lavage sont rassemblés et ce volume constitue la fraction des protéines peu abondantes du plasma. Cette fraction est concentrée et lavée avec un volume d'eau nanopure (4 mL) dans un tube de concentration Millipore spin concentrators, 5 kDa MWCO, 4 mL (Fisher, Ville St-Laurent, Qc, Canada) jusqu'à un volume final de 70 µL. La colonne n'est pas réutilisable. Les protéines abondantes ne sont pas récupérables.

La colonne de chromatographie d'affinité The Agilent Multiple Affinity Removal System permet d'éliminer six protéines majeures et a été utilisée pour fractionner le plasma. Les étapes d'élution ont été effectuées par centrifugation « spin column ». Un volume de 10 µL de plasma est dilué vingt fois dans le tampon A du manufacturier avant d'être filtré avec un filtre de 0,22 µm du manufacturier (à 16 000 x g pendant une à deux minutes à température pièce). La colonne est équilibrée avec 4 mL de tampon A. L'échantillon filtré est déposé sur la colonne et la colonne est centrifugée pendant 1,5 minutes à 100 x g à 4°C. La colonne est lavée deux fois avec 400 µL de tampon A par centrifugation à 100 x g pendant

2,5 minutes. Les volumes des fractions non liées à la colonne et les volumes de lavage sont combinés, ce qui correspond à la fraction des protéines peu abondantes du plasma. Les protéines abondantes soit l'albumine, IgG, IgA, transferrine, haptoglobine et antitrypsine qui sont liées à la colonne sont éluées en utilisant 2 mL du tampon B du manufacturier. La colonne est ensuite rééquilibrée avec 4 mL de tampon A. Les protéines peu abondantes ou abondantes provenant de trois chromatographies sont combinées ce qui correspond au fractionnement de 30 μL de plasma (trois passages de colonne de 10 μL chacun). L'échantillon des protéines peu abondantes et celui des protéines abondantes sont lavés séparément à l'eau nanopure et concentrés dans des tubes à concentration de 4 mL (5 kDa MWCO), jusqu'à un volume final de 70 μL . La colonne est réutilisable deux cents fois.

La colonne de chromatographie d'affinité ProteomeLab™ IgY-12 Spin de Beckman Coulter, Inc. permet d'éliminer douze protéines majeures et a été utilisée pour fractionner le plasma. Les étapes d'éluion ont été effectuées par centrifugation « spin column ». Un volume de 10 μL de plasma est dilué cinquante fois dans le tampon de dilution du manufacturier (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl). L'échantillon de plasma dilué est ajouté aux microbilles et la colonne est incubée sur une plaque sérologique pendant 15 minutes à température pièce. La colonne est centrifugée à 400 x g pendant 30 secondes à 18°C (les conditions de centrifugation sont les mêmes pour les étapes subséquentes). Un premier lavage est effectué avec 500 μL de tampon de dilution. La fraction non liée et le lavage sont combinés pour atteindre un rendement maximal des protéines peu abondantes du plasma. Après deux autres lavages, les protéines abondantes du plasma sont décrochées de la colonne avec 500 μL de tampon (tampon d'éluion composé de 0,1M Glycine-HCl, pH 2,5) à 18°C sur la plaque sérologique pendant 3 minutes. Ce processus est effectué deux fois suivi chaque fois par une centrifugation. Les volumes sont combinés et cette fraction constitue les protéines abondantes du plasma (l'albumine, IgG, transferrine, fibrinogène, IgA, α 2-macroglobuline, IgM, α 1-antitrypsine, haptoglobine, α 1-glycoprotéine acide, apolipoprotéine A-I et A-II). Un volume de 100 μL de solution de neutralisation 10X (1M Tris-HCl, pH 8,0) est ajouté au volume représentant la fraction des protéines abondantes du plasma. Un volume de 600 μL de solution de neutralisation 1X est ajouté aux microbilles avant une incubation de 5 minutes sur plaque sérologique à 18°C afin de régénérer la colonne. Après une

centrifugation, la colonne est finalement rééquilibrée avec 500 μ L de tampon de dilution. La colonne est réutilisable cent fois. Les microbilles de la colonne sont conservées dans la solution de dilution incluant 0,02% d'azoture de sodium à 4°C. Les fractions des protéines peu abondantes ainsi que les fractions des protéines abondantes de trois purifications sont combinées puis concentrées avec les tubes de concentration Millipore spin concentrators, 5 kDa MWCO, 0,5 mL (Fisher, Ville St-Laurent, Qc, Canada) jusqu'à un volume final de 10 à 12 μ L.

2.2.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS/PAGE

La préparation de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide sodium dodécyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE) est faite selon la méthode de Laemmli (1970) avec un système d'électrophorèse Mini-PROTEAN® II Cell de Bio-Rad Laboratories (Mississauga, On). La quantification des protéines totales est effectuée par Micro BCA de Pierce selon le protocole du manufacturier. L'albumine sérique bovine, fournie par le manufacturier, est utilisée comme standard (BSA). Les protéines des échantillons (50 μ g/puits) sont resuspendues dans un tampon d'échantillon à une concentration finale de 1 mg/mL. Le tampon d'échantillon est composé de 62,5 mmol/L Tris-HCl, pH 6,8, 10% glycérol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoéthanol et 0,00625% bleu de bromophénol. Les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes et déposés sur un gel 10% d'acrylamide/bis-acrylamide (29,2:0,8). L'électrophorèse s'effectue à un voltage constant de 100 volts.

2.2.4 Électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide IEF/SDS

Les échantillons sont dilués dans le tampon de réhydratation contenant 5 M d'urée, 2 M de thiouré, 2% de CHAPS, 2% de SB3-10, 0,3% de DTT, 1% de tampon IPG et 1,2% de DeStreak™ (sauf indication contraire) dans un volume final de 350 μ L pour les bandes de gel de 18 cm (et de 150 μ L pour les bandes de gels de 7 cm). Les bandes de gel (IPG strips) de 18 cm sont passivement réhydratées au cours de la nuit à température pièce avec une durée de

10 heures minimum dans un support (Ettan IPGphor strip holder) à cet effet. Après la réhydratation, des papiers buvards sont installés entre les électrodes des supports et les bandes de gel juste avant la focalisation isoélectrique qui se déroule sur l'appareil Ettan IPGphor isoelectric focusing system de GE Healthcare en quatre étapes à 18°C: 3 heures à 200 volts, 1 heure à 500 volts, 1 heure à 1 000 volts et 13 heures à 8 000 volts. Après la séparation des protéines en première dimension, les protéines dans les bandes de gel sont réduites pendant quinze minutes dans un tampon d'équilibration (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 6 M urée, 30% glycérol et 2% SDS) additionné de 1% de dithiothréitol (DTT) à température pièce. Par la suite, les protéines sont alkylées pendant quinze minutes dans le même tampon d'équilibration contenant 2,5% d'iodoacétamide et du bleu de bromophénol à température pièce. Les bandes de gel sont ensuite déposées sur des gels d'électrophorèse de polyacrylamide de 10% dans un système d'électrophorèse Ettan DALTsix et les bandes de gel sont recouvertes de 0,5% d'agarose dans le tampon 50 mM Tris/HCl, pH 6,8, 1,44% glycine et 0,1% SDS. La migration est effectuée à 25 mA/gel pendant 1 heure et ensuite à 60 mA/gel jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

Lorsque l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide (IEF/SDS) s'effectue avec des bandes de gel de 7 cm, le volume du tampon de réhydratation est de 150 μ L. La durée de la réhydratation est la même soit 10 heures. Après la réhydratation, des papiers buvards sont installés dans le support entre les électrodes et la bande de gel. La programmation du voltage pour permettre la séparation des protéines pendant la première dimension est de 200 volts pendant 2 heures, 30 minutes à 500 volts, 30 minutes à 1 000 volts et 13 heures à 5 000 volts. Les protéines dans les bandes de gel sont réduites pendant quinze minutes dans le tampon d'équilibration avec 1% de dithiothréitol (DTT) et alkylées pendant quinze minutes dans le tampon d'équilibration avec 2,5% d'iodoacétamide incluant du bleu de bromophénol, à température pièce. Les bandes de gel sont ensuite déposées sur des gels d'électrophorèse dont les gels de séparation sont composés de 10% d'acrylamide pour la seconde dimension qui a lieu dans un système d'électrophorèse Mini-PROTEAN II de Bio-Rad à voltage constant de 100 volts jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

2.2.5 Coloration au Bleu brillant Coomassie G-250 des gels d'électrophorèse

Après une incubation dans 30% méthanol et 10% acide acétique, les gels sont colorés dans 0,1% Bleu brillant Coomassie G-250, 34% méthanol, 0,5% acide acétique et 17% sulfate d'ammonium sous faible agitation. Les gels sont décolorés à l'eau nanopure. Les gels colorés sont numérisés au scanner ImageScanner II de GE Healthcare.

2.2.6 Coloration au nitrate d'argent des gels d'électrophorèse

La technique de coloration au nitrate d'argent nous a été gracieusement fournie par Dr Sam Dougaparsad de Beckman Coulter (Mississauga, On, Canada). Cette procédure a été développée avec de légères modifications selon la méthode de Shevchenko (Shevchenko et coll., 1996). Les gels sont fixés dans 50% méthanol, 5% acide acétique et 0,02% formaldéhyde 37% pendant 1 heure. Les gels sont ensuite lavés trois fois dans 50% méthanol pendant 10 minutes et conservés dans l'eau nanopure toute la nuit, à température pièce, sous faible agitation. Pendant l'étape de la sensibilisation, les gels sont incubés pendant 1 minute dans 0,02% de thiosulfate de sodium pentahydrate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) à température pièce et rincés trois fois dans l'eau nanopure pendant 10 secondes. Les gels sont ensuite incubés dans 0,2% nitrate d'argent et 0,03% de formaldéhyde 37% pendant 20 minutes à 4°C dans la noirceur et rincés trois fois dans l'eau nanopure pendant 10 secondes. Les gels sont ensuite développés en les incubant dans 3% carbonate de sodium, 0,02% formaldéhyde 37% et 0,0004% thiosulfate de sodium pentahydrate. Lorsque les protéines atteignent l'intensité voulue, l'étape du développement est arrêtée en rinçant les gels dans 50% méthanol et 5% acide acétique trois fois pendant 10 secondes avant de les conserver dans 2% acide acétique. Les gels colorés au nitrate d'argent sont numérisés au scanner ImageScanner II de GE Healthcare.

2.2.7 Coloration Deep Purple des gels d'électrophorèse

Les gels sont fixés toute la nuit dans 7,5% acide acétique et 10% éthanol à température pièce. Les gels sont lavés avec 35 mM de carbonate de sodium hydrogéné et 300 mM carbonate de sodium à température pièce, pendant 30 minutes, sous faible agitation. Les gels sont ensuite colorés au colorant Deep Purple (Deep Purple Total Protein Stain) de GE Healthcare pendant 1 heure, à température pièce, à la noirceur. Les gels sont ensuite lavés deux fois à l'acide acétique 7,5% pendant 15 minutes, à température pièce, à la noirceur. Les gels colorés au Deep Purple sont numérisés en fluorescence au moyen d'un Typhoon Scanner de GE Healthcare.

2.2.8 Coloration Sypro Ruby des gels d'électrophorèse

Les gels sont fixés pendant 1 heure ou plus dans 10% méthanol et 7% acide acétique avant de les colorer dans le colorant Sypro Ruby de Bio-Rad pendant la nuit, à température pièce, sous faible agitation. Les gels sont ensuite rincés dans 10% méthanol et 7% acide acétique pendant 1 heure et ensuite lavés à l'eau nanopure. Les gels colorés au Sypro Ruby sont numérisés en fluorescence au moyen d'un Typhoon Scanner de GE Healthcare.

2.2.9 Immunobuvardage de type Western

Le transfert humide de type Western est effectué sur une membrane de PVDF BioTrace de Pall Life Sciences (Pensacola, FL) (0,45 μm de porosité) avec l'appareil Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad Laboratories pour des gels d'électrophorèse de 7,5 x 10 cm. Le transfert s'effectue à 100 volts (voltage constant) pendant 90 minutes à 4°C dans un tampon de transfert composé de 96 mM glycine, 10 mM Tris, 20% méthanol et 0,01% SDS. Le blocage de la membrane est effectuée dans l'albumine sérique bovine. Les membranes de PVDF sont colorées au Bleu brillant Coomassie R-250.

2.2.10 Modification des protéines oxydées avec le DNPH avant analyse par électrophorèse SDS/PAGE

Les protéines oxydées dans les fractions des protéines peu abondantes et abondantes du plasma sont détectées au moyen du produit OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit de Chemicon® International. Les échantillons protéiques sont préparés selon le protocole du manufacturier. Un volume représentant une quantité de 20 µg de protéines (après dosage par Micro BCA™) est dilué dans l'eau nanopure pour atteindre un volume total de 5 µL. 5 µL de SDS 12% est ajouté à l'échantillon pour obtenir une concentration finale de 6% SDS. 10 µL de DNPH 1X fabriqué à partir de la solution de dérivation DNPH 10X (DNPH 10X Solution) du matériel OxyBlot™ est ajouté aux échantillons et 10 µL de la solution contrôle DNPH 1X (DNPH 10X Derivatization-Control Solution) est ajouté au contrôle négatif. Les échantillons et le contrôle négatif sont incubés 15 minutes à température pièce. La réaction est arrêtée par l'ajout de 7,5 µL de solution de neutralisation (Neutralization Solution) du matériel OxyBlot™. Par la suite, on ajoute 1 µL de 2-mercaptoéthanol aux échantillons, pour obtenir une concentration de 0,74M de 2-mercaptoéthanol, et 20 µL de tampon échantillon.. La solution de standards utilisée provient du matériel OxyBlot™.

2.2.11 Détection des protéines oxydées sur membrane de PVDF après transfert du gel d'électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS

La dérivation des protéines oxydées sur gel de polyacrylamide bidimensionnel 7,5 x 10 cm est effectuée en utilisant le DNPH (97%). La dérivation des protéines est faite dans les bandes de gel entre la focalisation isoélectrique et l'étape de réduction dans le tampon d'équilibration. Le processus consiste à tremper la bande de gel contenant l'échantillon de protéines pendant 15 à 20 minutes à 25°C dans une solution 2N HCl/10mM DNPH. La bande de gel est ensuite lavée pendant 15 minutes dans une solution 2M Tris/30% glycérol. Les protéines dans la bande de gel sont ensuite réduites (1% DTT dans le tampon d'équilibration) pendant 15 minutes et alkylées (2,5% iodoacétamide dans le tampon d'équilibration) pendant 15 minutes. La bande de gel est ensuite déposée sur un gel de polyacrylamide SDS/PAGE de

10% dans un système d'électrophorèse Mini-PROTEAN II de Bio-Rad et la migration s'effectue à voltage constant de 100 volts jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

2.2.12 Immunobuvardage de type Western des protéines oxydées

Le transfert humide de type Western est effectué sur une membrane de PVDF BioTrace de Pall Life Sciences (0,45 μm de porosité) avec l'appareil Mini Trans-Blot Cell pour des gels d'électrophorèse de 7,5 x 10 cm. L'immunobuvardage des protéines oxydées suit le protocole du kit OxyBlot™. Le transfert s'effectue à 100 volts (voltage constant) pendant 90 minutes à 4°C dans un tampon de transfert composé de 96 mM glycine, 10 mM Tris, 20% méthanol et 0,01% SDS. Le blocage des sites hydrophobes et non-spécifiques de la membrane est effectuée avec 1% BSA dans PBS pH 7,5 contenant 0,05% Tween 20. La détection est réalisée au moyen des anticorps primaire et secondaire du matériel OxyBlot™ selon le protocole du fabricant. La solution pour l'obtention du signal d'immunodétection est le réactif Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus. Les membranes de PVDF sont colorées au Bleu brillant Coomassie R-250.

2.2.13 Préparation des extraits de légumes et de fruits

L'extrait de légumes a été préparé avec 2 kg de chacun des légumes suivants : épinards, brocolis, navets, choux de Bruxelles. Les légumes sont nettoyés, pesés et introduits dans l'extracteur à jus Breville modèle JE 900 (Pointe-Claire, Qc). Un oignon espagnol et 32 gousses d'ail ont été préparés de la même façon avant d'être ajoutés à l'extrait. 16 cuillerées à thé de curcuma ont été mélangées avec 75 mL d'huile d'olive. Cette suspension a été ajoutée à l'extrait ainsi que 2 boîtes de 227 mL de pâte de tomate.

L'extrait de fruits a été préparé avec 4 tasses de fraises (fraîches ou congelées), 4 tasses de bleuets (frais ou congelés), 2 tasses de canneberges (fraîches ou congelées) et 4 litres de

lait de soya qui sont homogénéisés dans un mélangeur. Les extraits de légumes et de fruits sont conservés à -80°C .

2.2.14 Protocole nutraceutique de phase aiguë

Un prélèvement sanguin dans des tubes CTAD a été effectué sur un volontaire à jeun (temps 0) qui a par la suite consommé 125 mL d'extrait de légumes, 125 mL d'extrait de fruits en plus de 40 gr de chocolat noir Lindt ainsi qu'une tasse de thé vert japonais Yumiya. Cette même série d'aliments a été consommée trois autres fois, soit à 3, 10 et 24 heures après le temps 0. Deux autres prélèvements sanguins ont été effectués à 6 et 27 heures après le début du protocole. Le plasma a été récolté selon le protocole établi et conservé à -80°C .

