



HAL
open science

Femmes à risques: évolution de l'oncogénétique en pratique quotidienne: Analyse protéomique dans les formes précoces de cancer du sein

J.-P. Peyrat, L. Hornez, P. Vennin, C. Rolando, J. Bonneterre, F. Revillion

► To cite this version:

J.-P. Peyrat, L. Hornez, P. Vennin, C. Rolando, J. Bonneterre, et al.. Femmes à risques: évolution de l'oncogénétique en pratique quotidienne: Analyse protéomique dans les formes précoces de cancer du sein. 28^e Journées de la Société française de sénologie et de pathologie mammaire (SFSPM), Lille, 2006. Cancers du sein localisés: Les nouvelles pratiques, Nov 2006, Lille, France. pp.164-170. hal-03574911

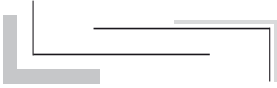
HAL Id: hal-03574911

<https://hal.science/hal-03574911>

Submitted on 15 Feb 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Femmes à risques : évolution de l'oncogénétique en pratique quotidienne

Analyse protéomique dans les formes précoces de cancer du sein

Proteomic analysis in early breast cancer

Mots-clés : Cancer du sein - Analyse protéomique.

Keywords: Breast cancer - Proteomic analysis.

J.-P. Peyrat*, L. Hornez*, P. Vennin**,***, C. Rolando****,
J. Bonneterre***, F. Révillion*

Il n'y a actuellement que peu de retombées pratiques de la biologie pour le dépistage, le pronostic et le traitement des cancers du sein. Récemment, se sont développées des méthodologies d'analyses génomique, transcriptomique et protéomique permettant des études biologiques systématiques, à grande échelle, qui pourraient avoir des retombées en pratique clinique. Les 30 000 gènes cellulaires produisent un nombre plus élevé d'ARNm ; le nombre de protéines produites est encore plus élevé mais seulement quelques milliers sont connues et leurs fonctions identifiées. À partir du génome humain, des ensembles différents de protéines sont produits, en fonction, par exemple, du cycle cellulaire, du développement, de la réponse à des signaux biologiques ou pharmacologiques, de l'état pathologique de la cellule. De plus, la plupart des protéines ne sont pas utilisées directement, elles subissent de nombreuses modifications pour devenir fonctionnelles (i.e. coupure enzymatique, greffage de sucre, amidation, phosphorylation, méthylation, acétylation, isoprénylation, etc.). Après les modifications co- et post-traductionnelles, on estime le nombre potentiel de protéines différentes à environ cinq millions.

Le protéome désigne l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu, ou d'un organe à un moment donné [1]. L'analyse protéomique vise à une étude globale de l'expression des protéines et de leurs modifications post-traduction-

* Laboratoire d'oncologie moléculaire humaine.

** Consultation d'oncogénétique, Centre de lutte contre le cancer de la Région Nord-Pas-de-Calais (Lille).

*** Département de sénologie, Centre de lutte contre le cancer de la Région Nord-Pas-de-Calais (Lille).

**** UMR 8009 CNRS, Université des sciences et technologies de Lille (Villeneuve-d'Ascq).

nelles et constitue donc une source essentielle d'informations sur l'état d'un système biologique donné. C'est une approche tout à fait complémentaire de l'analyse génomique et de l'analyse transcriptomique [2].

L'analyse protéomique, en particulier dans le cancer du sein, permettrait l'identification de profils protéiques (signatures) et de marqueurs biologiques pour mieux classer les tumeurs [3], aider à la définition de nouvelles classes de médicaments, favoriser un diagnostic précoce et suivre les patients en cours de traitement [4]. Elle est praticable sur le tissu, le plasma, le sérum et tout fluide biologique. Après avoir rappelé les principales méthodologies utilisées actuellement pour l'analyse protéomique, nous illustrerons l'utilisation que l'on peut en faire avec deux exemples d'établissement de signatures protéomiques : tout d'abord, dans les cancers du sein (tissus) sans envahissement ganglionnaire mais de mauvais pronostic, puis, dans les cancers du sein (sérum), afin de détecter précocement leur apparition dans les familles à risque héréditaire de cancers du sein.

