HAL
open science

Nouvelles données sur l'axe hepcidine-ferroportine par des méthodes d'analyses protéomiques

Marjorie Leduc

To cite this version:

Marjorie Leduc. Nouvelles données sur l'axe hepcidine-ferroportine par des méthodes d'analyses protéomiques. Biologie moléculaire. 2012. hal-01472760

HAL Id: hal-01472760

https://ephe.hal.science/hal-01472760v1

Submitted on 21 Feb 2017

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.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté par

MARJORIE LEDUC

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Nouvelles données sur l'axe hepcidine-ferroportine par des méthodes d'analyses protéomiques

soutenu devant le jury suivant :

Mme. **Catherine Paul** ***: Président***
Mr. **Luc Camoin*****: Tuteur scientifique***
Mme. **Sylvie Demignot** ***: Tuteur pédagogique***
Mme. **Virginie Redeker** ***:Rapporteur***
Mr. **Abdelkader Namane** ***: Examinateur***

Mémoire préparé sous la direction de : ***Luc Camoin (luc.camoin@inserm.fr)***
Laboratoire de : Plate forme Protéomique de Paris Descartes
(Institut Cochin - 22, rue méchain 75014 Paris)
Directeur : ***Patrick Mayeux***

et de : ***Sylvie Demignot (sylvie.demignot @crc.jussieu.fr)***
Laboratoire de : Pharmacologie cellulaire et moléculaire **Directeur : Jean Chambaz**
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

NOUVELLES DONNEES SUR L'AXE HEPCIDINE-FERROPORTINE PAR DES METHODES D'ANALYSES PROTEOMIQUES

MARJORIE LEDUC

RÉSUMÉ

L'hepcidine est une hormone présentant un rôle essentiel dans l'homéostasie du fer. Elle agit sur la ferroportine : un transporteur membranaire du fer. Ce transporteur est présent à la surface des macrophages (cellules intervenant dans le recyclage de l'hème érythrocytaire) et des cellules absorbantes du duodénum : les entérocytes (point d'entrée du fer alimentaire). La ferroportine permet l'absorption et le recyclage du fer. Pour maintenir un taux de fer non toxique pour l'organisme, l'hepcidine se lie à la ferroportine et induit son internalisation puis sa dégradation. Un défaut d'homéostasie du fer peut engendrer de très diverses maladies telles qu'une hémochromatose ou une anémie microcytaire hypochrome. L'étude des 2 protagonistes du maintien de l'homéostasie du fer (ferroportine et hepcidine) permettra d'identifier des cibles thérapeutiques.

Ce projet porte, d'une part, sur l'étude de l'effet du fer sur la formation des ponts disulfures de l'hepcidine, et d'autre part, sur l'identification des partenaires sériques de l'hepcidine. Nous avons aussi étudié le signal de dégradation de la ferroportine. Pour ces trois problématiques, l'approche réalisée est une approche protéomique par spectrométrie de masse.

L'étude in vitro *portant sur la formation des ponts disulfures de l'hepcidine a montré qu'en présence de fer, les ponts disulfures s'oxydent plus rapidement qu'en absence de fer. Ceci montre que le fer est un catalyseur du repliement tridimensionnel de l'hepcidine. Il reste à démontrer si cette observation existe* in vivo.

L'étude des partenaires sériques de l'hepcidine a mis en évidence l'alpha 2 macroglobuline, la protéine C3 du complément, la Glycosyl PhosphatidyLinositol phospholipidase D1, le plasminogène et une protéine encore non caractérisée. L'albumine, bien que peu spécifique, a aussi été détectée comme étant un transporteur potentiel de l'hepcidine dans le sérum.

Enfin, l'étude quantitative des Rafts lipidiques contenant la ferroportine a montré que Skap2 et Fyb (2 kinases) étaient recrutés de façon précoce dans ces microdomaines en présence de Fer et diminués en présence d'hepcidine, au même titre que la ferroportine. Ce phénomène suggère qu'il s'agit de partenaires de la ferroportine et que des systèmes de phosphorylation peuvent être impliqués lors de l'internalisation de la ferroportine. Par ailleurs, nous avons observé le même profil quantitatif que la ferroportine avec l'hèmoxygénase 1. Il est connu que cette protéine est régulée transcriptionnellement par l'hème, mais notre étude révèle qu'elle est aussi directement augmentée par le fer dans les rafts.