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Gel 2-D des protéines totales du plasma

Les protéines abondantes du plasma limitent l'enrichissement des protéines peu abondantes du plasma sur gels 2-D. La figure 3.1 montre un gel 2-D (500 µg) grand format du plasma brut mettant en évidence la nécessité d'enrichir les protéines peu abondantes du plasma par la déplétion des protéines abondantes du plasma brut dans la recherche de marqueurs tumoraux. Des flèches désignent l'emplacement sur le gel d'électrophorèse bidimensionnelle de certaines protéines majeures dont l'albumine, la transferrine, l' α 1-antitrypsine et les immunoglobulines G chaînes légères et chaînes lourdes.

3.2 Mise au point des gels 2-D grand format après déplétion du plasma humain par la colonne d'affinité The Agilent Multiple Affinity Removal System pour enlever les sels et autres substances interférentes dans les échantillons

Des études préliminaires ont été menées pour optimiser la séparation des protéines plasmatiques sur gel 2-D de grand format. Le plasma brut est fractionné par la colonne d'affinité Multiple Affinity Removal System de Agilent comme montré à la figure 3.2. La figure 3.2 A est le résultat sur gel 2-D du protocole original de Agilent. Une mise au point a permis d'obtenir une meilleure résolution du gel 2-D après l'élimination des sels par lavage à l'eau nanopure et par concentration des protéines (figure 3.2 B). Les sels et autres substances telles que les détergents peuvent interférer lors de la focalisation isoélectrique et de la migration des protéines. Plusieurs tentatives de mise au point ont été exécutées dont la précipitation des protéines à l'éthanol froid et la dialyse. La concentration des sels dans l'échantillon ne doit pas être supérieure à 100 mM (Görg et coll., 2004) d'où la nécessité d'une méthode pour dessaler les échantillons (dessalage par dialyse, précipitation, lavage à

l'eau nanopure et concentration etc). La concentration finale en SDS doit être moins de 0,2% (Görg et coll., 2004) pour éviter les stries horizontales. La figure 3.2 B démontre que le lavage et la concentration de l'échantillon de protéines peu abondantes du plasma permettent d'atteindre une meilleure résolution des protéines et laissent apparaître une plus grande quantité de protéines peu abondantes sur gel 2-D.

3.3 Mise au point des gels 2-D grand format par l'ajout de papiers buvards sur les électrodes lors de la focalisation isoélectrique après déplétion du plasma humain par la colonne d'affinité The Agilent Multiple Affinity Removal System

Les figures 3.3 A et B montrent des gels 2-D des protéines peu abondantes du plasma fractionné par la colonne d'affinité Multiple Affinity Removal System de Agilent. L'encadré de la figure 3.3 B en comparaison à la figure 3.3 A montre que l'ajout de papiers buvards améliore la résolution des protéines du gel 2-D. L'ajout d'une étape de focalisation isoélectrique de 200 volts pendant quelques heures après l'ajout des papiers buvards permet d'éliminer des sels résiduels et autres substances de la bande de gel qui migrent rapidement vers les papiers buvards placés sur les électrodes. Les sels et les autres substances sont retenus par les papiers buvards, ce qui ajoute une étape de nettoyage supplémentaire de l'échantillon avant la migration en seconde dimension sur gel d'électrophorèse SDS/PAGE.

3.4 Analyse comparative de diverses procédures d'affinité pour enlever les protéines les plus abondantes du plasma

Le plasma brut a été soumis à différentes techniques d'affinité pour la déplétion des protéines les plus abondantes. Les fractions des protéines du plasma ont ensuite été analysées par SDS-PAGE pour étudier l'efficacité du retrait des protéines abondantes du plasma. La plupart de l'albumine présente dans le plasma a été enlevée tel que le montre la fraction non liée à la colonne récoltée des différentes colonnes de déplétion : ProteoExtract Removal kit de Calbiochem (figure 3.4, puits 1 et 2), Agilent Multiple Affinity Removal System (figure 3.4, puits 3 et 4) et Beckman-Coulter ProteomeLab IgY Partitioning System (IgY-12) (figure

3.4, puits 6 et 7). Un autre point important, contrairement au ProteoExtract Removal kit, les protéines liées aux deux colonnes d'immunoaffinité pouvaient facilement être éluées, ce qui a permis d'observer que plusieurs autres protéines abondantes étaient effectivement enlevées (figure 3.4, puits 5 et 8). De façon réciproque, les fractions des protéines peu abondantes ont démontré une élimination nette de ces protéines (figure 3.4, puits 4 et 7). Tel qu'attendu, ces protéines de hauts poids moléculaires au-dessus de l'albumine étaient plus enrichies avec le ProteomeLab IgY Partitioning System, qui permet la déplétion des douze protéines les plus abondantes, qu'avec le Multiple Affinity Removal System qui permet la déplétion des six protéines les plus abondantes (figure 3.4, puits 4 et 7). Ces données illustrent la grande efficacité des méthodes d'affinité basées sur les anticorps dirigés contre les protéines les plus abondantes pour leur déplétion du plasma.

3.5 Analyse sur gel 2-D du plasma humain déplété en protéines abondantes

Étant donné que le ProteomeLab IgY Partitioning System était la méthode la plus efficace testée pour la déplétion des protéines abondantes du plasma, nous avons alors comparé la distribution des protéines sur gel 2-D du plasma brut et du plasma fractionné au moyen de cette méthode dans toutes les expériences suivantes. Lorsque des bandes de gel avec un large gradient de pH immobilisé, entre 3 et 10, ont été utilisées dans la première dimension afin d'obtenir une vue d'ensemble de la distribution des protéines totales du plasma, les résultats ont mis en évidence des différences marquées dans l'intensité et le nombre des protéines détectées dans la fraction du plasma déplété relativement au plasma brut et à la fraction des protéines abondantes (figure 3.5). De plus, l'analyse des gels 2-D des protéines du plasma dans ces conditions a démontré que la plupart des protéines migrent dans la partie acide des gels (figure 3.5). Ensuite, les bandes de gels avec un écart intermédiaire de pH, entre 4 et 7, ont été utilisées pour générer une vue plus en détail de la région acide. Tel qu'attendu, la résolution plus élevée avec des bandes de gel avec un écart intermédiaire de pH facilite la détection d'un plus grand nombre de protéines dans le plasma brut et fractionné (figure 3.6). Plus important, cette résolution améliorée permet de détecter plus de protéines

dans la fraction peu abondante comparativement au plasma brut (voir les ellipses à la figure 3.6).

La distribution sur gels 2-D des protéines peu abondantes du plasma séparées dans des écarts de pH 4 à 7 a aussi été comparée suite à l'élimination des protéines abondantes par les trois systèmes chromatographiques de déplétion. La distribution des protéines visualisées au moyen de la coloration Bleu brillant Coomassie Colloïdale (G-250) était variable dans l'écart 66-200 kDa pour les trois méthodes (figure 3.7). Tel qu'attendu, le nombre des protéines détectées était plus élevé dans cette région avec le ProteomeLab IgY Partitioning System comparativement aux autres méthodes (figure 3.7). Contrairement à ces autres méthodes, la colonne avec les anticorps IgY était également meilleure pour le retrait des protéines abondantes tel qu'illustré dans le cas des protéines trouvées à environ 25 kDa (voir les encadrés à la figure 3.7). Donc, le ProteomeLab IgY Partitioning System est une étape efficace de déplétion permettant d'augmenter la détection des protéines peu abondantes du plasma humain.

3.6 Comparaison de la distribution sur gels 2-D des protéines du plasma humain obtenue avec deux méthodes d'anticoagulants

Le sang contient de multiples cellules incluant les érythrocytes, les plaquettes, les leucocytes et autres cellules qui peuvent libérer certaines de leurs protéines dans le plasma lors de l'activation de la coagulation. La coagulation est une façon facile pour enlever certaines de ces cellules de même que le fibrinogène. Cependant, la coagulation induit aussi la déplétion d'autres protéines impliquées dans la coagulation sanguine de même que plusieurs autres types de protéines. (Adkins et coll., 2005). Donc, la libération de certaines protéines suite à l'activation cellulaire et la déplétion préférentielle de certaines protéines durant la préparation du sérum pourrait altérer la composition du sérum. Pour surmonter ces problèmes, nous avons comparé deux méthodes sans coagulation, EDTA et CTAD, cette dernière étant un mélange de citrate, théophylline, adénosine et dipyridole, pour la préparation du plasma avant la caractérisation des protéines par les gels 2-D. Des

distributions similaires de protéines sur gels 2-D ont été obtenues lorsque le plasma brut et les protéines abondantes ont été préparés avec les méthodes EDTA et CTAD (figure 3.8). De façon intéressante, la comparaison des distributions des protéines générées par les deux méthodes montre des différences dans l'intensité de certaines protéines présentes dans les fractions de protéines peu abondantes (figure 3.8). Bien que la plupart des protéines ont été trouvées en quantités équivalentes pour les deux méthodes, certaines étaient plus détectables dans le plasma préparé en présence de CTAD et d'autres étaient plus présentes dans les échantillons obtenus avec EDTA (figure 3.8). Donc, la méthode utilisée, CTAD ou EDTA, pour préparer le plasma semble influencer l'abondance relative des protéines du plasma isolées par immunoaffinité après le retrait des douze protéines majeures.

3.7 Le réactif hydroxyéthyl disulfide (DeStreak™) améliore la résolution des protéines durant l'électrophorèse des gels 2-D du plasma humain déplété des protéines abondantes

Étant donné la complexité du protéome du plasma, l'optimisation de la séparation des protéines est primordiale. Le réactif hydroxyéthyl disulfide (DeStreak™), en oxydant les groupes cystéinyles des protéines, empêche la formation des ponts disulfures (Pennington et coll., 2004). L'avantage du réactif hydroxyéthyl disulfide sur les agents réducteurs est la déplétion de ces derniers dans une région de pH alcalin résultant en une reformation des ponts disulfures inter et intramoléculaires (Pennington et coll., 2004). Donc, le réactif hydroxyéthyl disulfide est habituellement ajouté au tampon de solubilisation pour réduire les stries horizontales des protéines basiques dans les gradients de pH alcalins lors de la focalisation isoélectrique. La capacité du réactif hydroxyéthyl disulfide de stabiliser les groupes cystéinyles des protéines suggère que ce réactif pourrait aussi améliorer la reproductibilité des gels 2-D des protéines du plasma en diminuant la formation des traînées ou en formant des points de protéines d'une meilleure définition. Pour tester ces possibilités, les protéines peu abondantes obtenues à la suite de la déplétion du plasma des protéines majeures par le fractionnement au moyen de la colonne d'affinité IgY-12 ont été déposées sur des bandes IPG avec une solution de réhydratation contenant ou non 1,2% de DeStreak™.

Même dans la région acide de gradient de pH de 4 à 7, l'apparence des points de protéines était plus définie en présence qu'en l'absence de DeStreak™ (figure 3.9). Ces observations indiquent que DeStreak™, en modifiant les groupes thiols présents dans les protéines, améliore la fiabilité et la qualité de la distribution sur gels 2-D des protéines peu abondantes du plasma.

3.8 Comparaison de différentes méthodes de coloration des gels 2-D du plasma humain déplété des protéines abondantes

La visualisation des protéines peu abondantes du plasma est une étape clé pour la cartographie de la distribution des protéines sur gels 2-D ainsi que pour leur identification par spectrométrie de masse. Plusieurs méthodes de coloration de protéines ont été testées pour leur capacité à détecter les protéines peu abondantes du plasma récoltées dans la fraction des protéines non liées de la colonne d'affinité IgY-12 et analysées par gels 2-D. Les protéines ont été colorées au colloïdal CBB G-250 étant donné que cette coloration est utilisée pour sa commodité sur une base routinière dans les études protéomiques. Deux colorations fluorescentes des protéines, Sypro Ruby et Deep Purple, ont aussi été comparées. Tel qu'attendu, Deep Purple était plus sensible que Sypro Ruby et le colloïdal CBB en montrant une coloration plus intense des points de protéines (figure 3.10). Cependant, certaines protéines reconnues à la fois par le colloïdal CBB et le Sypro Ruby étaient faiblement détectées par Deep Purple (figure 3.10). La coloration au nitrate d'argent est communément utilisée pour visualiser les protéines car sa limite de détection est de l'ordre du faible nanogramme. Une préoccupation majeure à propos de la coloration au nitrate d'argent est que cette technique est souvent considérée comme modifiant les protéines de façon covalente ce qui pourrait interférer avec l'analyse subséquente au spectromètre de masse. Ici, une procédure de coloration à l'argent compatible avec la spectrométrie de masse et sensible (Shevchenko et coll., 1996) a permis de détecter les protéines du plasma dans la fraction peu abondante. Il est clair que cette méthode est beaucoup plus sensible que le colloïdal CBB, Sypro Ruby et Deep Purple (figure 3.10). En particulier, plusieurs protéines ayant des poids moléculaires plus faibles que 45 kDa sont uniquement détectées par cette méthode de

coloration à l'argent (figure 3.10). Donc, la procédure de coloration à l'argent pourrait être utile pour détecter les protéines sous forme de traces tandis que la coloration fluorescente au Deep Purple pourrait être plus appropriée et fiable pour quantifier les protéines du plasma.

3.9 Analyse sur gel 2-D de l'oxydation des protéines abondantes, et peu abondantes fractionnées par la colonne d'affinité IgY-12 et du plasma brut

La séparation des protéines oxydées du plasma brut, de la fraction abondante et peu abondante sur gels 2-D dans un écart de pH 4 à 7, permet de vérifier les variations des niveaux d'oxydation et du nombre de protéines oxydées et l'enrichissement des protéines oxydées dans la fraction des protéines peu abondantes du plasma. La figure 3.11 montre l'immunodétection des protéines oxydées et les protéines colorées sur les membranes de PVDF des protéines totales du plasma, des protéines abondantes du plasma et des protéines peu abondantes du plasma. Les encadrés des figures 3.11 A, C et E des protéines oxydées des protéines totales, abondantes et peu abondantes du plasma se situent majoritairement du côté acide des gels 2-D. Ces protéines fortement oxydées sont surtout présentes dans les protéines plasmatiques abondantes. D'autre part, il y a enrichissement des protéines oxydées peu abondantes du plasma du côté basique du gel 2-D de la figure 3.11 E par rapport aux figures 3.11 A et C tel que le montrent les ellipses. Ces ellipses mettent également en évidence une augmentation de l'intensité de l'oxydation de certaines des protéines peu abondantes comparativement aux protéines abondantes. Il est à remarquer que les régions sur les films où l'intensité des protéines oxydées est la plus élevée sont distinctes des régions des membranes PVDF où le nombre de protéines est plus abondant.

3.10 Analyse sur gel 2-D de l'oxydation des protéines peu abondantes du plasma de deux individus fractionné par la colonne d'affinité IgY-12

La séparation des protéines oxydées de la fraction peu abondante du plasma sur gels 2-D de deux individus féminins, dans un écart de pH 3 à 10, permet de comparer les variations de l'oxydation des protéines peu abondantes entre ces deux individus. L'immunodétection des

protéines oxydées (figures 3.12 A et C), plus particulièrement les régions délimitées par les boîtes, démontre une grande variabilité entre les niveaux des protéines oxydées des deux personnes. Il faudra tenir compte de ce phénomène lors de la recherche de marqueurs tumoraux. Les boîtes montrent toutefois que les protéines oxydées se situent majoritairement du côté acide de l'écart de pH dans les deux cas. Les ellipses de la figure 3.12 montrent des variations dans le nombre de protéines oxydées entre les deux personnes. Donc, l'oxydation des protéines peu abondantes du plasma semble varier d'un individu à l'autre lors de la séparation des protéines sur gels 2-D.

Puisque la majorité des protéines plasmatiques peu abondantes et oxydées sont acides, leur séparation dans un écart de pH 4 à 7, permet de mieux comparer les variations dans le nombre et la distribution de ces protéines oxydées. L'immunodétection des protéines oxydées de la fraction peu abondante du plasma révèle que l'intensité de l'oxydation est très variable d'une personne à l'autre, ce que les encadrés mettent particulièrement en évidence (figures 3.13 A et C). Ces encadrés montrent également que les protéines oxydées sont situées majoritairement dans le secteur acide de l'écart de pH. Le niveau de protéines oxydées immunodétectées dans l'échantillon provenant de l'individu #2 (figure 3.13 C) est plus élevé que dans l'échantillon de l'individu #1 (figure 3.13 A), et ce, autant dans la région basique que dans la région acide. La coloration des membranes de PVDF a permis de démontrer que le profil de distribution protéique est similaire entre les deux individus (figures 3.13 B et D).