Principe “de référence”

L'analyse protéomique repose sur une méthodologie qui couple l'électrophorèse bidimensionnelle (2D) hautement résolutive et l'identification des protéines. La première étape de séparation de protéines permet de détecter la présence puis de mesurer des variations de quantité de protéines entre différents échantillons. La deuxième étape consiste essentiellement, actuellement, en l'utilisation de la spectrométrie de masse.

Gels 2D

L'électrophorèse 2D est la méthode de choix pour séparer les protéines puisqu'elle permet de séparer simultanément plusieurs milliers de polypeptides à partir d'un mélange complexe en fonction de deux de leurs propriétés : leur charge et leur masse moléculaire. Dans un premier temps, les protéines sont soumises à une électrophorèse dans un gel présentant un gradient de pH ; cette étape est appelée isoélectrofocalisation (IEF). Pour l'IEF, on utilise maintenant un gradient de pH immobilisé (IPG) qui permet une capacité de chargement en protéines dix fois plus importante que celle d'une IEF classique, la possibilité de réaliser des gradients de pH étalés sur seulement 1 à 2 unités pH [5] et la résolution des protéines basiques [6]. La standardisation des méthodes d'extraction et d'isolement des protéines est une condition sine qua none pour la bonne reproductibilité des résultats [5]. Dans un second temps, pour séparer les protéines selon leur masse, la seconde dimension est réalisée dans un gel réticulé constitué de polyacrylamide en présence d'un dénaturant, le sodium-dodécyl sulfate : SDS-PAGE (sodium-dodécyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). La révélation des protéines du gel au nitrate d'argent est mille fois plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie et permet donc la détection de signaux correspondants à 0,5 ng de protéines, mais l'intensité de coloration n'est pas proportionnelle à la quantité de protéines et la reproductibilité n'est pas excellente.

Analyse informatisée des gels 2D

La première étape de l'analyse est la numérisation des gels. Dans un second temps, les images obtenues sont quantifiées. Pour cela, divers logiciels (Mélanie II, Bio-Image, PDQuest) qui permettent d'éliminer le bruit de fond, les artefacts de migration et de comparer l'intensité des "spots" d'un gel à l'autre ont été développés.

Identification des protéines présentes dans les gels 2D : analyse en spectrométrie de masse

L'avancée majeure en termes de possibilité d'identification des protéines de gels 2D date de 1993-1994 et correspond à l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse et des bases de données. La spectrométrie de masse a permis de réduire considérablement les quantités de protéines nécessaires à l'identification. La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF) permet de réaliser une empreinte peptidique après digestion protéolytique et la spectrométrie de masse, en tandem en mode nanospray (MS-MS), permet d'obtenir une microséquence en acides aminés. Le développement de la robotisation et de l'automatisation des étapes concernant le prélèvement (du "spot") et la protéolyse, jusqu'à l'analyse en spectrométrie de masse, permet actuellement de réduire les risques de contamination et les variations dues à la préparation manuelle des échantillons et d'augmenter considérablement le nombre d'échantillons analysables par jour.

Limites actuelles de l'analyse protéomique

Alors qu'il y a un seul génome, il y a plusieurs protéomes, les gènes n'étant jamais exprimés tous en même temps, et les protéines subissant diverses modifications post-traductionnelles. Certaines protéines sont mal visualisées, il est en effet difficile d'extraire et de solubiliser l'ensemble des protéines en même temps. En particulier, les protéines hydrophobes telles que les protéines membranaires sont difficiles à solubiliser. De même, les protéines très basiques, telles que les histones et les protéines ribosomales, ne sont pas/peu visibles sur un gel 2D après une IEF classique. La sensibilité de la méthode ne permet pas la détection des protéines faiblement exprimées. L'analyse protéomique ne dispose pas de moyens d'amplification équivalents à la technique de PCR (*polymerase chain reaction*) pour l'analyse génomique. Cependant, des étapes de fractionnement cellulaire et/ou d'enrichissement sélectif (anticorps, colonne d'affinité) peuvent améliorer la détection des protéines faiblement exprimées.