MOTS-CLÉS : *Hepcidine, Ferroportine, Spectrométrie de masse, Protéomique, iTRAQ*

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations **6**
Table des illustrations **8**

1 INTRODUCTION 10
1.1 Les molécules clés du métabolisme du fer 11
1.1.1 Généralités 11
1.1.2 La ferroportine 11
1.1.2.1 La ferroportine : un transporteur au coeur du métabolisme de fer ***11***
1.1.2.2 Localisation subcellulaire de la ferroportine : les RAFTS lipidiques ***13***
1.1.3 L'hepcidine 15
1.1.3.1 Hepcidine : l'hormone de régulation de l'excès de fer sérique ***15***
1.1.3.2 Structure de l'hepcidine ***16***
1.1.4 Désordres engendrés par un défaut d'homéostasie du fer **17**
1.2 Approche Protéomique 18
1.2.1 Généralités 18
1.2.2 Spectrométrie de masse 19
1.2.2.1 Ionisation MALDI ***21***
1.2.2.2 Analyseur TOF ***21***
1.2.2.3 Fragmentation CID et MS/MS ***23***
1.2.3 Approche Protéomique de type Bottom-Up 23
1.2.4 Couplage chromatographie Liquide / spectrométrie de masse (LC-MS) **25**
1.2.5 Principe de préfractionnement peptidique 26
1.2.6 Quantification iTRAQ 29
1.2.6.1 Les réactifs iTRAQ ***29***
1.2.6.2 Conditions de réaction ***32***
1.3 Objectifs 33

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Desoxyribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique Messager
BCA	Acide BicinChoninique
CHAPS	Acide 3[(3-CHolamidopropyl)dimethylAmmonio]-PropaneSulfonique
CHCA	Acide _-Cyano-HydroxyCinnamique
CID	Dissociation induite par collision (*Collision Induced Dissociation*)
cMH1	Hepcidine Murine Cyclique avec un pont disulfure
Da	Dalton
DHB	Acide DiHydroxyBenzoïque
DMEM	*Dulbecco/Vogt modified eagle's Minimal Essential Medium*
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DMT1	*Divalent Metal Transporter 1*
DRM	*Detergent Resistant Membrane*
ECL	*Enhanced ChemiLuminescent*
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tetra Acetique
emPAI	*Exponentially Modified Protein Abundance Index*
ESI	Electrospray
ETD	Dissociation par transfer d'électron (*Electron Transfer Dissociation*)
FeII	Fer dichargé réduit
FeIII	Fer trichargé oxydé
Fe-NTA	Fer - Nitrilo-TriAcétate
Fmoc	9-FluorenylMethylOxyCarbonyl
Fpn	Ferroportine
GPI-Cp	Glycosyl Phosphatidylinositol - Céruloplasmine
Gpld1	Glycosyl PhosphatidyLinositol phospholipidase D1
HCD	Dissociation par collision haute énergie (*High energy Collision Dissociation*)
HCl	Acide Chloridrique
HEPES	Acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique
HH1	Hepcidine Humaine avec un pont disulfure
HH1-Biot	Hepcidine Humaine avec un pont disulfure et biotinylé
HH1F	Hepcidine Humaine avec un pont disulfure et un groupement Fluorescent
ICAT	*Isotope-Coded Affinity Tag*
IG- _	Immunoglobuline - _
IPG	gradient de pH immobilisé (*Immobilised pH Gradient*)
IPI	*International Protein Index*
iTRAQ	*Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*
KO	*Knock Out*
LASER	*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*
LC	Chromatographie Liquide (*Liquid Chromatography*)
m/z	Rapport masse sur charge d'un ion
MALDI	*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*
MES	Acide 2-(N-Morpholino)Ethane Sulfonique
MMTS	Methyl MethaneThioSulfonate
MS	Spectrométre de masse (*Mass Spectrometry*)