3.11 Effet de la prise d'aliments anticancéreux sur le niveau d'oxydation des protéines peu abondantes du plasma fractionné par la colonne d'affinité IgY-12 et analysé sur gels 2-D dans un écart de pH de 4 à 7

L'analyse de l'effet antioxydant des aliments anticancéreux au niveau du plasma humain s'effectue par l'immunodétection des protéines oxydées dans la fraction peu abondante du plasma. Cette analyse met en évidence que la consommation d'aliments anticancéreux diminue le niveau général d'oxydation des protéines peu abondantes (figures 3.14 A, C et E). En fait, en comparant les boîtes des temps 0 (figure 3.14 A), 6 (figure 3.14 C) et 27 heures

(figure 3.14 E), une diminution de l'oxydation des protéines est observée, particulièrement dans la région acide des films. Cependant, la figure 3.14 E montre une légère hausse de l'oxydation à 27 heures dans la région acide par rapport à 6 heures, tout en restant légèrement plus faible que les protéines oxydées du côté acide du temps 0 (figure 3.14 A). Ce phénomène est probablement dû au fait qu'une nuit sépare les consommations d'aliments anticancéreux du souper et du déjeuner. Le sang a été prélevé trois heures après la consommation d'aliments anticancéreux du matin (temps 27 heures). Une comparaison des encadrés de la région basique des films (figures 3.14 A, C et E) montre une diminution graduelle de l'oxydation des protéines sans légère hausse de l'oxydation au temps 27 heures, contrairement à ce qui est constaté dans la région acide (figure 3.14 E). La coloration des membranes de PVDF permet de constater que le profil des protéines des temps 0, 6 et 27 heures sont similaires tandis que les variations sont constatées au niveau de l'oxydation des protéines. Il est à noter que les régions des films où l'oxydation est particulièrement intense ne correspondent pas à celles des membranes PVDF où les protéines sont particulièrement abondantes.

3.12 Effet de la prise d'aliments anticancéreux sur le niveau d'oxydation des protéines abondantes du plasma fractionné par la colonne d'affinité IgY-12 et analysé sur gels 2-D dans un écart de pH de 4 à 7

L'immunodétection des protéines oxydées dans la fraction des protéines abondantes du plasma d'un individu ayant consommé une série d'aliments anticancéreux a révélé une variation du niveau d'oxydation des protéines au cours du protocole. En fait, en comparant les encadrés des temps 0 (figure 3.15 A), 6 (figure 3.15 C) et 27 heures (figure 3.15 E), une diminution de l'oxydation générale des protéines est observée. Toutefois, la figure 3.15 E montre une légère hausse de l'oxydation au temps 27 heures dans la région basique du film par rapport au temps 6 heures (figure 3.15 C), tout en restant légèrement plus faible pour les protéines oxydées du côté basique du temps 0 (figure 3.15 A). Les ellipses à 27 heures montrent la présence supplémentaire de quelques protéines oxydées comparativement aux temps 0 et 6 heures (figures 3.15 A, C et E). Le fait qu'une nuit sépare les consommations

d'aliments anticancéreux pourrait expliquer ces différences de l'oxydation. Ainsi, le prélèvement sanguin au temps 6 heures a été précédé par deux consommations d'aliments, l'une directement après le temps 0 et l'autre 3 heures après le temps 0. Pour le temps à 27 heures, le sang a été prélevé trois heures après la consommation d'aliments anticancéreux le lendemain matin. La coloration des membranes de PVDF permet de constater que le profil des protéines des temps 0, 6 et 27 heures est similaire au niveau de la distribution et du nombre de protéines tandis que les régions des films où l'oxydation est importante ne correspondent pas aux régions des membranes PVDF où les protéines sont abondantes.

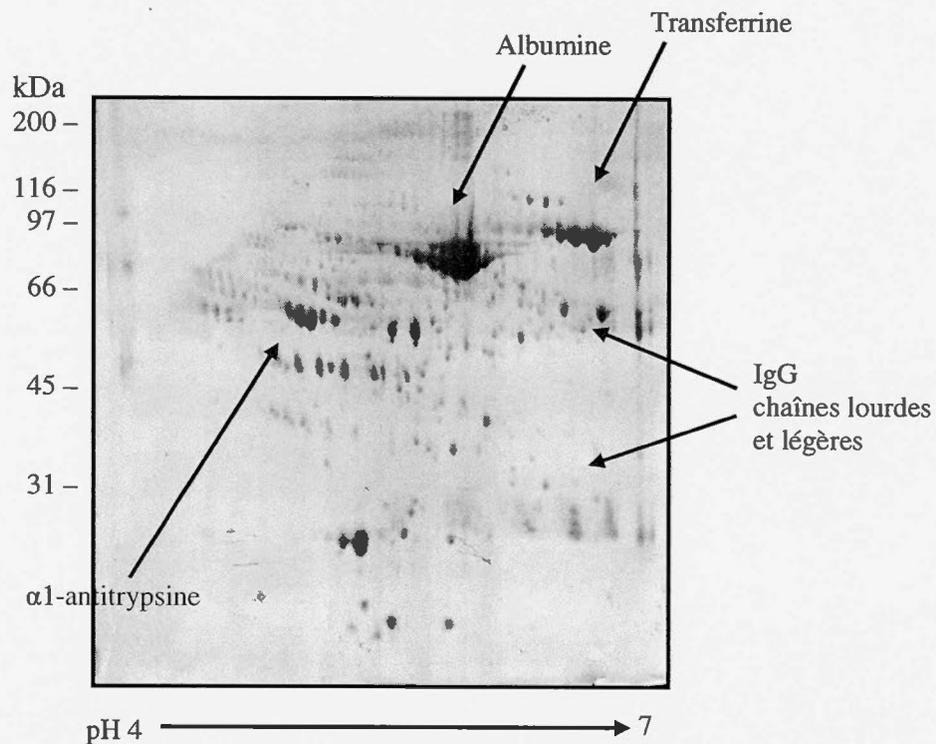


Figure 3.1. Gel 2-D des protéines totales du plasma. Les protéines du plasma brut (500 ug) sont focalisées en première dimension selon leurs pI dans un écart de pH de 4 à 7, 18 cm, et sont ensuite séparées en seconde dimension par SDS-PAGE. Le gel est coloré avec CBB colloïdal. Les flèches représentent certaines protéines abondantes du plasma.

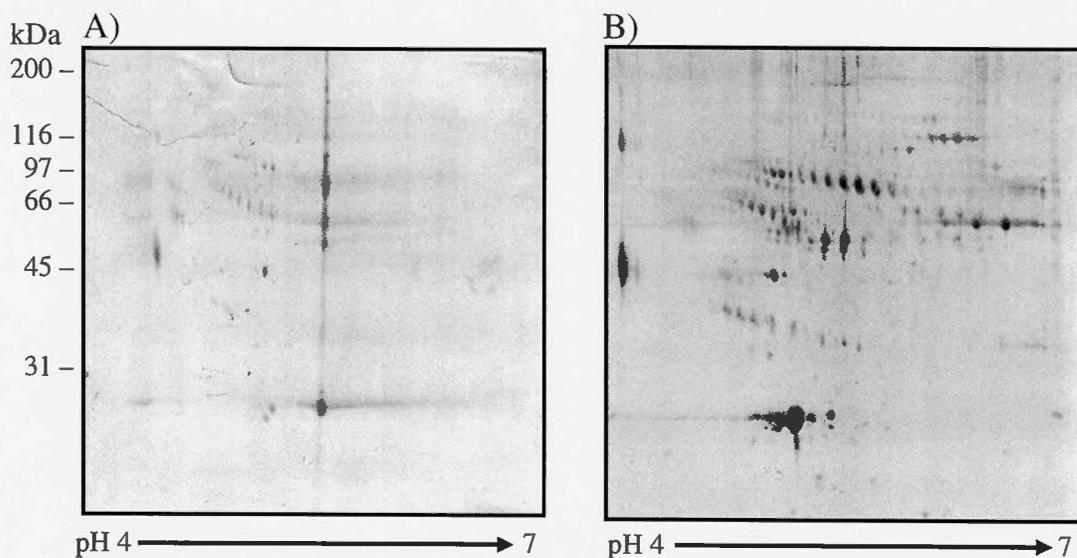


Figure 3.2. Mise au point des gels 2-D grand format après déplétion du plasma humain par la colonne d'affinité The Agilent Multiple Affinity Removal System suivie par l'enlèvement des sels et autres substances interférentes dans les échantillons. Les protéines de la fraction peu abondante du plasma du gel A (240 μg) et celles du gel B (240 μg) ont été focalisées en première dimension selon leurs pI dans un écart de pH 4 à 7, 18 cm, et séparées en seconde dimension selon leurs poids moléculaires par SDS-PAGE. Les gels ont été colorés au CBB colloïdal (G-250). Ces données sont représentatives de deux expériences indépendantes. Contrairement aux protéines peu abondantes du plasma vues en A, celles en B ont été lavées à l'eau nanopure et concentrées dans un tube Millipore spin concentrators, 5 kDa MWCO, 4 mL, avant dépôt sur gel.

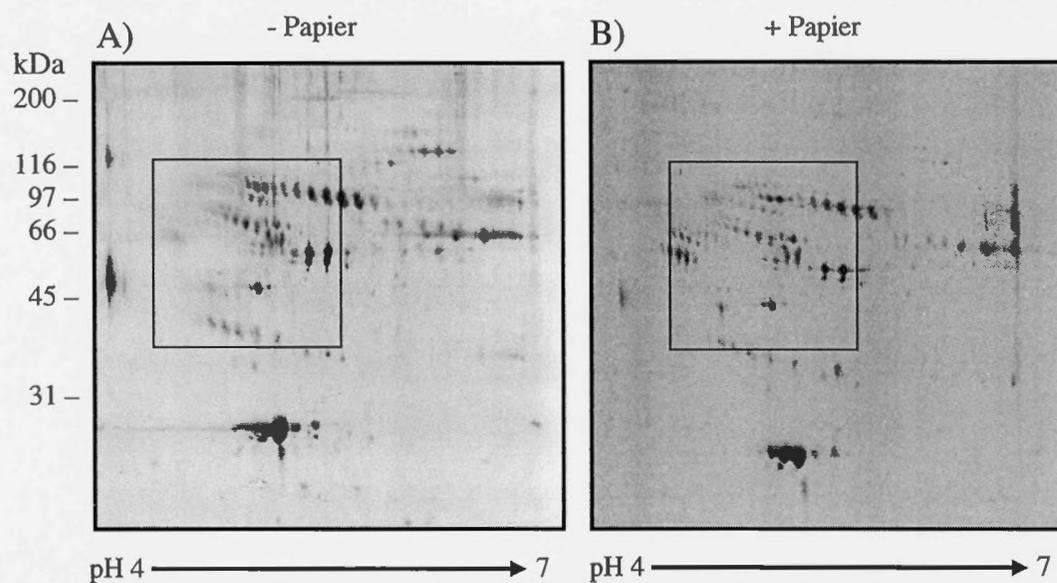


Figure 3.3. Mise au point des gels 2-D grand format par l'ajout de papiers buvards sur les électrodes lors de la focalisation isoélectrique après déplétion du plasma humain par la colonne d'affinité The Agilent Multiple Affinity Removal System. Les protéines de la fraction peu abondante du plasma du gel A (240 μg) et celles du gel B (240 μg) ont été focalisées en première dimension avec (+papier) ou sans papier buvard (-papier) selon leurs pI dans un écart de pH 4 à 7, 18 cm, et ont ensuite été séparées en seconde dimension selon leurs poids moléculaires par SDS-PAGE. Les gels ont été colorés au CBB colloïdal (G-250). Ces données sont représentatives de deux expériences indépendantes. L'encadré de la figure illustre une région du gel avec une résolution accrue des protéines en présence de papier buvard.

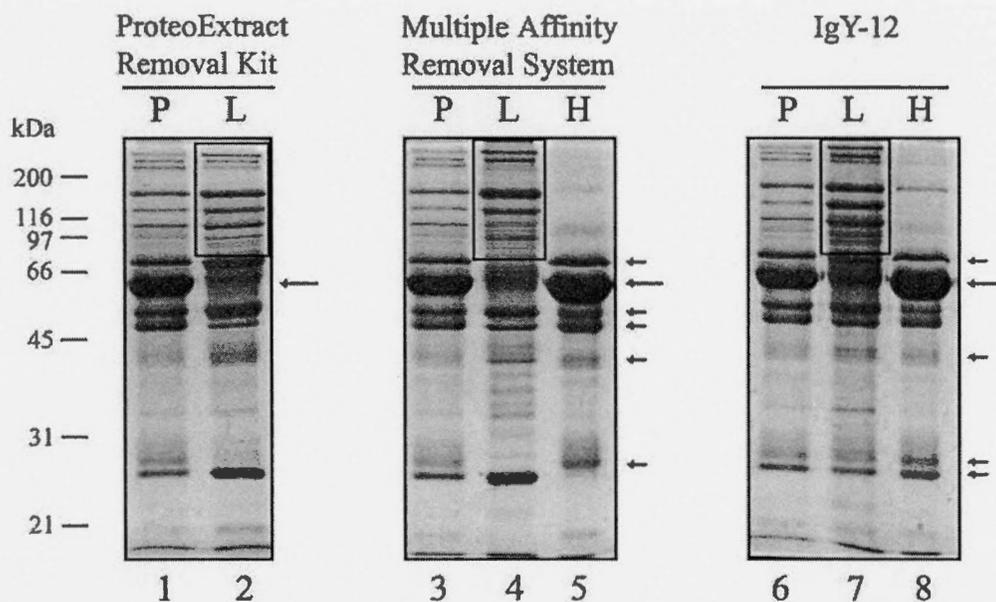


Figure 3.4. Analyse comparative par SDS-PAGE de différentes méthodes pour enlever les protéines abondantes du plasma. La déplétion des échantillons de plasma de leurs protéines abondantes a été effectuée en utilisant trois colonnes différentes : ProteoExtract Removal kit de Calbiochem, Multiple Affinity Removal System de Agilent et ProteomeLab IgY Partitioning System (IgY-12) de Beckman Coulter. Les protéines de la fraction non liée à la colonne ont été récoltées. Les protéines liées aux colonnes d'affinité ont ensuite été éluées. Les concentrations des protéines ont été mesurées dans toutes les fractions et 50 μ g de protéines du plasma brut (P), des protéines peu abondantes du plasma (L) et des protéines abondantes du plasma (H) ont été déposées et séparées par SDS-PAGE. Les protéines ont été visualisées par coloration CBB colloïdal. Ces données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les flèches longues indiquent l'albumine, les flèches courtes montrent les protéines abondantes du plasma et les boîtes sont les exemples des régions enrichies en protéines peu abondantes du plasma.

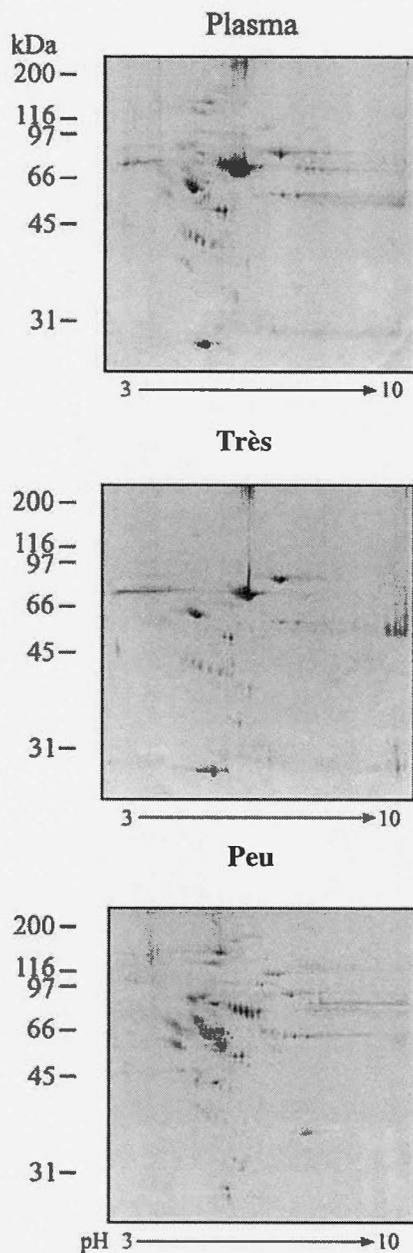


Figure 3.5. Analyse de la séparation des protéines du plasma par gels 2-D avec un large écart de pI. Les protéines du plasma ont été fractionnées en utilisant la colonne d'affinité IgY-12. Les protéines (180 µg) du plasma brut (Plasma), de la fraction des protéines abondantes du plasma (Très) et de la fraction enrichie en protéines peu abondantes (Peu) ont été focalisées en première dimension selon leurs pI dans un écart de pH 3 à 10, 18 cm, et ensuite ont été séparées en seconde dimension selon leurs poids moléculaires par SDS-PAGE. Les gels ont été colorés au CBB colloïdal. Ces données sont représentatives de trois expériences indépendantes.