Les puces à protéines

D'autres méthodologies sont développées actuellement dans le domaine de la protéomique avec différents systèmes d'isolement des protéines et d'analyse. Le système *SELDI-TOF Protein Chip* (Ciphergen, CA) (*SELDI-TOF: surface enhanced laser desorption/ionisation-time of flight*) est actuellement le plus utilisé. C'est une nouvelle approche

qui combine la chromatographie et la spectrométrie de masse et permet de donner rapidement un profil d'expression protéique pour des échantillons biologiques. Il est possible d'effectuer le profil protéique à partir de différentes sources biologiques comme le sérum, le plasma, le sang, les urines, les produits de sécrétion, etc. Le système implique la rétention des protéines sur une surface chromatographique et en phase solide. Il nécessite une quantité de protéines plus faible que celle requise pour des électrophorèses 2D. Les puces à protéines qui sont utilisées sont des plaques qui contiennent 8 ou 16 dépôts. Chaque surface est traitée de manière chimique (résidus hydrophobes, anions, cations, métaux) ou biochimique (anticorps, récepteurs, enzymes). Ces surfaces interagissent avec des protéines spécifiques tandis que celles traitées de manière chimique retiennent toutes les classes de protéines. Quelques microlitres d'échantillon sont déposés sur les plaques et retenus. On procède ensuite à un certain nombre de lavages pour augmenter la spécificité et on ajoute une solution contenant une molécule qui absorbe l'énergie. Le système de lecture est un spectromètre de masse de type LID (*laser desorption ionization*) TOF équipé d'une source laser UV. Les protéines sont visualisées sous forme de pics ; la taille du pic est proportionnelle à l'abondance de la protéine, le poids moléculaire figure en abscisse. On procède ensuite à une analyse informatique qui va comparer les différents électrophorégrammes pour identifier des protéines uniques spécifiques d'un échantillon.

Cancer du sein

En protéomique standard, nous avons montré des variations significatives des niveaux de protéines et, en particulier, une diminution du niveau de la protéine chaperonne 14-3-3 sigma dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales du sein [3]. D'autres études corroborent nos résultats [7-9]. Avec le système SELDI, l'identification de marqueurs protéiques a été réalisée aussi bien au niveau sérique [10, 11] que dans les fluides provenant d'aspirations mammelonnaires [12-14].

Analyse protéomique de tumeurs pour la recherche de nouveaux marqueurs pronostiques des cancers du sein sans envahissement ganglionnaire

Dans les cancers du sein, l'absence d'envahissement ganglionnaire (N-) est le facteur majeur de bon pronostic. Cependant, environ 20 % des patientes N- récidivent dans les 5 ans. L'objectif de notre étude est de rechercher, par analyse protéomique associant une électrophorèse bidimensionnelle (2D) et la spectrométrie de masse, des marqueurs moléculaires permettant de prédire l'apparition d'une récurrence précoce. Nous avons utilisé 20 cytosols préparés à partir de 20 cancers du sein sans envahissement ganglionnaire dont 10 ont récidivé moins de 3,5 ans après le diagnostic (classe R+) et 10 autres n'ont pas récidivé après plus de 8 ans (classe R-). Après coloration au nitrate d'argent des gels d'électrophorèse 2D des cytosols de cancer du sein, plus de 1 000 protéines sont visualisées (**figure 1**). La comparaison des niveaux d'expression des protéines entre les classes

R+ et R- met en évidence 17 protéines qui diffèrent significativement ($p < 0,0001$). La **figure 2** est une représentation schématique d'une analyse en composantes principales qui met en évidence que ces 17 protéines permettent de différencier les cancers des classes R+ et R-. Ces 17 protéines exprimées différemment dans les cancers R+ et R- ont été identifiées par spectrométrie de masse (résultats non montrés).

FIGURE 1. Gel d'électrophorèse 2D des protéines cytosoliques d'un cancer du sein.

À gauche, plus de 1000 protéines au total sont visualisées sur le gel. À droite, visualisation en 3D d'une partie du gel, grâce au logiciel d'analyse ImageMaster 2D platinumium.