MSA Sérum Albumine de souris (*Mouse Serum Albumin*)
MSMS Spéctrométrie de masse en mode tandem (*Tandem Mass Spectrometry*)
NaCl Chlorure de Sodium
NDRM *Non Detergent Resistant Membrane*
NHS N-HydroxySuccinimide
PBS Tampon phosphate salin (*Phosphate Buffered Saline*)
pHi pH isoélectrique ou point isoélectrique
PMSF PhenylMéthaneSulfonyl Fluoride
ppm Partie Par Million
PVDF PolyVinylidene Fluoride
Q Quadrupôle
RMN Résonnance Magnétique Nucléaire
SA Acide Sinapinique
SCX Chromatographie échangeuse de cation (*Strong Cation Exchange Chromatography*)
SDS Sodium DodecylSulfate
SILAC *Stable Isotope Labeling with Amino acids in cell Culture*
TCEP Tris-(2-CarboxyEthyl) Phosphine
TEAB TPhrio-Espthhyinl eAmmonium Bicarbonate
TFA Acide TrifluoroAcétique
TfR1 *Transferine Receptor 1*
TIS *Time Ion Selector*
TOF Temps de vol (*Time Of Flight*)
%Cov Pourcentage de couverture d'une protéine

INTRODUCTION

1.1 Les molécules clés du métabolismes de fer

1.1.1 Généralités

Le fer est essentiel dans de nombreux processus cellulaires. C'est en particulier le cas de l'érythropoïèse, qui nécessite un apport en fer conséquent pour la synthèse de l'hème. Cependant, le fer intervient aussi dans la synthèse de la myoglobine des cellules musculaires ainsi que dans celle des cytochromes P450, qui interviennent en particulier dans les processus de détoxification (Van Waterschoot RA et al 2011).

Les deux principales sources de fer de l'organisme sont le bol alimentaire (absorption du fer par les entérocytes matures au niveau du duodénum) et le recyclage du fer provenant d'érythrocytes sénescents (ces érythrocytes sont phagocytés par les macrophages situés au niveau de la moelle osseuse, du foie et des reins). Ainsi, les macrophages sont les cellules de stockage du fer. Lorsque l'organisme nécessite du fer, les macrophages le rejettent dans la circulation sanguine. Le fer sérique émis par les macrophages et les entérocytes est pris en charge par des protéines de transport spécifiques. Le fer sanguin existe minoritairement sous forme hémique. Il provient de la libération des hèmes lors de la lyse intravasculaire des érythrocytes (Nielsen MJ et al, 2010).

L'équilibre entre l'absorption du fer par les entérocytes, son recyclage, son stockage ainsi que le taux de fer circulant constituent l'homéostasie du fer. Parmi les intervenants de l'homéostasie du fer, la ferroportine tient un rôle central car l'exportation du fer macrophagique se fait au travers de ce transporteur chez les mammifères.

1.1.2 La ferroportine

1.1.2.1 La ferroportine : un transporteur au coeur du métabolisme de fer

La ferroportine est une protéine transmembranaire dont la structure est encore mal connue. Les études actuelles portant sur ce sujet sont basées sur des modèles prédictifs et non pas sur des mesures physiques. Les avis divergent sur la structure tertiaire et quaternaire de cette protéine. Selon les modèles, elle présente 9 à 12 domaines transmembranaires (Liu XB et al, 2005 ; Gonçalves AS et al, 2006). La question de l'oligomérisation ou non de la ferroportine n'est pas non plus tranchée (De Domenico I et al, 2007 ; Gonçalves AS et al, 2006). L'expression de la ferroportine est induite par l'érythrophagocytose ou par une carence en fer et réprimée en cas de réponse inflammatoire (Goncalves A et al, 2005).

La ferroportine est le seul exportateur de fer connu chez les mammifères. Le gène de la ferroportine porte le nom de Slc40a1 pour « Solute Carrier family 40 (transporteurs régulés par le fer) - premier membre ». Il est localisé sur le chromosome 2 (locus 2q32). La ferroportine intervient également au niveau de l'absorption du fer par les entérocytes du duodénum (McKie AT et al, 2000).

Initialement, le fer passe de la lumière intestinale au milieu intracellulaire des entérocytes par l'intermédiaire de la protéine de transport DMT1 (Divalent Métal Transporter 1). Cette dernière est exprimée au pôle apical des entérocytes. Selon les besoins, le fer alimentaire sera soit stocké par la ferritine, soit transféré vers la circulation sanguine via la ferroportine. A cette fin, la ferroportine est exprimée au pôle basal des entérocytes. Elle transporte le fer sous forme ferreuse Fe^{2+} du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Une fois exporté, il semble que le Fe^{2+} soit d'abord oxydé sous forme ferrique Fe^{3+} par l'héphaestine avant d'être pris en charge par la transferrine plasmatique (Vulpe CD et al, 1999 ; Kuo YM et al, 2004).
Le fer est alors utilisé dans la moelle osseuse pour synthétiser l'hème des futurs érythrocytes. Après 120 jours, les érythrocytes matures arrivent en fin de vie, ils entrent en sénescence et envoient des signaux stimulant leur phagocytose par les macrophages tissulaires environnants (Shinozuka T, 1994).