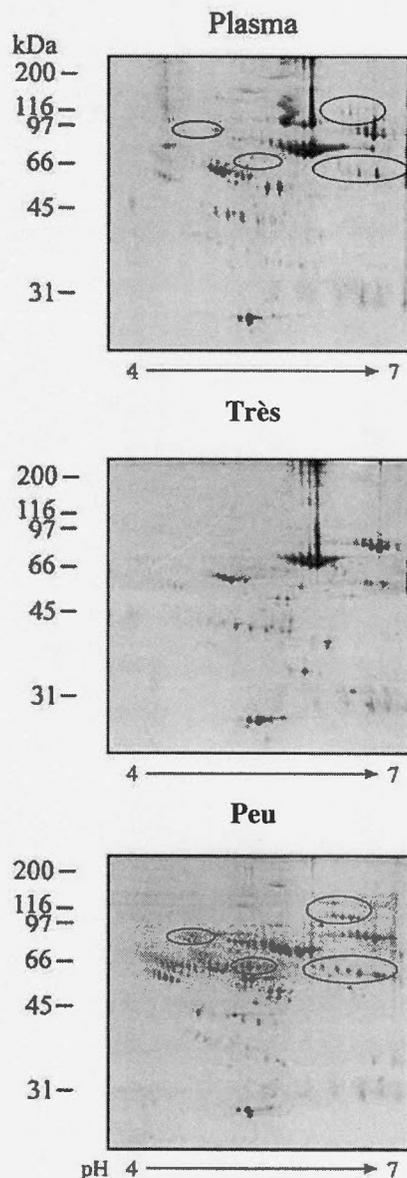


Figure 3.6. Analyse de la séparation des protéines du plasma humain par gels 2-D avec un écart intermédiaire de pI. Les protéines du plasma ont été fractionnées en utilisant la colonne d'affinité IgY-12. Les protéines (180 μ g) du plasma brut (Plasma), de la fraction contenant les protéines abondantes du plasma (Très) et la fraction enrichie en protéines peu abondantes du plasma (Peu) ont été focalisées en première dimension selon leurs pI dans un écart de pH de 4 à 7, 18 cm, et ensuite les protéines ont été séparées en deuxième dimension selon leurs poids moléculaires par SDS-PAGE. Les gels ont été colorés au CBB colloïdal. Ces données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les ellipses sont les exemples de régions montrant des différences marquées du nombre de protéines enrichies dans la fraction peu abondante.

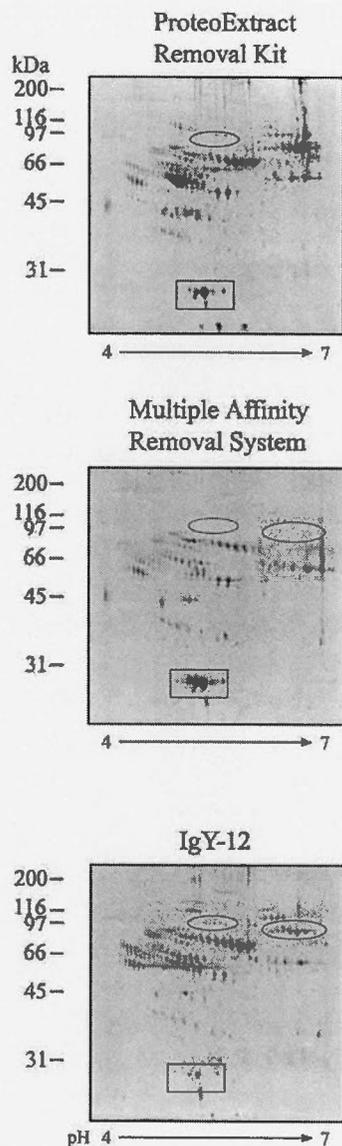


Figure 3.7. Gels d'électrophorèse 2-D des protéines du plasma humain suite à la déplétion des protéines abondantes du plasma par diverses colonnes d'affinité. Les échantillons de plasma (30 μ L) sont déplétés par différentes colonnes d'affinité : ProteoExtract Removal kit, Multiple Affinity Removal System et ProteomeLab IgY Partitioning System (IgY-12). Les protéines non liées présentes dans les fractions du volume d'élution ont été focalisées selon leurs pI dans un écart de pH de 4 à 7, 18 cm, et ensuite séparées par SDS-PAGE. Les gels sont colorés avec CBB colloïdal pour révéler les protéines enrichies du plasma. Ces données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les ellipses sont les régions montrant des différences marquées dans le nombre de protéines. Les encadrés sont des régions présentant des différences dans l'efficacité de la déplétion des protéines migrant à environ 25 kDa.

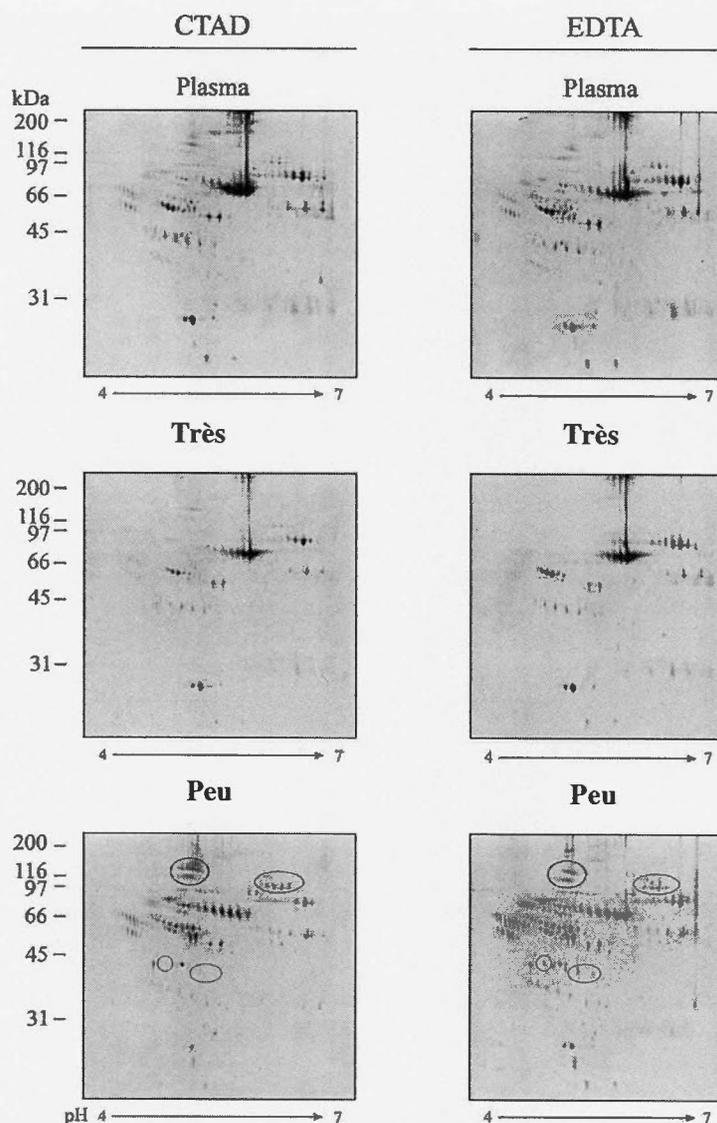


Figure 3.8. Comparaison de la distribution sur gels 2-D des protéines du plasma humain préparées selon deux méthodes d'anticoagulants. Le sang veineux a été récolté dans des tubes Vacutainer contenant du EDTA ou du CTAD comme anticoagulants. Les protéines du plasma ont été fractionnées en utilisant la colonne d'affinité IgY-12 pour extraire les protéines abondantes du plasma. Les protéines (180 μ g) du plasma brut (Plasma), les protéines abondantes du plasma (Très) ou les protéines peu abondantes du plasma (Peu) ont été focalisées selon leurs pI avec un écart de pH de 4 à 7, 18 cm, et ensuite séparées selon leurs poids moléculaires par SDS-PAGE. Les protéines sont colorées avec CBB colloïdal. Ces données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les ellipses représentent les régions montrant des différences dans le nombre de protéines ou l'intensité de protéines.

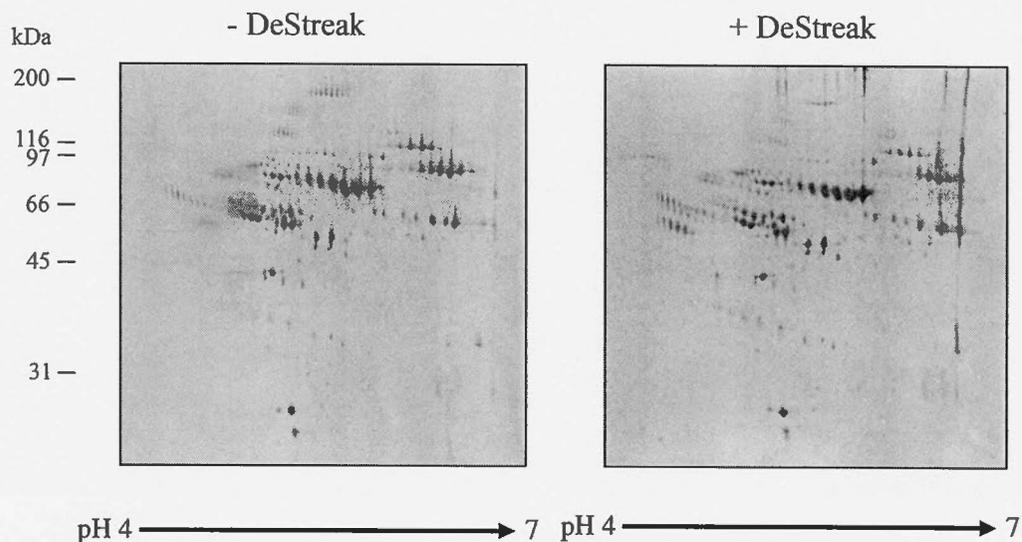


Figure 3.9. Effet du réactif DeStreak™ sur la résolution des protéines durant l'électrophorèse 2-D du plasma humain déplété des protéines abondantes. Les protéines peu abondantes ont été obtenues du plasma (30 μ L) par déplétion des protéines majeures présentes dans le plasma par fractionnement avec la colonne d'affinité IgY-12. Ces protéines enrichies ont été déposées sur les bandes de gel IPG avec un écart de pH de 4 à 7, 18 cm, en l'absence (- DeStreak) ou en présence (+ DeStreak) de 1,2% DeStreak™ dans la solution de réhydratation du gel avant la première dimension. La séparation en seconde dimension a été effectuée par SDS-PAGE. Les protéines sont visualisées par coloration au CBB colloïdal. Ces données sont représentatives de trois expériences indépendantes.

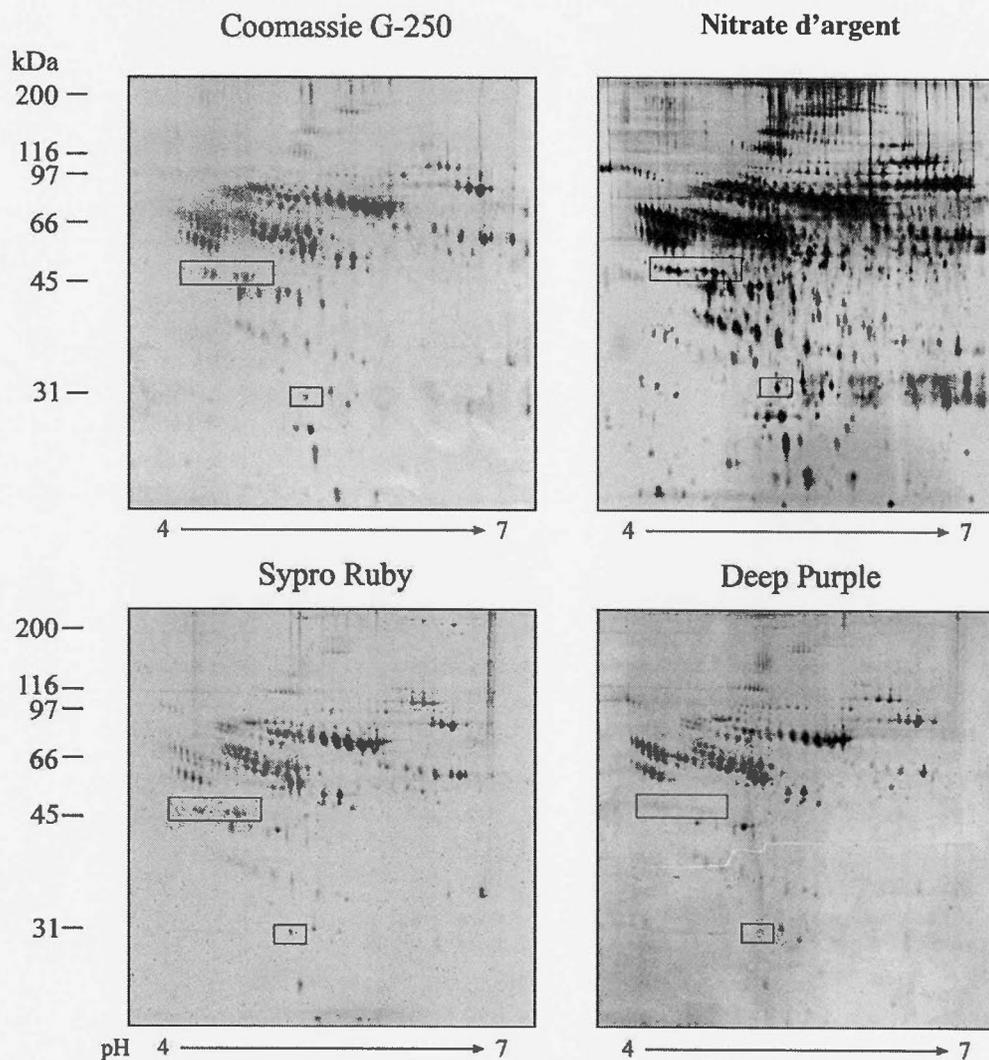


Figure 3.10. Comparaison de différentes méthodes de coloration des gels 2-D pour révéler la distribution des protéines du plasma humain déplété des protéines abondantes. Le plasma (30 μ L) est fractionné avec la colonne d'affinité IgY-12 pour la déplétion des protéines abondantes. Les protéines non liées à la colonne ont été analysées par gels 2-D en les focalisant en première dimension selon leurs pI dans un écart de pH de 4 à 7, 18 cm, et en les séparant selon leurs poids moléculaires sur SDS-PAGE. Les gels ont été colorés par CBB colloïdal, le nitrate d'argent, le Sypro Ruby et le Deep Purple tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Ces données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les boîtes sont des exemples des régions montrant des différences dans le nombre de protéines et l'intensité des protéines.

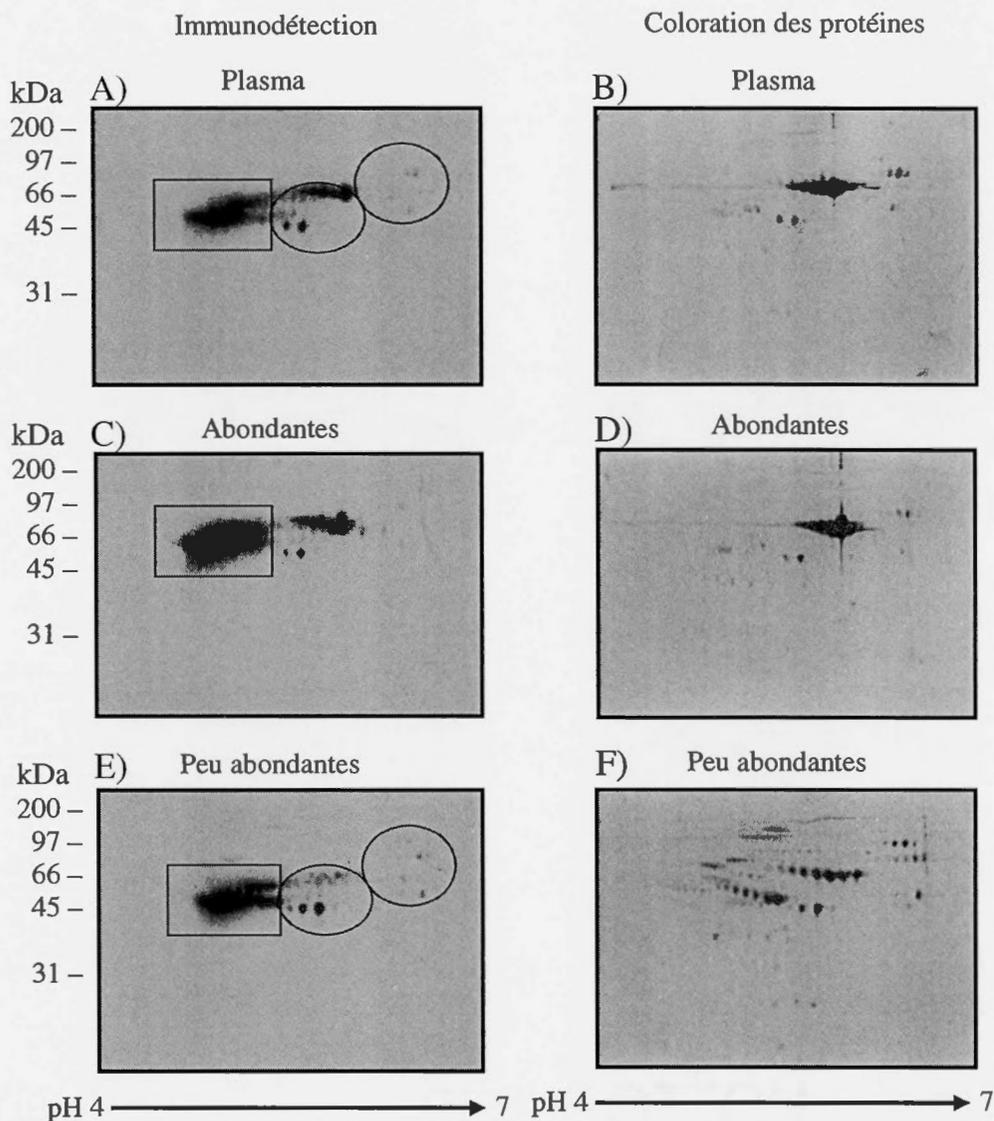


Figure 3.11. Analyse sur gels 2-D de l'oxydation des protéines abondantes, et peu abondantes fractionnées par la colonne d'affinité IgY-12 et du plasma brut. 30 μg de protéines du plasma brut, abondantes et peu abondantes du plasma ont été séparées selon leurs pI dans un écart de pH de 4 à 7, en première dimension, 7 cm, et en seconde dimension par SDS-PAGE. La dérivation des protéines par la liaison de DNPH s'effectue après la première dimension. L'immunodétection (A, C et E) s'effectue avec l'anticorps anti-DNP tel que décrit dans le protocole de OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit. Les membranes PVDF (B, D et F) sont colorées au CBB (R-250). Les boîtes indiquent les régions où se retrouvent la majorité des protéines oxydées. Les ellipses indiquent l'enrichissement et l'augmentation de l'intensité de certaines protéines dans la fraction peu abondante relativement au plasma total. Ces données proviennent d'une expérience.