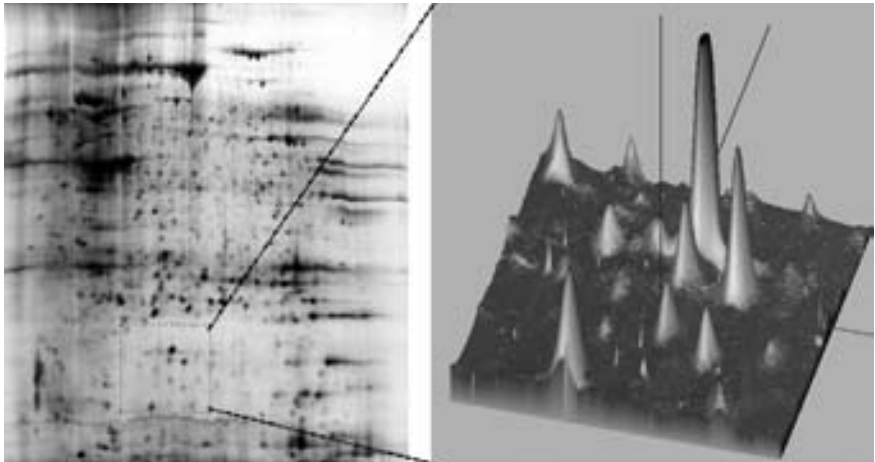
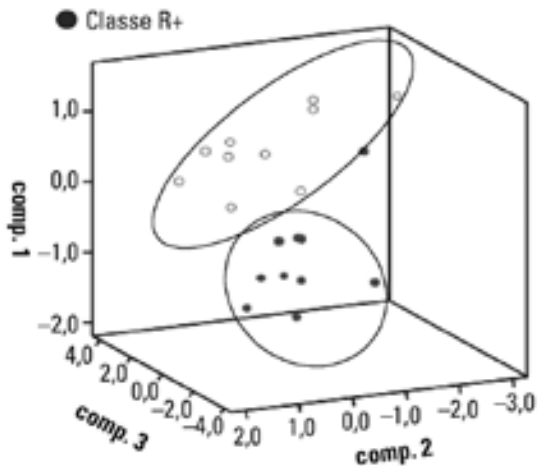


FIGURE 2. Représentation schématique de l'analyse en composantes principales réalisée en utilisant les 17 protéines exprimées de manière différentielle entre les classes R+ et R-.

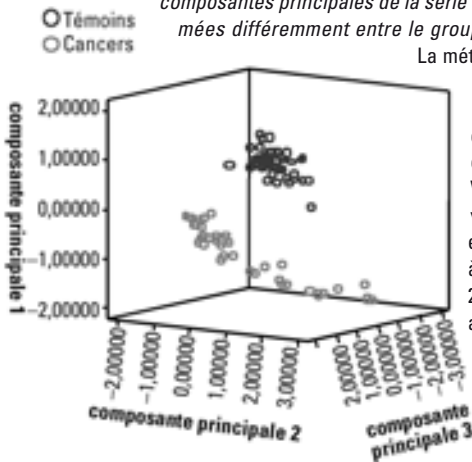
Les cytosols (100 µg de protéines) de cancers du sein ont été analysés par électrophorèse 2D. Les gels ont été numérisés et analysés avec le logiciel ImageMaster 2D platinumium, qui permet à la fois de déterminer le niveau d'expression des protéines et de comparer les gels entre eux (test de Mann-Whitney).



Exemple d'analyse protéomique de sérums pour la recherche de nouveaux marqueurs de dépistage précoce

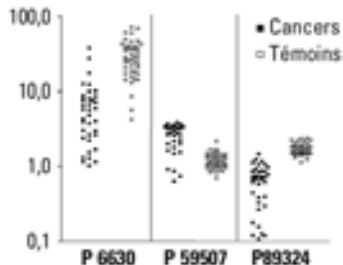
Notre objectif est l'évaluation de l'intérêt de l'analyse protéomique pour le dépistage précoce des cancers du sein dans une population à risque héréditaire. Nous présentons ici nos premiers résultats, consistant en l'établissement d'une signature protéomique de ces cancers. Nous avons utilisé la technologie SELDI-TOF. Dans la série d'apprentissage, on compare 49 sérums témoins (provenant de l'Établissement français du sang) à 49 sérums prélevés chez des femmes atteintes de cancer du sein primaire (soignées au Centre Oscar-Lambret). Nous avons choisi les barrettes IMAC nickel sur lesquelles on détecte 78 protéines ; 40 de ces protéines sont exprimées de manière significativement différente entre les deux groupes avec un rapport d'expression supérieur à 2. Une analyse en composantes principales (figure 3) met en évidence que ces protéines permettent de différencier les sérums "témoins" des sérums "cancers du sein". Trois de ces protéines (figure 4) permettent d'établir une signature caractéristique des cancers du sein. Il reste à valider cette signature à l'aide d'une série de tests.