La phagocytose conduit à la dégradation de l'hème. Cette dernière nécessite notamment l'intervention de l'Hème- Oxygénase 1 au cours du catabolisme de l'hème (Delaby C et al, 2005 ; Tenhunen R et al, 1970). Le fer provenant de l'hème peut être stocké par la ferritine (protéine membranaire) et l'hémosidérine (Harrison PM et al, 1996), ou bien, si les ressources en fer ont besoin d'être mobilisées, il sera de nouveau exporté vers la circulation sanguine via la ferroportine exprimée à la surface des macrophages. Là encore le Fe^{2+} exporté par la ferroportine doit être oxydé en Fe^{3+} pour être pris en charge par la transferrine. Au niveau des macrophages, c'est la céruloplasmine qui oxyde le Fe^{2+} en Fe^{3+} (Hellman NE et al, 2002). La transferrine conduira le fer à la moelle osseuse afin qu'il soit de nouveau utilisé au cours de l'érythropoïèse. C'est le recyclage du fer par les macrophages.

Il est à noter que les macrophages ne sont pas seulement capables d'intégrer le fer provenant des hématies phagocytées mais aussi le fer sous d'autres formes telles que le fer lié à la transferrine sérique par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

1.1.2.2 Localisation subcellulaire de la ferroportine : les RAFTS lipidiques

Les microdomaines ou rafts lipidiques sont définis comme étant des domaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides. Il s'agit de plateformes spécialisées dans la régulation de processus cellulaires tels que le trafic membranaire ou la signalisation (Mishra S et al, 2007 ; Foster LJ et al, 2007).

Les protéines ancrées à la membrane par un groupement GPI (Glycosyl phosphatidylinositol) sont connues pour être présentes dans ces microdomaines. Des travaux ont montré une colocalisation de la céruloplasmine à ancre GPI (GPI-Cp) avec la ferroportine à la surface d'astrocytes (Dringen R et al, 2007). Par ailleurs, les macrophages de la moelle osseuse expriment eux aussi la GPI-Cp (De Domenico I et al, 2007). De plus, des travaux d'immuno-fluorescence antérieurs (Delaby C et al, 2005) ont montré que la ferroportine se regroupe dans des domaines de la membrane plasmique en présence de fer.

L'ensemble de ces observations suggère que la ferroportine contenue dans des vésicules intracellulaires se regroupe dans des microdomaines à la surface des cellules lors d'une surcharge en fer (Auriac A et al, 2010).

Cette hypothèse a été vérifiée après isolement des rafts et analyse par Western Blot (Auriac A et al, 2010). Les microdomaines sont physiquement isolés des autres compartiments cellulaires à l'aide d'un gradient de saccharose ou d'iodixanol. Il existe de nombreux protocoles de purification des rafts utilisant des détergents ou non. Après optimisation, il

semble que l'utilisation d'un gradient iodixanol discontinu en présence de triton X-100 serait le meilleur moyen d'isoler les rafts DRM (Detergent Résistant Membrane). Il apparaît que la distribution de la ferroportine dans les différentes fractions obtenues se superpose avec celle de protéines spécifiques des rafts lipidiques telle que la cavéoline 1. La ferroportine est donc localisée dans les rafts lipidiques type DRM.

On distingue les DRM1, plus riches en cholestérol regroupant les fractions 1 à 4 du gradient iodixanol enrichies en cavéoline et flotilline, des DRM2 regroupant les fractions 5 à 8 et présentant de la céruloplasmine sous traitement au Fer-NTA. Le récepteur à la transferrine, qui est un marqueur de fraction non raft, est présent dans les fractions DRM2. Ceci suggère que les DRM2 ne contiennent pas que des protéines associées aux rafts.