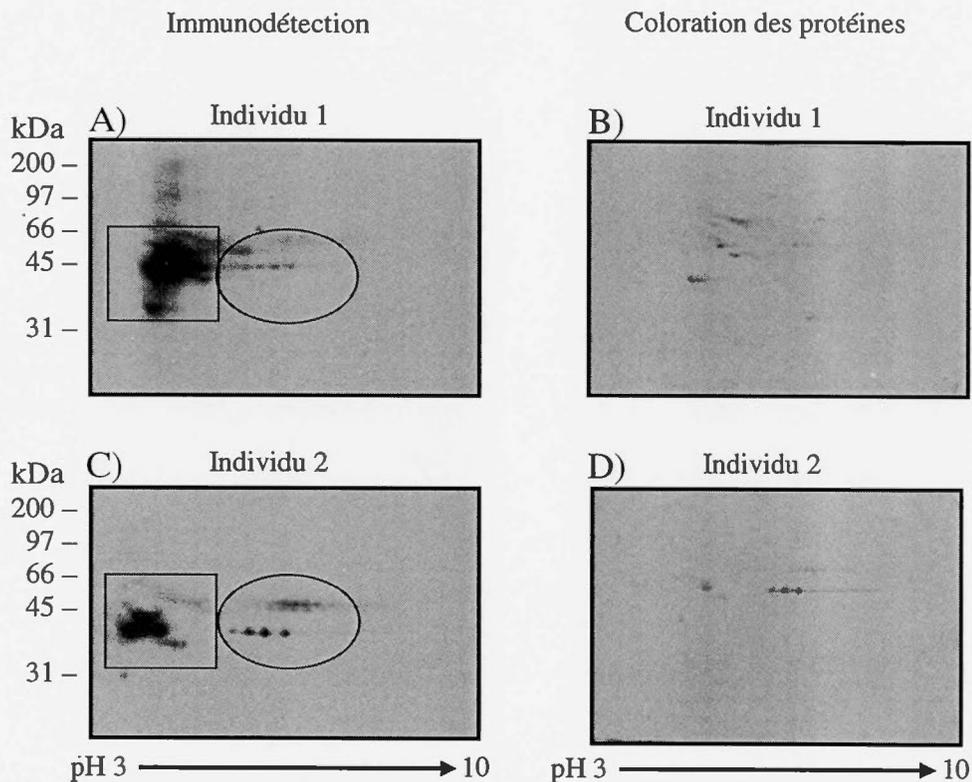


Figure 3.12. Analyse sur gels 2-D de l'oxydation des protéines peu abondantes du plasma de deux individus dans un écart de pH de 3 à 10. Le fractionnement du plasma en protéines abondantes et peu abondantes est effectué par la colonne d'affinité IgY-12. 30 μ g des protéines peu abondantes du plasma ont été séparées selon leurs pI dans un écart de pH de 3 à 10 en première dimension, 7 cm, et en seconde dimension par SDS-PAGE. La dérivatisation des protéines par la liaison de DNPH s'effectue après la première dimension. L'immunodétection (A et C) s'effectue avec l'anticorps anti-DNP tel que décrit dans le protocole de OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit. Les membranes PVDF (B et D) sont colorées au CBB (R-250). Les encadrés indiquent les régions où se trouvent la majorité des protéines oxydées. Les ellipses désignent un secteur où l'oxydation des protéines est variable entre les deux individus. Ces données proviennent d'une expérience.

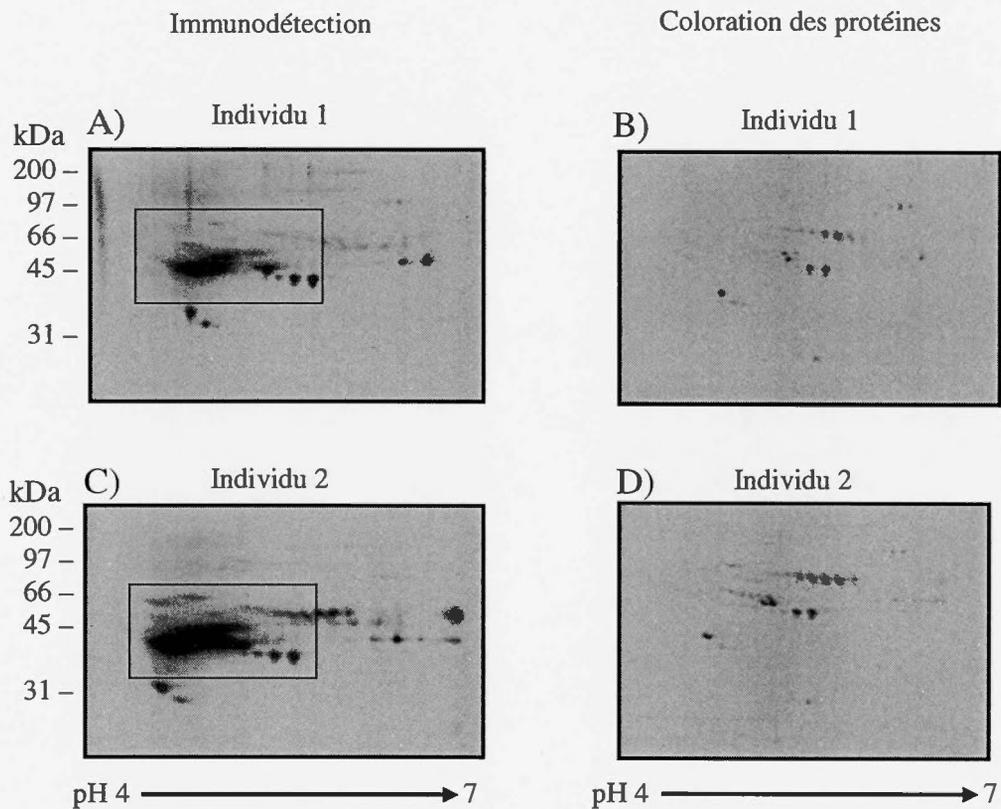


Figure 3.13. Analyse sur gels 2-D de l'oxydation des protéines peu abondantes du plasma de deux individus dans un écart de pH de 4 à 7. Le fractionnement du plasma en protéines abondantes et peu abondantes est effectué par la colonne d'affinité IgY-12. 30 μ g des protéines peu abondantes du plasma ont été séparées selon leurs pI dans un écart de pH de 4 à 7 en première dimension, 7 cm, et en seconde dimension par SDS-PAGE. La dérivation des protéines par la liaison de DNP s'effectue après la première dimension. L'immunodétection (A et C) s'effectue avec l'anticorps anti-DNP tel que décrit dans le protocole de OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit. Les membranes PVDF (B et D) sont colorées au CBB (R-250). Les boîtes indiquent les régions où se trouvent la majorité des protéines oxydées. Ces données proviennent d'une expérience.

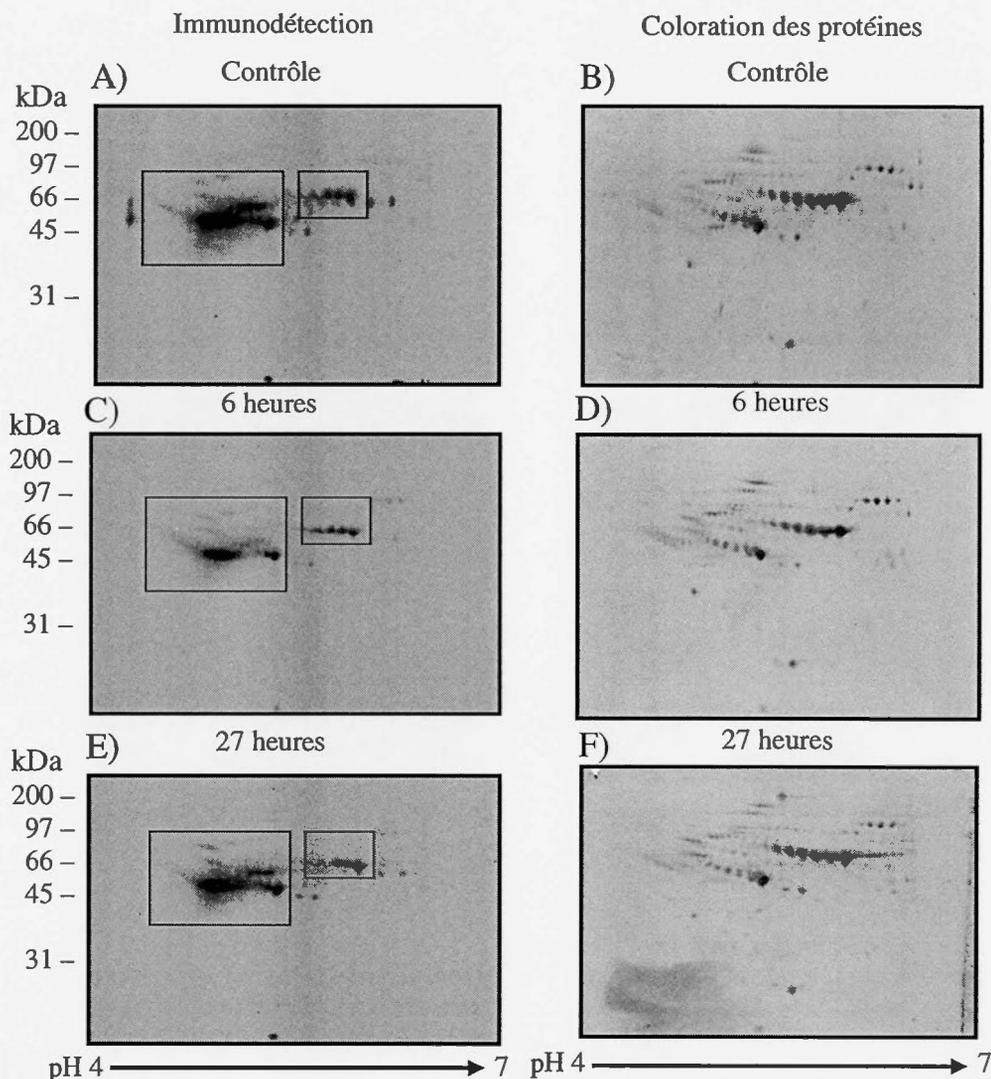


Figure 3.14. Effet de la prise d'aliments anticancéreux sur le niveau d'oxydation des protéines peu abondantes du plasma analysées sur gels 2-D dans un écart de pH de 4 à 7. 125 mL d'un extrait d'épinards, brocolis, navets et choux de Bruxelles, 125 mL d'un extrait de fraises, bleuets, et canneberges, 40 gr de chocolat noir et une tasse de thé vert japonais sont consommés à jeun. Le sang est prélevé aux temps indiqués puis les plasmas sont préparés. Le fractionnement est effectué par la colonne d'affinité IgY-12. 30 μ g de protéines peu abondantes sont séparées selon leurs pI dans un écart de pH de 4 à 7, 7 cm, et par SDS-PAGE. La dérivation des protéines s'effectue après la première dimension. L'immunodétection (A, C et E) s'effectue avec l'anticorps anti-DNP tel que décrit dans le protocole de OxyBlot™. Les membranes PVDF (B, D et F) sont colorées au CBB (R-250). Les boîtes montrent les niveaux d'oxydation des protéines peu abondantes après la consommation d'aliments anticancéreux. Ces données sont issues d'une expérience.

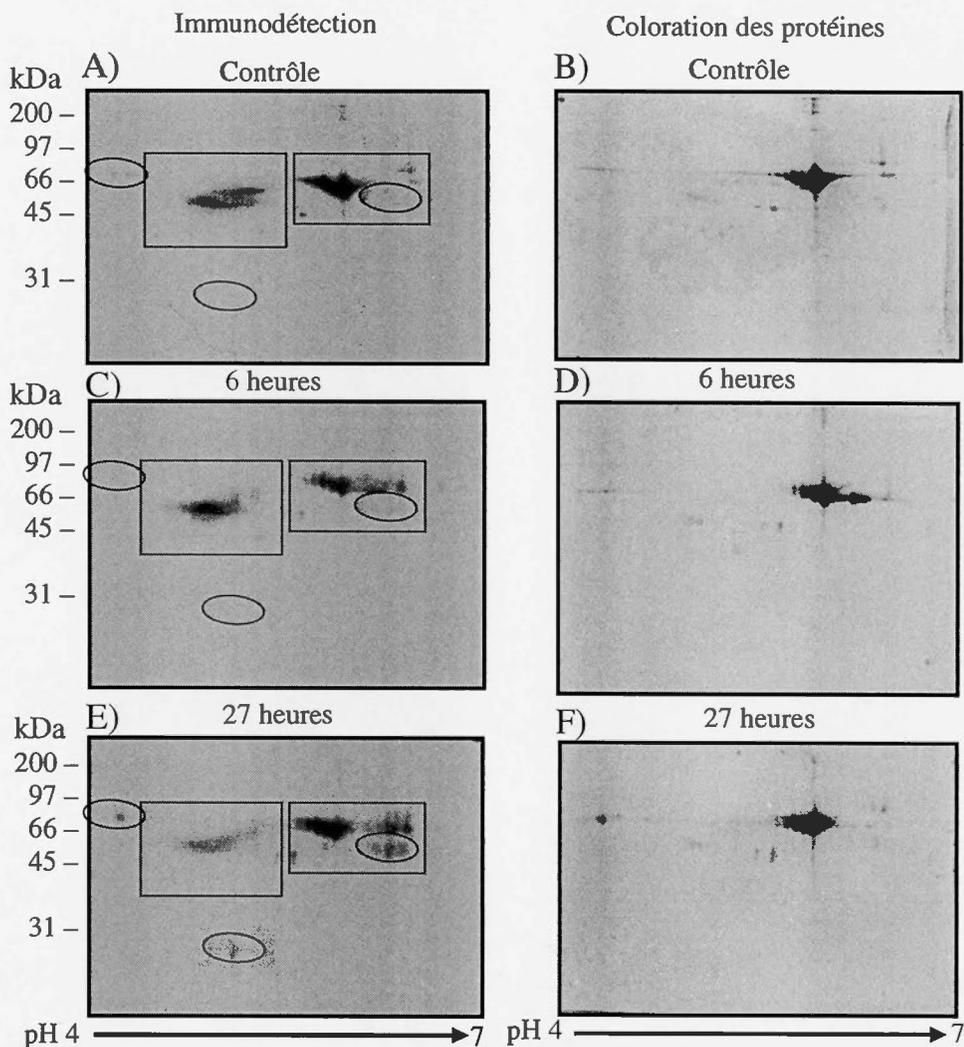


Figure 3.15. Effet de la prise d'aliments anticancéreux sur le niveau d'oxydation des protéines abondantes du plasma analysées sur gels 2-D dans un écart de pH de 4 à 7. 125 mL d'un extrait d'épinards, brocolis, navets et choux de Bruxelles, 125 mL d'un extrait de fraises, bleuets, et canneberges, 40 gr de chocolat noir et une tasse de thé vert japonais sont consommés à jeun. Le sang est prélevé aux temps indiqués puis les plasmas sont préparés. Le fractionnement des plasmas est effectué par la colonne d'affinité IgY-12. 30 µg de protéines abondantes sont séparées selon leurs pI dans un écart de pH de 4 à 7 en première dimension, 7 cm, et en seconde dimension par SDS-PAGE. La dérivation des protéines s'effectue après la première dimension. L'immunodétection s'effectue avec l'anticorps anti-DNP tel que décrit dans le protocole de OxyBlot™ (A, C et E). Les membranes PVDF sont colorées au CBB (R-250) (B, D et F). Les boîtes montrent les niveaux d'oxydation des protéines abondantes après la consommation d'aliments anticancéreux. Les ellipses indiquent la hausse de l'oxydation de certaines protéines (E). Ces données proviennent d'une expérience.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Plasma humain en tant que matériel de recherche

La découverte de marqueurs tumoraux sériques est un enjeu crucial de la recherche sur le cancer du sein et des ovaires et un projet important de Génome Québec qui a subventionné notre étude de déplétion du plasma humain et de mise au point des gels bidimensionnels dans le cadre de leur vaste recherche sur les biomarqueurs du cancer du sein et des ovaires. D'autre part, l'apport nutrathérapeutique quotidien d'aliments sains constitués de fruits et de légumes, de chocolat noir, de thé vert japonais fait également partie de l'arsenal mis en place pour combattre ce fléau qu'est le cancer.

Le plasma humain étant facilement obtenu, plusieurs laboratoires ont développé différentes stratégies protéomiques dans le but d'utiliser les protéines du plasma comme une source de biomarqueurs reliés à différentes maladies. Cependant, l'identification de biomarqueurs est compliquée par la grande variété des types de protéines ajoutée à l'échelle dynamique élevée des concentrations de protéines dans le plasma.