FIGURE 3. Analyse protéomique des cancers du sein. Représentation schématisée de l'analyse en composantes principales de la série d'apprentissage, en utilisant 40 protéines exprimées différemment entre le groupe "témoins" et le groupe "cancers du sein".



La méthodologie SELDI-TOF a été utilisée. La mise en évidence de biomarqueurs potentiels résulte de la comparaison des intensités d'expression entre les groupes "cancers du sein" (49 sérums) et "témoins" (49 sérums) (test de Mann-Whitney). Nous avons choisi de considérer qu'il y avait une variation d'intensité significative entre les deux groupes lorsque p est inférieur à 0,01 et le rapport d'expression supérieur à 2 barrettes IMAC nickel ; sérums dénaturés avec Tris-HCl 50 mM pH9, urée 7M, thiourée 2M et chaps 2 % ; équivalent de 1 μ l de sérum déposé, matrice : acide sinapinique ; deux tirs laser basse et haute énergie.

FIGURE 4. Intensité d'expression des trois protéines servant à établir une signature (SELDI-TOF) des cancers du sein primaires.



Références bibliographiques

- [1] Kahn P. *From genome to proteome: looking at a cell's proteins.* Science 1995; 270:369-70.
- [2] Anderson NL, Anderson NG. *Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words.* Electrophoresis 1998; 19:1853-61.
- [3] Vercoutter-Edouard AS, Lemoine J, Le Bourhis X et al. *Proteomic analysis reveals that 14-3-3 sigma is down-regulated in human breast cancer cells.* Cancer Res 2001; 61:76-80.
- [4] Hondermarck H, Vercoutter-Edouard AS, Révillion F et al. *Proteomics of breast cancer for marker discovery and signal pathway profiling.* Proteomics 2001; 1 :1216-32
- [5] Rabilloud T, Charmont S. *Proteome research: Two-dimensional electrophoresis and identification methods.* in Rabilloud T (Ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, New-York. 2000; 107-26.
- [6] Görg A, Obermaier C, Boguth G et al. *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.* Electrophoresis 2000; 21:1037-53.
- [7] Dwek MV, Alaiya AA. *Proteome analysis enables separate clustering of normal breast, benign breast and breast cancer tissues.* Br J Cancer 2003;89:305-7.
- [8] Luo Y, Zhang J, Liu Y et al. *Comparative proteome analysis of breast cancer and normal breast.* Mol Biotechnol 2005;29:233-44.
- [9] Hudelist G, Singer CF, Pischinger KI et al. *Analysis in human breast cancer: identification of a characteristic protein expression profile of malignant breast epithelium.* Proteomics 2006;6:1989-2002.
- [10] Li J, Zhang Z, Rosenzweig J et al. *Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer.* Clinical Chemistry 2002; 48:1296-1304.
- [11] Goncalves A, Esterni B, Bertucci F et al. *Postoperative serum proteomic profiles may predict metastatic relapse in high-risk primary breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy.* Oncogene 2006;25:981-9.
- [12] Coombes KR, Fritsche HA Jr, Clarke C et al. *Quality control and peak finding for proteomics data collected from nipple aspirate fluid by surface-enhanced laser desorption and ionization.* Clinical Chemistry 2003;49:1615-23
- [13] Alexander H, Stegner AL, Wagner-Mann C et al. *Proteomic analysis to identify breast cancer biomarkers in nipple aspirate fluid.* Clin Cancer Res 2004;10:7500-10.
- [14] Sauter ER, Shan S, Hewett JE et al. *Proteomic analysis of nipple aspirate fluid using SELDI-TOF-MS.* Int J Cancer 2005;114:791-6.

REMERCIEMENTS

Ce travail est soutenu par le Fonds européen de développement régional, par une Action de recherche concertée d'initiative régionale (Conseil régional Nord-Pas-de-Calais), par le Comité départemental de l'Aisne de la Ligue nationale contre le cancer et par le Lions Club d'Armentières (Nord).