1.1.3 L'hepcidine

1.1.3.1 Hepcidine : l'hormone de régulation de l'excès de fer sérique

L'accumulation de fer est une source de radicaux libres. Il s'agit de composés particulièrement réactifs et donc extrêmement toxiques pour l'organisme. Le fer est donc à la fois un élément indispensable et toxique pour l'organisme. Ceci implique une homéostasie finement régulée entre les différents compartiments physiologiques. Le taux de fer sérique et le stockage du fer intracellulaire sont en grande partie liés à l'activité de la ferroportine. Celleci est régulée par une hormone mise en évidence en 2001 : l'hepcidine (Park CH et al, 2001).

Il a été démontré que l'hepcidine était secrétée principalement par les hépatocytes et éliminée dans les urines. Néanmoins, d'autres tissus tels que le rein, la rate, les cellules cardiaques et les macrophages semblent aussi participer à sa synthèse par des mécanismes encore peu explorés (Chen MZ et al, 2010 ; Chen SL et al, 2007).

La production d'hepcidine est influencée par divers stimuli tels qu'une augmentation du taux de fer sérique (Pigeon C et al, 2001), une anémie ou une hypoxie tissulaire (Nicolas G et al, 2002). Par ailleurs, une réaction inflammatoire ou une infection ont la capacité d'induire fortement la production d'hepcidine (Nicolas G et al, 2002). Le rôle de l'hepcidine dans les réactions inflammatoires ou les infections s'explique par la nécessité d'une source de fer pour la survie de nombreux êtres vivants. Par conséquent, la diminution du fer disponible dans l'environnement des microorganismes infectants, voire de cellules cancéreuses, constitue un moyen de défense de l'organisme.

L'hepcidine régule le taux de fer sérique (Nicolas G et al, 2001). Ainsi, elle inhibe l'exportation du fer intracellulaire vers la circulation sanguine et favorise le stockage du fer dans les cellules spécialisées telles que les macrophages, les entérocytes ou encore les hépatocytes (Nemeth E et al, 2004). Elle a pour cible la ferroportine. La fixation de l'hepcidine à cette protéine de transport induit son internalisation ainsi que sa dégradation (Nemeth E et al, 2004 ; Ramey G et al, 2010). Le fer n'étant plus exporté, il est alors stocké dans les cellules et le taux de fer sérique diminue.

Les mécanismes moléculaires participant à la signalisation de l'internalisation de la ferroportine ainsi qu'à sa dégradation en réponse à la présence d'hepcidine sont encore peu connus. Des travaux ont montré que, dans un premier temps, la fixation de l'hepcidine induirait sa phosphorylation puis son internalisation, ubiquitinylation et enfin sa dégradation par les lysosomes (De Domenico et al, 2007).

1.1.3.2 Structure de l'hepcidine

Il s'agit d'un peptide de 25 acides aminés avec un très fort pourcentage en résidu cystéine (Nicolas G et al, 2002). Les séquences de l'hepcidine humaine et murine sont indiquées ci-dessous :

Hepcidine humaine : DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCCKT

Hepcidine murine : DTNFPICIFCCKCCNNSQCGICCKT

Contrairement à la ferroportine, la structure tertiaire de l'hepcidine est connue. Des travaux de RMN (Hunter HN et al, 2002) ont montré qu'elle est extrêmement structurée. En effet, l'hepcidine est repliée sur elle-même par une boucle et forme un feuillet béta antisens. Ce feuillet béta lui confère un caractère amphipathique typique des peptides antimicrobiens et antiphongiaux. Ce caractère est en adéquation avec le rôle de l'hepcidine dans les infections. Le repliement de l'hepcidine est stabilisé par la présence de 4 ponts disulfures (respectivement entre les cystéines C1 et C8, C2 et C7, C3 et C6, C4 et C5) lui conférant une structure cyclique. Ainsi, toutes les cystéines sont incluses dans un pont disulfure.

1.1.4 Désordres engendrés par un défaut d'homéostasie du fer

Les désordres dans l'homéostasie du fer font partie des maladies rencontrées le plus fréquemment chez l'homme. Un déséquilibre entre absorption et déficit en fer peut engendrer de très diverses maladies et provenir de causes très variées. On peut les classer en deux souscatégories : les maladies mettant en cause un déficit en fer et celles mettant en cause un excès de fer.