L'inconvénient majeur du plasma sanguin est la présence de protéines abondantes qui empêche l'analyse et l'identification de protéines peu abondantes du plasma (voir la figure 1.1). La difficulté de l'analyse du plasma réside dans le fait que les marqueurs tumoraux ne sont probablement pas présents en très grand nombre dans le plasma sanguin. Le but ultime étant de détecter de façon précoce le cancer, la découverte d'un biomarqueur du cancer dans le plasma implique possiblement une concentration minimale d'une protéine. Le protéome du plasma humain comprend la plupart sinon la totalité des protéines humaines de même que les protéines dérivées de certains virus, bactéries et champignons. La plupart des protéines humaines sont introduites dans le plasma à la suite de fuites, à des niveaux très faibles, des

tissus organiques et ces protéines sont en conséquence présentes à de faibles concentrations (<<pg/mL) tandis que d'autres protéines, telles que l'albumine, sont présentes à de fortes concentrations (>>mg/mL). De nombreuses modifications post-traductionnelles transforment aussi ces protéines (Anderson et coll., 2004).

Dans l'optique de contribuer au développement de stratégies protéomiques visant à prévenir le cancer et à le détecter de façon précoce, notre équipe a déterminé la méthode la plus efficace pour la déplétion des protéines abondantes du plasma brut et la méthode de coloration la plus sensible des gels 2-D pour révéler les protéines peu abondantes du plasma afin d'obtenir des gels 2-D reproductibles pour l'analyse et l'identification des protéines (par spectrométrie de masse), dans le but de découvrir des marqueurs tumoraux. Notre équipe a également étudié les modifications post-traductionnelles des protéines du plasma, telles que l'oxydation, pour accroître les chances de découvrir les marqueurs tumoraux ou un profil protéique révélant la présence d'un cancer. Enfin, notre équipe a également élaboré un protocole nutraceutique par la prise d'aliments anticancéreux pour évaluer l'action des molécules phytochimiques sur l'oxydation des protéines du plasma.

4.2 Fractionnement du plasma humain, étape préalable à l'étude des protéines du plasma

La recherche d'une méthode de fractionnement efficace du plasma brut est une étape essentielle de notre étude. Une approche prometteuse est de fractionner les protéines du plasma en deux catégories : une catégorie correspondant aux protéines abondantes déplétées et une autre enrichie en protéines peu abondantes, ce qui facilite la détection des protéines peu abondantes et leur identification. La fraction contenant les protéines abondantes déplétées pourrait également être une source d'informations étant donné que certaines protéines demeurent associées à l'albumine, par exemple, qui est un transporteur de plusieurs autres protéines. Toutes les éventualités doivent être étudiées dans la recherche de marqueurs tumoraux dont l'hypothèse que certaines protéines abondantes pourraient transporter des peptides ou des protéines natives ou aberrantes. Ces peptides ou protéines transportés par

l'albumine pourraient indiquer la présence d'un cancer. L'albumine est une protéine de transport et bien d'autres protéines du plasma humain pourraient jouer un rôle similaire d'où l'importance de récupérer les protéines abondantes du plasma. Ceci est confirmé par les auteurs de l'article de Conrads et coll., (2005), qui mentionnent que l'albumine est connue pour avoir une fonction de transport de protéines dans la circulation sanguine et qu'elle lie physiologiquement des espèces importantes telles que des hormones, des cytokines et des lipoprotéines. L'article de Zhou et coll., (2004) a confirmé également qu'un total de 209 protéines liées aux protéines abondantes ont été trouvées et parmi celles-ci douze protéines couramment utilisées comme des biomarqueurs cliniques.

Cependant, le fondement des approches protéomiques est habituellement basé sur l'identification des protéines trouvées dans la fraction des protéines peu abondantes. Dans cette étude, le fractionnement des protéines du plasma a été effectué en utilisant trois colonnes d'affinité incluant deux colonnes d'immunoaffinité capables d'enlever six et douze protéines abondantes du plasma. En fait, le ProteomeLab IgY Partitioning System qui enlève les douze protéines les plus abondantes a été plus efficace pour l'enrichissement des protéines peu abondantes tel que démontré par le SDS-PAGE et l'analyse des gels 2-D avec différents gradients de pH. La comparaison des trois méthodes de fractionnement par SDS-PAGE confirme donc clairement que IgY-12 a un rendement supérieur, en ce qui a trait à l'enrichissement des protéines peu abondantes du plasma par rapport aux deux autres colonnes (figure 3.4). L'analyse par gels 2-D valide ce choix de la colonne d'affinité IgY-12 pour la suite du projet (figure 3.7). Il est très important de choisir la meilleure méthode disponible pour fractionner le plasma car les protéines abondantes peuvent masquer et limiter la quantité des protéines peu abondantes qui peut être déposée sur les gels 2-D, comme le mentionne également l'article de Görg et coll., (2004). Cette conclusion est appuyée par de récentes études démontrant que la déplétion par immunoaffinité est une approche efficace pour enrichir les protéines peu abondantes du plasma (Cho et coll., 2005; Echan et coll., 2005; Huang et coll., 2005; Moritz et coll., 2005). Parmi les avantages de IgY-12, il y a celui de pouvoir récupérer les protéines abondantes du plasma. La colonne d'affinité IgY-12 est également avantageuse par rapport aux deux autres colonnes d'affinité par l'utilisation

d'anticorps polyclonaux aviaires qui contribuent à la spécificité des liaisons anticorps-antigènes étant donné la distance génétique entre l'espèce aviaire et les mammifères.

La contribution de certains facteurs influençant la détection des protéines peu abondantes du plasma sur la formation des profils de gels 2-D tels que la présence des agents anticoagulants lors de la préparation des échantillons de plasma, l'effet des modifications des cystéinyles avec l'hydroxyéthyl disulfide (DeStreak™) sur la définition des points de protéines et les différentes méthodes de coloration de protéines ont été analysées davantage.

4.3 Isolement du plasma à partir du sang prélevé dans des tubes contenant les anticoagulants CTAD ou EDTA

La préparation d'un échantillon à l'autre doit être reproductible. Par exemple, selon la méthode utilisée pour préparer les échantillons de plasma, en présence de EDTA ou CTAD comme anticoagulants, les profils des protéines peu abondantes du plasma sur gel 2-D sont légèrement variables. Ces variations sont en accord avec une étude récente qui conclut que le choix de la méthode pour préparer le plasma dépend de la technique d'analyse subséquente (Rai et coll., 2005). La collecte du sang dans les tubes CTAD, qui stabilise les plaquettes, est recommandée pour tous les tests sanguins où il est important d'éviter la libération des protéines des plaquettes durant le prélèvement sanguin et le traitement des échantillons sanguins.

4.4 Préparation des échantillons de protéines peu abondantes et abondantes du plasma et mise au point des gels d'électrophorèse bidimensionnelle (IEF/SDS) pour la plate-forme protéomique gels 2-D

C'est la plate-forme protéomique gels 2-D qui a été choisie pour la recherche de biomarqueurs du cancer du sein et des ovaires dans cette étude. La préparation des échantillons en vue du dépôt sur gel 2-D est une étape exigeante, nécessitant beaucoup de

soins et de mises au point car de cette étape dépend en grande partie la résolution et la reproductibilité des gels 2-D. Après avoir établi une quantité optimale de protéines sur gel 2-D grand format à environ 250 µg et le pourcentage de polyacrylamide à 10% pour la séparation des protéines en seconde dimension, les premières étapes de mise au point des gels 2-D ont porté sur le retrait des sels des échantillons de plasma. L'un des problèmes souvent rencontrés lors de la préparation des échantillons de plasma est la présence de sels qui interfèrent dans la focalisation isoélectrique et la migration des protéines dans les gels SDS-PAGE. Plusieurs méthodes ont été testées pour éliminer les sels. Parmi celles-ci, il y a la précipitation des protéines par l'éthanol froid, l'acétone ou l'acide trichloroacétique 10%, ou la combinaison de solvants chloroforme/méthanol. La dialyse peut également être utilisée pour éliminer les sels. Une autre méthode pour éliminer les sels consiste à laver l'échantillon à l'eau nanopure dans un tube à concentration.

Suite aux expériences pour améliorer la préparation des échantillons, et par le fait même, la résolution des protéines par gels 2-D, le lavage à l'eau nanopure et la concentration des échantillons ont été choisis comme étant la méthode la plus efficace pour éliminer les sels puisqu'elle permet une bonne résolution du profil des protéines lorsque les colonnes d'affinité Multiple Affinity Removal System et ProteoExtract™ sont utilisées. Toutefois, notre choix de colonne d'affinité s'étant par la suite porté sur la colonne IgY-12, il n'était plus nécessaire de laver les échantillons à l'eau nanopure mais nous avons continué de procéder à leur concentration.

Une autre technique a aussi été utilisée pour enlever les sels des échantillons afin d'améliorer la résolution des protéines sur gels 2-D. Cette méthode consiste à déposer un morceau de papier buvard sur chacune des électrodes entre la bande de gel IPG et le support de gel, lors de la focalisation isoélectrique. Le faible voltage de 200 volts au début de la focalisation isoélectrique permet aux électrolytes d'être absorbés et rassemblés au niveau des papiers buvards. Cette technique très efficace a permis d'améliorer considérablement la résolution et la reproductibilité des gels 2-D (figure 3.3).

D'ailleurs, des résultats similaires ont également été obtenus par l'équipe de Görg et coll., (2004) qui démontre que l'échantillon dans le gel peut être dessalé en appliquant des bas voltages (100 volts) au début du processus pendant quelques heures et en remplaçant en quelques occasions les coussins de papier-filtre sous les électrodes (où les ions de sels se sont rassemblés) qui permettent de se débarrasser des sels contenus dans les gels mais également des protéines dont le point isoélectrique n'est pas à l'intérieur de l'intervalle de pH choisi. Il est donc important de tenir compte du fait que l'application de papiers buvards pourrait faire diffuser à l'extérieur du gel IPG les protéines dont le point isoélectrique est inférieur ou supérieur à l'intervalle de pH de la bande de gel IPG.

Les stries sur les gels 2-D dépendent principalement de la faible solubilisation des protéines. Les protéines membranaires hydrophobes sont particulièrement difficiles à solubiliser et l'article de Görg et coll., (2004) mentionne que les détergents sont utilisés pour empêcher les interactions hydrophobes entre les domaines hydrophobes des protéines pour éviter la perte de protéines due à l'agrégation et à la précipitation. Les détergents zwitterioniques tels que CHAPS et sulfobetaine (SB3-10) permettent de bien solubiliser les protéines membranaires en combinaison avec l'urée (dissociation des liens hydrogènes) et la thiourée (bris des interactions hydrophobes). Un autre point à considérer est le fait que les protéines du plasma sont en majorité glycosylées et selon les auteurs de l'article Görg et coll., (2004), les polysaccharides, particulièrement ceux qui sont chargés, et les acides nucléiques peuvent interagir avec les transporteurs ampholytes et les protéines et faire apparaître des traînées dans les profils de gels 2-D. De plus, ces macromolécules peuvent également accroître la viscosité des solutions et obstruer les pores des gels de polyacrylamide.

La modification des cystéinyles avec l'hydroxyéthyl disulfide (DeStreak™) par oxydation spécifique a amélioré l'apparence des points de protéines dans le gradient acide de l'écart de pH de 4 à 7 malgré que cette modification était initialement développée pour améliorer la migration des protéines dans les écarts de pH alcalins (Pennigton et coll., 2004). Tout en éliminant les stries, l'utilisation de l'hydroxyéthyl disulfide résulte en un profil de points simplifiés et l'amélioration de la reproductibilité (Görg et coll., 2004). Un élément

important est que la modification des cystéinyles par cette méthode durant la première dimension demeure compatible avec la spectrométrie de masse pour l'identification des protéines (Hedberg et coll., 2005), ce qui pourrait être crucial pour l'identification des biomarqueurs du plasma.

Les agents réducteurs tels que DTT empêchent la ré-oxydation des liens disulfures. Ils sont nécessaires pour le clivage des liens disulfures intra et intermoléculaires pour dérouler complètement la protéine. L'ajout de l'agent réducteur DTT dans le tampon de réhydratation de l'ordre de 0,3% permet d'améliorer la résolution des protéines peu abondantes et abondantes du plasma humain. L'ajout de 1,2% du réactif DeStreak™ dans les échantillons ne semble pas interférer avec l'agent réducteur DTT mais participe à la résolution des protéines sur les gels 2-D. Nous avons donc choisi d'utiliser 0,3% de DTT dans le tampon de réhydratation et d'ajouter 1,2% de DeStreak™ dans l'échantillon afin d'obtenir une bonne résolution des protéines et une excellente reproductibilité des gels 2-D.

Le choix du gradient de pH est principalement influencé par la complexité protéique de l'échantillon (Görg et coll., 2004). Les bandes de gel IPG dont l'écart de pH est large (pH 3-12) ou intermédiaire (pH 4-9 ou 4-7) sont utilisées habituellement pour analyser les protéomes simples (petits génomes, organelles, ou autres sous-fractions cellulaires) ou pour obtenir une vue générale de protéomes plus complexes. Ainsi, la complexité du plasma nous a amenés à utiliser des gels avec un écart de pH 3 à 10. Ceux-ci ont révélé que la majorité des protéines peu abondantes et abondantes se trouvaient dans la région acide. De plus, la séparation et la reproductibilité obtenues se sont avérées excellentes. Il faut tenir compte du fait que la visualisation des protéines sur un gel d'électrophorèse avec l'intervalle de gradient de pH intermédiaire pH 4 à 7 ou large 3 à 10 fait en sorte que les protéines sont vues globalement et qu'il pourrait être possible de voir une plus grande quantité de protéines à des intervalles de pH plus étroits (agrandissement d'un secteur de pH comme pH 3.5 à 4.5). La séparation pourrait également être améliorée en augmentant la longueur de la bande de gel IPG à 24 cm.

Une durée de focalisation isoélectrique de 13 heures s'est avérée adéquate pour une séparation et une résolution des protéines du plasma. Selon Görg et coll., (2004), des temps de focalisation trop courts résultent en des stries horizontales mais une focalisation trop longue devrait aussi être évitée parce qu'il peut survenir une exsudation excessive de l'eau à la surface de la bande de gel IPG, causée par le transport actif de l'eau. Ceci entraîne la formation de profils protéiques déformés, des stries horizontales à l'extrémité basique du gel et des pertes de protéines.

Il faut aussi tenir compte du fait que la reproductibilité des gels 2-D est affectée par l'étape nécessaire de l'équilibration des bandes IPG entre la première et la seconde dimension pour permettre aux protéines d'interagir complètement avec le SDS (Görg et coll., 2004). Certaines expériences avec des protéines marquées ont démontré que plus de 20% des protéines sont perdues durant l'équilibration (Zuo et coll., 2000 et Zhou et coll., 2004). La majorité de ces protéines (plus probablement celles qui sont localisées à la surface des bandes de gel IPG) sont perdues durant les premières minutes de l'équilibration. La perte des protéines dans la seconde équibration durant l'alkylation est marginale (Görg et coll. 2004). Pour contrer ces pertes, il faut que les durées des équibrations (la réduction et l'alkylation) soient respectées pour permettre une interaction efficace avec le SDS. De plus, l'équilibration doit être effectuée sous faible agitation pour éviter les pertes de protéines. D'autre part, il est important de bien respecter la durée de la réhydratation des bandes de gel IPG (10 heures minimum) pour permettre une absorption complète et adéquate des protéines dans les bandes de gel.

4.5 Avantages et inconvénients de l'électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS

Plusieurs visions se confrontent relativement aux avantages et inconvénients liés à l'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle en recherche protéomique du plasma humain. Les limites, non seulement des gels 2-D mais aussi de la plupart des technologies courantes d'analyse du protéome, restent le champ d'analyse des protéines hydrophobes et/ou des protéines membranaires, de même que le manque de techniques fiables et d'une grande

sensibilité pour la détection et la quantification des protéines peu abondantes (Görg et coll., 2004).

Selon Smejkal et coll., (2004), l'un des avantages de l'électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS est que cette technique est capable de visualiser des quantités plus petites de protéines comparativement aux gels SDS-PAGE dû à la résolution supérieure des gels 2-D (même quantité de protéines dans une région plus petite) (Smejkal et coll., 2004). Cependant, selon Wetmore et Coll., (2004), bien que l'électrophorèse bidimensionnelle possède des limites biophysiques qui restreignent la résolution des protéines aux extrêmes des pH, l'hydrophobicité et la masse, c'est une technique de séparation des protéines extrêmement polyvalente qui se couple facilement au spectromètre de masse pour former la plate-forme protéomique la plus largement utilisée par les laboratoires de recherche (Wetmore et Coll., 2004). Toutefois, le développement des IPG (« Immobilized pH Gradients ») a permis de créer des gels avec des gradients de pH extrêmement stables ce qui a grandement amélioré la reproductibilité des gels 2-D comme l'ont démontré des comparaisons inter-laboratoires (Görg et coll., 2004). Par conséquent, la focalisation isoélectrique au moyen des IPG est une méthode de choix pour la première dimension des gels 2-D pour la plupart des applications protéomiques (Görg et coll., 2004).

L'exigence en temps et en main-d'œuvre est un obstacle à l'utilisation des gels 2-D en clinique. Par contre, dans le milieu de la recherche, les gels 2-D sont très utiles. Plusieurs études ont démontré que les gels 2-D peuvent détecter des différences entre le protéome de cellules normales et le protéome de cellules cancéreuses. Par exemple, pour ce qui est du cancer du sein, peu de différences ont été observées dans certaines études tandis que d'autres études ont démontré de nombreux changements qui pourraient être utilisés pour distinguer les cellules normales, des tumeurs bénignes et cancéreuses. Les raisons des divergences ne sont pas entièrement éclaircies mais sont probablement dues aux différences dans l'acquisition et la préparation des échantillons, dans la coloration des protéines et dans la quantification plutôt que dans la performance des gels d'électrophorèse bidimensionnelle (Kolch et coll., 2005).

Selon Görg et coll., (2004), les gels d'électrophorèse bidimensionnelle avec les gradients IPG combinés à l'identification des protéines par spectrométrie de masse (MS) est une méthode performante et courante en protéomique en dépit des alternatives prometteuses ou des technologies complémentaires (technologie multidimensionnelle d'identification des protéines, étiquetage par des isotopes stables, biopuces à protéines et à anticorps) qui ont récemment émergé sur le marché. L'électrophorèse bidimensionnelle est pratiquement la seule technique qui peut être appliquée en routine pour le profilage en parallèle de l'expression quantitative de grandes quantités de mélanges complexes de protéines. Les gels 2-D sont capables de séparer des mélanges complexes de protéines selon leur point isoélectrique, leur masse moléculaire, leur solubilité et leur abondance relative (Görg et coll., 2004). La technique des gels 2-D permet de cartographier les protéines intactes qui reflètent les changements au niveau de l'expression des protéines, les isoformes, ou les modifications post-traductionnelles, contrairement à la combinaison chromatographie liquide/spectrométrie de masse en tandem qui fondent leurs analyses sur les peptides où les informations sur la masse moléculaire et sur le point isoélectrique sont perdues et où l'étiquetage par un isotope stable est requis pour l'analyse quantitative. Par la grandeur du gel et le gradient de pH utilisé, l'électrophorèse bidimensionnelle peut résoudre plus de 5 000 protéines simultanément (environ 2 000 protéines en routine), et détectent et quantifient < 1 ng de protéines par point (Görg et coll., 2004). Les gels 2-D permettent également d'isoler les protéines en grande quantité, pour permettre des analyses additionnelles structurales par MALDI-TOF MS, ESI-MS ou micro-séquençage Edman (Görg et coll., 2004).

4.6 Avantages et inconvénients des différentes méthodes de coloration

Chacune des méthodes de coloration testées a ses avantages pour révéler les protéines peu abondantes du plasma séparées par gels 2-D. L'analyse des protéines sur gel 2-D dépend de la capacité de la coloration à visualiser de façon précise et reproductible les protéines à des concentrations s'étendant sur plusieurs ordres de magnitude (Smejkal et coll., 2004). CBB colloïdal G-250 est assez simple et hautement reproductible mais c'est la méthode la moins sensible parmi celles utilisées. Les résultats avec les colorants fluorescents montrent que le

Deep Purple est plus sensible que le Sypro Ruby pour détecter les protéines peu abondantes du plasma séparées par gels 2-D. Le grand avantage des colorants fluorescents comme le Sypro Ruby et principalement le Deep Purple est leur très large échelle dynamique linéaire qui est essentielle pour la quantification des protéines (Mackintosh et coll., 2003). De plus, Deep Purple, provient d'un composé issu d'un champignon *Epicoccum nigrum* (Smejkal et coll., 2004), et contrairement à Sypro Ruby, n'induit pas la formation de taches sur le gel. Deep Purple est un composé naturel et son élimination dans l'environnement est plus facile. Le Deep Purple est deux à quatre fois plus sensible que le Sypro Ruby mais l'inconvénient principal du Deep Purple est son instabilité à l'exposition à la lumière ultraviolette sur l'appareil à transillumination. La méthode de la coloration à l'argent utilisée donne les meilleurs résultats pour visualiser le plus grand nombre de protéines peu abondantes du plasma. Cette méthode appartient à la version acide des méthodes de coloration au nitrate d'argent. Dans cette méthode particulière, le glutaraldéhyde est omis car ce réactif est connu pour modifier de façon covalente les protéines et il n'est pas crucial pour obtenir une grande sensibilité (Shevchenko et coll., 1996). Donc, cette méthode est compatible avec la spectrométrie de masse pour l'identification des protéines peu abondantes du plasma. Bien que la méthode de coloration à l'argent soit très sensible, sa sensibilité pourrait probablement être améliorée davantage en soumettant les gels aux teintures bleues (« blue toning ») (Berson, 1983). Due à cette grande sensibilité et à sa simplicité, la procédure de coloration à l'argent pourrait être très utile pour visualiser les protéines sous forme de traces. Cependant, la coloration fluorescente Deep Purple devrait être davantage fiable pour la quantification des protéines peu abondantes du plasma car elle permet une linéarité sur une plus grande échelle (Smejkal et coll., 2004) que le nitrate d'argent qui atteint plus rapidement la saturation. La méthode de chromatographie d'affinité IgY-12, dont le rendement est supérieur par rapport aux deux autres colonnes d'affinité testées, et la coloration au nitrate d'argent très sensible (modifiée de Shevchenko et coll., 1996) semblent être une combinaison particulièrement efficace.

4.7 Analyse de l'oxydation des protéines du plasma en tant que modification post-traductionnelle

Les fonctions des protéines sont souvent régulées par les modifications post-traductionnelles. Le déchiffrement des modifications post-traductionnelles des protéines et leurs changements dynamiques peuvent révéler leur état fonctionnel dans les voies de signalisation (Kolch et coll., 2005). Les modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la glycosylation, le clivage protéolytique, l'oxydation, etc. sont des attributs importants des structures micro- et macromoléculaires, la fonction et la localisation cellulaire ou extracellulaire des protéines. La séquence primaire et les modifications post-traductionnelles sont les déterminants majeurs des propriétés biophysiques uniques de chaque protéine telles que sa charge nette (point isoélectrique), l'hydrophobicité, la polarité, la force des liens hydrogènes, les structures secondaires, tertiaires et quaternaires et les propriétés d'affinité aux ligands (liaison à l'ATP, hormones) (Wetmore et coll., 2004).

L'analyse de l'oxydation des protéines en tant que modification post-traductionnelle pourrait apporter des informations intéressantes et fournir des marqueurs tumoraux ou un profil protéique permettant de détecter de façon précoce le cancer du sein ou des ovaires. Selon Reinheckel et coll., (2000), les protéines sont sujettes à l'oxydation *in vivo* en tant que modification post-traductionnelle. L'oxydation des protéines peut également survenir suite à des dommages causés par des espèces réactives de l'oxygène dues à un stress oxydatif. Au cours de l'oxydation, des groupements carbonyles sont intégrés dans les chaînes latérales d'acides aminés. Reinheckel et coll., (2000), mentionne que les protéines sont de plus en plus reconnues comme étant des cibles importantes de l'action des radicaux libres qui sont formés par des conditions physiologiques et pathologiques. L'évaluation des carbonyles liés aux protéines est un marqueur couramment utilisé pour la modification oxydante des protéines. La dérivation des carbonyles des protéines au moyen du DNPH suivie d'un gel SDS-PAGE et d'un immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps anti-DNP pour la détection des groupes carbonyles modifiés au DNPH est une méthode couramment utilisée. Cependant, les gels SDS-PAGE présentent une faible résolution, ce qui rend

difficile l'identification des protéines oxydées. L'utilisation des gels 2-D pour la détection des carbonyles des protéines est appropriée et préférable puisque c'est une méthode potentiellement capable de séparer plus de 5 000 points de protéines (Reinheckel et coll., 2000). Il est rapporté que si la dérivation des carbonyles des protéines est effectuée au moyen de DNPH durant la préparation des échantillons, un changement dans la mobilité des protéines est observé. De plus, l'exposition des protéines aux espèces réactives de l'oxygène peut conduire à des modifications dans les chaînes latérales d'acides aminés, entraînant l'altération de la structure ou des fonctions (Conrad et coll., 2001).

Notre équipe a décidé d'utiliser la méthode de modification des carbonyles dans les bandes de gel IPG par le DNPH après la focalisation isoélectrique, avant l'étape de réduction par le DTT et avant la migration sur gel SDS/PAGE, afin d'éviter les changements dans la mobilité des protéines en première dimension et ainsi augmenter la reproductibilité des gels 2-D. Si les échantillons de protéines sont dérivés au DNPH avant la focalisation isoélectrique, le rendement est variable et les profils de protéines sont peu reproductibles lorsqu'ils sont comparés aux mêmes échantillons qui n'ont pas été dérivés au DNPH (Conrad et coll., 2001). Les gels 2-D sont davantage reproductibles et les points de protéines plus intenses lorsque les échantillons sont dérivés après la focalisation isoélectrique. La dérivation doit être rapide avec des réactions entre les carbonyles des protéines et le DNPH de moins de 2 minutes. De longues dérivations (supérieures à 80 minutes) peuvent causer des réactions non-spécifiques des protéines non-oxydées (Conrad et coll., 2001).

Beevi et coll., (2006), mentionne un rapport intéressant entre l'oxydation et le cancer. Cet article présente une étude pour évaluer simultanément les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives du nitrogène (RNS) par rapport à l'état antioxydant de patients ayant un carcinome cervical. Ils ont démontré une possible implication des stress oxydatif et nitrosatif mise en évidence par la peroxydation des lipides et les niveaux d'oxyde nitrique (NO) avec un système de défense antioxydant altéré dans la pathogenèse du cancer cervical. Cet article indique que l'organisme humain a développé des mécanismes de défense antioxydants complexes et bien coordonnés pour se protéger contre les effets délétères des

ROS et RNS. Les tumeurs malignes causent une charge oxydante qui atténue les systèmes de défense antioxydants et la diminution de ces mécanismes de défense antioxydants corrélient avec l'émergence du phénotype malin.

L'article de Beevi et coll., (2006), ainsi que d'autres articles récents (Lee et coll., 2006; de Castro et coll., 2006) montrent certains liens entre le cancer et l'oxydation. L'oxydation des protéines par l'introduction de carbonyles dans les chaînes latérales des acides aminés pourrait être une indication indirecte de la présence d'un cancer. L'analyse des protéines oxydées du plasma brut, de la fraction des protéines peu abondantes et des protéines abondantes du plasma peut conduire à l'identification de protéines d'intérêt clinique pour les cancers du sein ou des ovaires. La régulation de l'oxydation semble variable et dépend de multiples facteurs allant de l'état de santé aux habitudes alimentaires. C'est d'ailleurs ce que nos résultats suggèrent par une diminution de l'oxydation des protéines suite à la consommation d'aliments reconnus anticancéreux. Ces variations sont d'un grand intérêt pour la suite du projet et l'analyse des protéines oxydées du plasma de personnes atteintes du cancer du sein ou des ovaires à différents stades comparées aux protéines oxydées du plasma de personnes en santé pourrait révéler des profils de protéines, des signatures spécifiques à chaque stade de cancer du sein ou des ovaires.

Il faut toutefois être très prudent dans ces types d'analyse et plusieurs expériences supplémentaires sont nécessaires car de nombreux facteurs peuvent affecter les résultats, que ce soit par la méthode de préparation du plasma (EDTA, CTAD) ou des étapes plus techniques telles que la déplétion des protéines abondantes du plasma ou la spécificité des anticorps anti-DNP. Ainsi, les méthodes doivent être standardisées et très rigoureuses. Par exemple, une étude plus approfondie des protéines oxydées dans plusieurs écarts de pH très étroits qui se chevauchent serait intéressante et pourrait permettre de déchiffrer ce secteur acide du pH où semblent se concentrer de nombreuses protéines oxydées. Ce secteur des protéines oxydées semblent particulièrement intéressant pour de futures analyses à moins qu'il ne s'agisse d'un problème inhérent à la technique OxyBlot™ ou bien à la non-spécificité de l'anticorps anti-DNP de cette technique. Il serait peut-être également approprié

d'analyser en profondeur le secteur basique des protéines oxydées par des chevauchements d'écarts de pH étroits.

Chaque individu semble posséder un profil distinctif de protéines oxydées de la fraction des protéines peu abondantes du plasma (figures 3.12 et 3.13). De plus, des variations sont notées chez une même personne lors de deux prélèvements sanguins différents et ceci pourrait rendre l'identification de marqueurs tumoraux parmi les protéines oxydées particulièrement difficile. Ceci pourrait être intéressant par contre dans l'optique future d'une médecine adaptée sur mesure à chaque personne. Si l'empreinte ou la signature des protéines change radicalement chez une même personne lors d'un simple prélèvement sanguin, ceci pourrait être l'indication de la présence d'une pathologie comme le cancer. Il serait intéressant de combiner plusieurs échantillons du plasma de personnes en santé, pour minimiser les variations entre chaque personne, ce qui permettrait d'effectuer une comparaison entre le profil des protéines oxydées, correspondant à une moyenne des échantillons de personnes en santé, et le profil des protéines oxydées de l'échantillon de plasma d'une personne possiblement atteinte du cancer. Ainsi, une meilleure évaluation de l'état du patient pourrait peut-être être effectuée afin de déterminer s'il y a cancer ou non et déterminer le stade du cancer.

4.8 Prévention du cancer par l'élaboration d'un protocole nutraceutique lié à la prise d'aliments anticancéreux et analyse subséquente du niveau d'oxydation des protéines peu abondantes du plasma

L'action anticancéreuse de chacun des aliments impliqués dans le protocole nutraceutique est reconnue et vérifiée dans notre laboratoire avec des cellules en culture. Par ailleurs, tel que déjà mentionné, nos résultats démontrent que l'oxydation des protéines peu abondantes du plasma semble régulée par l'apport d'aliments anticancéreux. Plusieurs expériences supplémentaires sont cependant nécessaires pour valider ces informations puisque de nombreuses variables peuvent entrer en ligne de compte et doivent être étudiées et comparées de façon concomitante à un contrôle valable. Par exemple, il faut tenir compte des

variations diurnes du sujet et de l'heure du prélèvement sanguin, de l'état physiologique de la personne; il faut augmenter le nombre de volontaires pour évaluer les variations interindividuelles; il faut aussi évaluer la spécificité des anticorps anti-DNP et les variations dues à la technique OxyBlot™ elle-même, etc.

Le protocole nutraceutique composé par notre équipe semble indiquer la capacité des molécules phytochimiques de moduler l'oxydation des protéines du plasma (figures 3.14 et 3.15). Bien que les molécules phytochimiques anticancéreuses ne soient pas reconnues comme étant aussi antioxydantes, il semble que l'apport d'aliments anticancéreux quotidien pourrait contribuer à abaisser le niveau global d'oxydation des protéines du plasma humain malgré le fait que l'oxydation de certaines protéines soit légèrement modulée à la hausse. Des études plus approfondies et un contrôle approprié pourraient peut-être permettre d'établir une corrélation entre le niveau d'oxydation global des protéines ou de certaines protéines spécifiques et le diagnostic et/ou pronostic de certains cancers ou d'autres maladies.

Le livre *Les aliments contre le cancer* (Béliveau et Gingras, 2005) mentionne que plusieurs composés phytochimiques, et notamment les polyphénols, possèdent une structure chimique idéale pour absorber les radicaux libres et seraient des antioxydants beaucoup plus puissants que les vitamines. Les propriétés antioxydantes des fruits et légumes semblent donc beaucoup plus reliées à la présence de composés phytochimiques, tels que les polyphénols alors que leur contenu en vitamine ne joue qu'un rôle assez mineur dans ces propriétés. Par ailleurs, certaines classes de composés phytochimiques, comme les isothiocyanates, ont une activité antioxydante très moyenne malgré leur capacité anticancéreuse élevée. Le livre stipule également que si l'activité antioxydante est une propriété de plusieurs molécules, cette propriété n'est pas nécessairement responsable des effets biologiques. Le même potentiel antioxydant de deux polyphénols a des effets distincts sur une cellule cancéreuse, une des molécules pouvant inhiber complètement une enzyme alors que l'autre reste sans effet. Les fruits et les légumes ne sont pas seulement des sources d'antioxydants (Béliveau et Gingras, 2005). Ainsi, les effets synergiques dus aux concentrations élevées de plusieurs aliments anticancéreux tels que les fruits et légumes

établis dans le protocole nutraceutique, ainsi que la présence du chocolat noir et du thé vert japonais pourraient contribuer à l'équilibre de l'homéostasie en agissant sur différents paramètres physiologiques.

4.9 Perspectives

La plate-forme protéomique 2-D/MS est intéressante et possède plusieurs avantages non négligeables mais dans le cadre de la recherche de biomarqueurs du cancer du sein ou des ovaires, il serait intéressant d'élargir ce champ pour y intégrer d'autres technologies de pointe comme le SELDI-TOF, la chromatographie liquide en phase inverse micro-(RPLC)/MS/MS, la méthode « MudPIT » etc. Selon Anderson et coll., (2004), il est clair que plus de deux dimensions sont nécessaires à la caractérisation des protéines du plasma. L'utilisation de techniques multidimensionnelles a récemment permis au nombre de protéines du plasma de faire un bond considérable.