Parmi les maladies impliquant une surcharge en fer existe l'hémochromatose héréditaire. Le fer alimentaire est hyper absorbé et accumulé dans les tissus. Il existe 4 types d'hémochromatoses héréditaires. Toutes présentent une augmentation du taux de fer sérique ainsi qu'une hémosidérose (surcharge en fer) au sein de tissus plus ou moins spécifiques du type d'hémochromatose.

L'hémochromatose de type 2 ou hémochromatose juvénile est une des formes les plus sévères et fait son apparition dès l'enfance. C'est une maladie autosomique récessive rare dans laquelle 2 gènes peuvent être mutés : le gène codant pour l'hémojuvéline et celui codant pour l'hepcidine. Ces mutations provoquent respectivement des hémochromatoses de type 2a et 2b. L'hypohepcidinémie engendrée par ces mutations sous-entend une non répression de la ferroportine et se traduit par une absorption intestinale excessive du fer et sa libération accrue dans la circulation sanguine.

L'hémochromatose de type 4 ou maladie de la ferroportine est plus fréquente que l'hémochromatose de type 2. Il s'agit d'une maladie autosomique dominante dont le moment d'apparition au cours de la vie est variable. Il en existe 2 sous-types, tous deux engendrés par une mutation de la ferroportine. Cependant, leurs mécanismes sont différents. La forme 4a résulte d'une perte de fonction de la ferroportine : le fer n'est plus exporté et s'accumule dans les macrophages. En revanche, la forme 4b résulte d'un gain de fonction de la ferroportine et son diagnostic biochimique ressemble davantage aux autres types d'hémochromatose. En effet, la ferroportine mutée est insensible à l'inhibition par l'hepcidine et les macrophages exportent davantage de fer dans la circulation sanguine que des macrophages non mutés.
L'anémie microcytaire hypochrome héréditaire, quant à elle, implique un déficit en fer. Elle aussi présente une mutation de la ferroportine (Donovan A et al, 2000). Cette mutation a pour

conséquence l'incapacité de la ferroportine à exporter le fer. Dans une anémie hypochrome, ce phénomène résulte en une diminution du taux de fer dans l'organisme empêchant ainsi la production d'hémoglobine en quantité suffisante.

1.2 Approche Protéomique

1.2.1 Généralités

Pour répondre à ces problématiques qualitatives et quantitatives, une approche protéomique sans a priori est tout à fait appropriée. La protéomique est la science qui étudie le protéome. Le protéome est défini comme l'ensemble des protéines présentes à un instant « t » dans un échantillon biologique dans des conditions données. Le terme « protéome » a été introduit en 1994 (Kahn P, 1995 ; Wilkins MR et al, 1996). La protéomique est une méthode sans hypothèses permettant ainsi de trouver des mécanismes inattendus. Une approche protéomique peut s'employer dans de nombreuses questions biologiques. Cette diversité d'application peut aller de la découverte des partenaires d'une protéine, à l'étude d'une expression différentielle entre deux conditions, en passant par la validation d'une méthode de purification.

La protéomique, la transcriptomique et la génomique sont trois disciplines apportant des informations différentes sur une cellule et s'inscrivent dans ce qui est appelé la biologie systématique. En génomique, le matériel d'étude est l'ADN et les données obtenues sont constantes et propres à un individu d'une espèce donnée. A l'inverse, le transcriptome et le protéome sont dynamiques et évoluent au sein même d'un individu. Ils dépendent notamment de l'état physiologique de l'individu, de son âge, du type cellulaire étudié, du stade de ces cellules dans le cycle cellulaire etc. La transcriptomique étudie l'ARN, et la protéomique les protéines.

Il est à noter que la quantité d'une protéine dans une cellule dépend de la quantité de son ARNm présent mais n'est pas directement proportionnelle à ce dernier (Hack CJ. 2004). En effet, plusieurs facteurs entrent en jeu. Tout d'abord, le taux d'ARNm qui est régulé selon l'expression du gène correspondant (implication d'activateurs et de répresseur spécifiques), ensuite, la demi-vie de l'ARNm qui est un indicateur de la stabilité de l'ARNm. Enfin, la traductibilité intervient aussi sur le niveau d'expression d'une protéine. Elle dépend de l'affinité de l'ARNm pour la machinerie de traduction (ribosome, ARNt) et de la conformation 3 dimensions de l'ARN. Par ailleurs, pour une protéine donnée, les modifications post-traductionnelles (clivage, phosphorylation, déphosphorylation, glycosylation…) ont un rôle très important dans sa fonction et son activité.

Les modifications post-traductionnelles induisant des modulations de l'activité d'une protéine ne sont pas décelables par transcriptomique, mais elles le sont par une approche protéomique. La protéomique donne une représentation du fonctionnement cellulaire plus proche de la réalité à un instant « t » que la transcriptomique et la génomique qui renseignent davantage sur l'expression et la régulation de l'expression des protéines.

1.2.2 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse constitue une technique de base pour répondre aux problématiques protéomiques. Un spectromètre de masse est un instrument mesurant les rapports m/z de chaque composé ionique d'un mélange (m représente la masse et z la charge d'un ion). On obtient des spectres représentant les intensités mesurées en fonction des différents m/z.

Il existe de nombreux types de spectromètres de masse basés sur différents principes mais ils possèdent tous au moins : une source d'ions, un analyseur et un détecteur. Les molécules à analyser sont ionisées par la source d'ions. Les deux plus usuelles en protéomique sont la source MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) et l'ESI (ElectroSpray Ionisation). L'analyseur va séparer les ions créés selon divers procédés en fonction de leur m/z. Le principe de l'analyseur Time Of Flight (TOF) sera détaillé ultérieurement mais il existe d'autres types d'analyseurs (Quadrupôle et OrbiTrap).

Enfin, le détecteur va suivre les signaux électriques fournis par les ions. Par l'intermédiaire de calculs informatiques, ces signaux électriques sont traduits en un spectre MS. La précision de mesure est mesurée en ppm (partie par million) et dépend du type d'analyseur du spectromètre de masse.

La spectrométrie de masse en tandem, ou MSMS, est basée sur la fragmentation d'un précurseur. Un précurseur correspond à un rapport m/z sélectionné sur un spectre MS. Là encore, il existe différents types de fragmentation (CID, HCD, ETD…). Les fragments ainsi obtenus passent, à nouveau, dans un analyseur et le détecteur va permettre de reconstituer un spectre MSMS. Le spectromètre de masse utilisé dans le cadre de ce projet est un MALDITOF- TOF. Le principe de cet appareil est décrit ci-dessous.

1.2.2.1 Ionisation MALDI

En MALDI (Matrix Assisted Laser Desorbtion Ionisation), l'échantillon est déposé avec une matrice sur une plaque métallique appelée plaque ou cible MALDI. Grâce à la matrice, des cristaux se forment renfermant les molécules à ioniser. Puis des tirs laser sont effectués sur le dépôt. La matrice a pour rôle d'absorber les rayonnements laser et de transmettre cette énergie aux molécules d'interêt en les chargeant (Karas M et al, 1988). On obtient alors un nuage d'ions et de molécules neutres. Un potentiel électrique permet d'envoyer les ions vers l'analyseur. La source comme le reste de l'appareil est sous vide poussé (10-7 Torr) permettant d'augmenter la durée de vie des ions générés.
La forme, la couleur des cristaux ainsi que la puissance laser à fournir pour obtenir une bonne ionisation dépendent de la matrice utilisée : CHCA (acide _-Cyano- HydroxyCinnamique), SA (Acide Sinapinique), DHB (Acide DiHydroxyBenzoïque). Le plus souvent une ionisation MALDI donne des espèces monochargées z=1. Les m/z observés correspondent donc à la masse de la molécule additionnée d'un proton apporté par la matrice lors de l'ionisation $(M+H)^+$.

1.2.2.2 Analyseur TOF

Avec un analyseur TOF ou Time Of Flight, les m/z sont calculés à partir du temps de parcours des ions dans un tube sous vide. Les ions sont tout d'abord accélérés dans une zone d'accélération à l'aide d'un potentiel électrique. La vitesse acquise par les ions grâce à ce potentiel dépend de leur masse et de leur charge. Plus un ion est léger, plus la vitesse acquise sera élevée. Inversement, plus l'ion est lourd, plus la vitesse acquise sera faible. Les ions entrent alors dans une zone hors champ électrique de longueur fixe et connue. Ils parcourent librement le tube sous vide. Le temps de parcours est donc inversement proportionnel à la vitesse acquise par les ions et a fortiori à leur rapport m/z.