L'étude de l'oxydation en tant que modification post-traductionnelle a fourni des résultats prometteurs. Il serait intéressant de continuer d'explorer les protéines oxydées selon un protocole nutraceutique mais sur un plus large éventail de personnes en santé et/ou atteintes du cancer et comparer les résultats des deux groupes après consommation d'un seul aliment anticancéreux à la fois. Le profil global des protéines oxydées détectées par les anticorps du kit OxyBlot™ pourrait être complété par l'identification ciblée des protéines oxydées qui se démarquent d'une personne ou des personnes atteintes d'un cancer par rapport à une personne en santé ou à un groupe de personnes en santé. Ces identifications pourraient être complétées par des méthodes de spectrométrie de masse pour l'identification des protéines. Une méthode pourrait impliquer des marquages de protéines oxydées par la biotine-N-maléimide (biotine-NM) et les protéines oxydées pourraient être purifiées par l'agarose streptavidine et séparées sur gel 2-D (Kim et coll., 2006). Un modèle de cancer pédiatrique intéressant à étudier relativement au niveau de l'oxydation des protéines du plasma serait la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) qui représente 25% de l'ensemble des cas de cancer chez l'enfant.

Il serait aussi particulièrement intéressant d'étudier d'autres modifications post-traductionnelles comme, par exemple, la phosphorylation. Les phosphoprotéines sont activées ou inactivées en cascade dans diverses voies de signalisation de différents processus cellulaires. Une tumeur cancéreuse pourrait être détectée par des changements dans les niveaux de phosphorylation de protéines plasmatiques. De multiples techniques de pointe sont à notre disposition pour l'étude de protéines phosphorylées. Nous pourrions tout d'abord isoler les phosphoprotéines par chromatographie d'affinité à partir du plasma de personnes en santé et/ou cancéreuses. La présence de certaines protéines phosphorylées pourrait être vérifiée avec des anticorps par immunobuvardage de type Western ou encore au moyen de biopuces (microarrays). La comparaison des protéines phosphorylées des personnes en santé et des patients cancéreux pourrait peut-être permettre d'identifier des variations spécifiques dans le profil de phosphorylation selon l'évolution de certains cancers. L'identification de protéines phosphorylées pourrait permettre de produire des anticorps spécifiques contre ces phosphoprotéines et ainsi mener à un diagnostic et/ou un pronostic cliniques.

Nous pourrions aussi utiliser la technique de 2D-DIGE (« differential in-gel electrophoresis ») pour l'analyse des protéines modifiées par phosphorylation ou oxydation. Cette technique, qui semble très versatile, consiste à marquer les échantillons de façon covalente à l'aide de colorants fluorescents (Cy2, Cy3 et Cy5) et à combiner ces échantillons avant de les déposer sur gel d'électrophorèse bidimensionnelle. Le gel est numérisé au scanner à différentes longueurs d'onde et des images correspondant aux différents échantillons sont générées et analysées par logiciels (Alaiya et coll., 2005). Cette technique permet de vérifier les variations de position sur le gel dues à la perte d'un groupement chimique. Nous pourrions par exemple traiter un échantillon de protéines phosphorylées à la phosphatase tandis qu'un autre échantillon de protéines phosphorylées ne subit pas ce traitement. Les protéines qui changent de position sur le gel par la perte d'un phosphate sont les protéines qui subissent une phosphorylation. Un principe similaire pourrait être appliqué aux protéines oxydées par l'ajout d'un groupement sur les carbonyles des protéines oxydées qui ferait varier la position des protéines oxydées sur le gel. Cette technique pourrait permettre de comparer les profils protéiques de personnes en santé et de personnes atteintes

du cancer du sein ou de l'ovaire, suivre les différentes phases de l'évolution d'un cancer, étudier les répercussions de l'alimentation sur les protéines oxydées et phosphorylées.

Il pourrait être intéressant d'analyser par gels 2-D les protéines provenant de lysats de biopsies des tumeurs solides du cancer du sein ou de l'ovaire en comparaison avec des tissus sains pour explorer les variations dans le niveau d'expression, d'oxydation ou de phosphorylation des protéines. La présence de ces marqueurs tumoraux pourrait subséquemment être suivie dans les protéines peu abondantes du plasma au moyen d'anticorps après immunobuvardage de type Western ou par la technique d'Elisa.

D'autres modifications post-traductionnelles des protéines pourraient être explorées dont les protéines liant l'ATP, la nitrosylation des protéines, la glycosylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, les variations dans le clivage des protéines etc. et d'autres fluides biologiques pourraient être analysés par exemple l'urine (pour l'étude des cancers de Wilms ou d'autres cancers) et le liquide céphalorachidien.

Toutes ces informations, l'expression, la présence ou l'absence d'une protéine ou d'un groupe de protéines, aberrantes ou non ou selon leurs modifications post-traductionnelles, pourraient aider à établir un traitement personnalisé et un pronostic précis selon le profil protéique d'un individu atteint de cancer.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Nos travaux de recherche sur l'analyse du plasma humain ont permis de déterminer la méthode la plus efficace pour fractionner le plasma et enrichir les protéines peu abondantes du plasma afin de les analyser par gels 2-D, pour la recherche de biomarqueurs du cancer du sein ou de l'ovaire. La méthode la plus efficace est la colonne d'affinité ProteomeLab™ IgY-12 Spin Column Proteome Partitioning Kit qui permet d'enlever douze protéines majeures. Une comparaison de deux méthodes de traitement du plasma au moyen de deux anticoagulants, CTAD et EDTA, a révélé de légères différences au niveau du profil des protéines du plasma sur gels 2-D. Le choix a porté sur l'anticoagulant CTAD pour sa capacité à contrôler l'activation des plaquettes. La mise au point des gels 2-D a permis d'améliorer la reproductibilité et la résolution des gels bidimensionnels par l'ajout de réactif hydroxyéthyl disulfide (DeStreak™) dans les échantillons pour éliminer les stries sur les gels 2-D et par l'ajout de papiers buvards sur les électrodes pour l'élimination des sels lors de la focalisation isoélectrique. La coloration au nitrate d'argent a été choisie pour sa sensibilité et sa compatibilité avec le spectromètre de masse. Toutes ces mises au point des gels 2-D ont permis de les rendre reproductibles et ainsi améliorer l'analyse des échantillons sur gels 2-D par logiciels d'analyse lorsque les échantillons de personnes en santé et de personnes atteintes du cancer du sein ou de l'ovaire seront comparés.

La plate-forme protéomique IEF/SDS couplée au spectromètre de masse est un processus complexe et chronophage pour le milieu clinique qui nécessite une technologie au débit rapide pouvant traiter de grandes quantités d'échantillons à la fois. Cette plate-forme est cependant adéquate et particulièrement efficace dans le milieu de la recherche universitaire. La technique des gels 2-D est en constante évolution ce qui est une indication de l'intérêt que lui porte le milieu de la recherche. Les techniques ProteomeLab™ PF 2D Protein Fractionation System et 2D-DIGE en sont des exemples flagrants. Ces techniques sont l'aboutissement direct des gels 2-D. Elles permettent l'analyse de plusieurs échantillons à la

fois et l'identification des protéines selon plusieurs paramètres. Ces techniques pourraient éventuellement être adaptées au domaine clinique.

L'analyse de l'une des modifications post-traductionnelles des protéines du plasma, l'oxydation, a permis d'avancer l'hypothèse que les niveaux d'oxydation des protéines, à la hausse ou à la baisse, pourraient être impliqués dans une pathologie comme le cancer du sein ou de l'ovaire. L'exploration de l'oxydation pourrait révéler des profils protéiques permettant de détecter un cancer de façon précoce ou être indicateur d'un pronostic. Dans le cadre de la prévention du cancer, le volet nutraceutique des protéines oxydées du plasma a permis d'évaluer la capacité des aliments anticancéreux à agir au niveau de l'état d'oxydation des protéines du plasma. Ces résultats semblent révéler certains liens entre l'oxydation et les capacités anticancéreuses de certains aliments.

L'analyse protéomique du plasma humain est un défi passionnant pour la communauté scientifique et la poursuite de ce projet est essentielle pour la découverte de marqueurs de détection précoce du cancer et pour la prévention contre le cancer.

BIBLIOGRAPHIE

- Alaiya A., M. Al-Mohanna et S. Linder. (2005). Clinical Cancer proteomics : promises and pitfalls. *J. Proteome Res.* **4(4)**, 1213-1222.
- Adkins J.N., M.E. Monroe, K.J. Auberry, Y. Shen, J.M. Jacobs, D.G. 2nd Camp, F. Vitzthum, K.D. Rodland, R.C. Zangar, R.D. Smith et J.G. Pounds. (2005). A proteomic study of the HUPO Plasma Proteome Project's pilot samples using an accurate mass and time tag strategy. *Proteomics.* **5 (13)**, 3454-3466.
- Aldred S., M.M. Grant et H.R. Griffiths. (2004). The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. *Clin. Biochem.* **37 (11)**, 943-952.
- Anderson, N. L., M. Polanski, R. Pieper, T. Gatlin, R. S. Tirumalai, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, J. N. Adkins, J. G. Pounds, R. Fagan et A. Lobley. (2004). The Human Plasma Proteome. A nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol. Cell Proteomics.* **3 (4)**, 311-326.
- Beckman Coulter, Inc. : http://pf2d.science-research.net/doc/bc_proteomelab-pf2d.pdf
- Beevi, S. S., M. H. Rasheed et A. Geetha. (2006). Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clin. Chim. Acta.*
- Béliveau, R. et D. Gingras. (2005). Les aliments contre le cancer. Éditions du Trécarré.
- Béraud J. (2001). Le technicien d'analyses biologiques, guide théorique et pratique. Éditions Technique & Documentation.
- Berson G. (1983). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity by a blue toning. *Anal. Biochem.* **134**, 230-234.
- Chiarugi, P., M.L. Taddei et C. Ramponi. (2005). Oxidation and tyrosine:synergistic or antagonistic cues in protein tyrosine phosphatase. *CMLS.Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 931-936.

- Cho, S.Y., E.Y. Lee, J.S. Lee, H.Y. Kim, J.M. Park, M.S. Kwon, Y.K. Park, H.J. Lee, M.J. Kang, J.Y. Kim, J.S. Yoo, S.J. Park, J.W. Cho, H.S. Kim et Y.K. Paik. (2005). Efficient prefractionation of low-abundance proteins in human plasma and construction of a two-dimensional map. *Proteomics*. **5** (13), 3386-3396.
- Conrad, C.C., J. Choi, C.A. Malakowsky, J.M. Talent, R. Dai, P. Marshall, R.W. Gracy. (2001). Identification of protein carbonyles after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*. **1**, 829-834.
- Conrads, T. P., B. L. Hood, E. F. Petricoin III, L. A. Liotta et T. D. Veenstra. (2005). Cancer proteomics: many technologies, one goal. *Expert Rev. Proteomics*. **2** (5), 693-703.
- De Castro, J., A. Hernandez-Hernandez, M.C. Rodriguez, M. Llanillo, J. Sanchez-Yague. (2006). Comparison of changes in erythrocyte and platelet fatty acid composition and protein oxidation in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Invest*. **24** (4), 339-345.
- Echan, L.A., H.Y. Tang, N. Ali-Khan, K. Lee et D.W. Speicher. (2005) Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics*. **5** (13), 3292-3303.
- Görg, A., W. Weiss et M. J. Dunn. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. **4**, 3665-3685.
- He P., H.Z. He, J. Dai, Y. Wang, Q.H. Sheng, L.P. Zhou, Z.S. Zhang, Y.L. Sun, F. Liu, K. Wang, J.S. Zhang, H.X. Wang, Z.M. Song, H.R. Zhang, R. Zeng et X Zhao. (2005). The human plasma proteome: analysis of chinese serum using shotgun strategy. *Proteomics*. **5** (13), 3442-3453.
- Hedberg, J.J., E.J. Bjerneld, S. Cetinkaya, J. Goscinski, I. Grigorescu, D. Haid, Y. Laurin et B. Bjellqvist. (2005). A simplified 2-D electrophoresis protocol with the aid of an organic disulfide. *Proteomics*. **5** (12), 3088-3096.
- Huang, L., G. Harvie, J.S. Feitelson, K. Gramatikoff, D.A. Herold, D.L. Allen, R. Amunngama, R.A. Hagler, M.R. Pisano, W.W. Zhang et X. Fang. (2005). Immunoaffinity separation of plasma proteins by IgY microbeads: meeting the needs of proteomic sample preparation and analysis. *Proteomics*. **5**, 3314-3328.

HUPO : <http://www.hupo.org/>

Kim B.J., B.L. Hood, R.A. Aragon, J.P. Hardwick, T.P. Conrads, T.D. Veenstra et B.J. Song. (2006). Increased oxidation and degradation of cytosolic proteins in alcohol-exposed mouse liver and hepatoma cells. *Proteomics*. **6** (4), 1250-1260.

Kolch W., H. Mischak et A. R. Pitt. (2005). The molecular make-up of tumour: proteomics in cancer research. *Clin. Science*. **108**, 369-383.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.

Lee S. N.L. Young, P.A. Whetstone, S.M. Cheal, W.H., Benner, C.B. Lebrilan et C.F. Meares. (2006). Method to site-specifically identify and quantitate carbonyl end products of protein oxidation using oxidation-dependent element coded affinity tags (O-ECAT) et la chromatographie nanoliquide fourier transform mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **5** (3), 539-47.

Le grand dictionnaire terminologique de l'Office québécois de la langue française: http://www.granddictionnaire.com/btml/fra/r_motclef/index800_1.asp

Mackintosh, J.A., H.Y. Choi, S.H. Bae, D.A. Veal, P.J. Bell, B.C. Ferrari, D.D. Van Dyk, N.M. Verrills, Y.K. Paik et P. Karuso. (2003). A fluorescent natural product for ultra-sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. **3**, 2273-2288.

Moritz, R.L., A.B. Clippingdale, E.A. Kapp, J.S. Eddes, H. Ji, S. Gilbert, L.M. Connolly et R.J. Simpson. (2005). Application of 2-D free-flow electrophoresis/RP-HPLC for proteomic analysis of human plasma depleted of multi high-abundance proteins. *Proteomics*. **5** (13), 3402-3413.

Pelmont J. (1996). *Enzymes*. Presses Universitaires de Grenoble.

Pennington, K., E. McGregor, C.L. Beasley, I. Everall, D. Cotter et M.J. Dunn. (2004). Optimization of the first dimension for separation by two-dimensional gel electrophoresis of basic proteins from human brain tissue. *Proteomics*. **4**(1), 27-30.

Polanski M. et L. Anderson. (2006). A list of candidate of cancer biomarkers for targeted proteomics. *Biomarker Insights*. **2**, 1-48.

Raggiaschi R., S. Gotta et G.C. Terstappen. (2005). Phosphoproteome Analysis. *Biosci. Rep.* **25** (1-2), 33-44.

Rai, A. J., C.A. Gelfand, B.C. Haywood, D.J. Warunek, J. Yi, M. D. Schuchard, R. J. Mehigh, S. L. Cockrill, G. B. I. Scott, H. Tammen, P. Schulz-Knappe, D. W. Speicher, F. Vitzhum, B. B. Haab, G. Siest et D. W. Chan. (2005). HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: Towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics*. **5**, 3262-3277.

Randox®: <http://www.randox.com/French/disease.cfm?ccs=615>

Reinheckel T., S. Körn, S. Möhring, A. W. Augustin, W. Halangk et L. Schild. (2000). Adaptation of Protein Carbonyl Detection to the Requirements of Proteome Analysis Demonstrated for Hypoxia/Reoxygenation in Isolated Rat Liver Mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **376** (1), 59-65.

Shevchenko, A. J., M. Wilm, O. Vorm, et M. Mann. (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.* **68**, 850-858.

Smejkal, G. B., M.H. Robinson, et A. Lazarev. (2004). Comparison of fluorescent stains : Relative photostability and differential staining of proteins in two-dimensional gels. *Electrophoresis*. **25**, 2511-2519.

Srivastava S. et R.G. Srivastava. (2005). Proteomics in the Forefront of Cancer Biomarker Discovery. *J. Proteome Res.* **4** (4), 1098-1103.

Statistiques canadiennes sur le cancer. (2006):
http://www.cancer.ca/vgn/images/portal/cit_86755361/31/22/935505932cw_2006stats_fr.pdf
.pdf

Thadikaran, L., M.A. Siegenthaler, D. Crettaz, P.A. Queloz, P. Schneider et J.D. Tissot. (2005). Recent advances in blood-related proteomics. *Proteomics*. **5** (12), 3019-3034.

- Veenstra T.D., T.P. Conrads, B.L. Hood, A.M. Avellino, R.G. Ellenbogen et R.S. Morrison. (2005). Biomarkers : mining the biofluid proteome. *Mol. Cell. Proteomics*. **4** (4), 409-418.
- Wetmore, B. A. et B. A. Merrick. (2004). Toxicoproteomics: Proteomics Applied to Toxicology and Pathology. *Toxic. Path.* **32**, 619-642.
- Wilkins M.R., J.C. Sanchez, A.A. Gooley, R.D. Appel, I. Humphery-Smith, D.F. Hochstrasser et K.L. Williams. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev.* **13**, 19-50.
- Zhou, S. M.J. Bailey, M.J. Dunn, V.R. Preedy et P. W. Emery. (2005). A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure. *Proteomics*. **5** (11), 2739-2747.
- Zuo, X. et D. W. Speicher. (2000). Quantitative evaluation of protein recoveries in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. **21**, 3035-3047.