Certains analyseurs TOF sont linéaires et d'autres possèdent un réflectron. Dans un TOF linéaire, le détecteur se trouve dans l'alignement de la zone d'accélération. La ligne de parcours des ions est une droite. La longueur du parcours est égale à la longueur du TOF. Un réflectron est constitué d'électrodes annulaires empilées possédant un potentiel électrique

statique permettant d'inverser la direction des trajectoires des ions qui pénètrent le champ électrique. Il s'agit donc d'un « miroir sur lequel les ions vont rebondir ».

Le détecteur se trouve à côté de la zone d'accélération. La ligne de parcours des ions est donc en forme de « U » et la longueur du parcours est égale à environ le double de longueur du TOF. Le réflectron permet une augmentation de la distance parcourue par les ions et améliore ainsi la résolution de l'analyseur. Par ailleurs, le virage effectué par les ions de même m/z dans le réflectron va permettre de réduire les légères différences d'énergie cinétique acquises dans la zone d'accélération.

1.2.2.3 Fragmentation CID et MS/MS

Une fois la MS simple réalisée, le spectre obtenu est analysé et des précurseurs sont choisis en fonction d'un certain nombre de critères (Signal sur bruit par exemple). Le dépôt va de nouveau être soumis à des pulses laser et les ions obtenus sont accélérés une première fois avant d'être envoyés dans le premier TOF. Au bout du premier TOF se trouve une structure appelée TIS (Time Ion Selection) qui permettra de sélectionner le m/z d'un des précurseurs choisis pour ce dépôt. Le TIS va jouer le rôle d'un portail de potentiel s'ouvrant pour laisser passer les précurseurs de m/z choisis. Le précurseur va alors entrer dans une cellule de collision appelée CID (Collision Induced Dissociation). Contrairement au TOF, cette cellule n'est pas sous un vide aussi poussé que le reste de l'appareil. En effet, une faible pression d'air existe à l'intérieur du CID. Les molécules d'azote vont entrer en collision avec le précurseur et le fragmenter. Ensuite, une seconde accélération est appliquée aux fragments obtenus afin de leur attribuer eux aussi une vitesse proportionnelle à leur masse et à leur charge. Une fois accélérés, ils passent dans le second TOF qui va permettre de séparer les ions nouvellement formés. Le détecteur va enregistrer leur temps de vol et un traitement informatique va les traduire en m/z sur un spectre MSMS. Cette fragmentation est alors répétée sur les autres précurseurs choisis, c'est ce qu'on appelle le cycle MS, MSMS.

1.2.3 Approche Protéomique de type Bottom-Up

La mesure de masse en MS simple est un bon moyen de vérifier la qualité des hepcidines synthétisées. En ce qui concerne les études de protéomes complexes provenant de rafts macrophagiques ou de pull-down sériques, la MS simple n'est pas applicable, il sera nécessaire de réaliser de la MSMS sur échantillon protéique après digestion enzymatique. En effet, les protéines entières présentent des difficultés d'analyse par spectrométrie de masse. En MALDI, elles sont difficilement ionisables en raison de leur grande taille. Cependant certaines matrices sont plus adaptées à l'ionisation de grosses molécules que d'autres. C'est le cas de la matrice à base d'acide sinapinique. Par ailleurs, plus les m/z détectés sont élevés, plus l'erreur de mesure l'est aussi.

En MS, une molécule forme un ensemble de pic avec 1Da d'écart. Cet ensemble est appelé massif isotopique. Le premier pic est appelé le pic monoisotopique et correspond au signal de la molécule constituée uniquement d'isotopes légers (ex : xC_{12}), le second présente un neutron supplémentaire (ex : (x-1) C_{12} et $1C_{13}$), le troisième présente 2 neutrons supplémentaires (ex : (x-2) C_{12} et $2C_{13}$) etc. La détection du pic monoisotopique est impossible au delà d'un certain nombre de carbones car il disparaît du massif isotopique. Or, la détection du pic monoisotopique est essentielle pour la mesure d'une masse précise. L'approche bottom-up pallie ces difficultés. Elle est basée sur une digestion enzymatique du mélange protéique. Cette digestion va hydrolyser les protéines en peptides.

Pour améliorer cette digestion, il est nécessaire de dénaturer les protéines par réduction des ponts disulfure puis de bloquer les cystéines libérées par alkylation. La dénaturation apporte notamment une meilleure accessibilité des sites de coupure à l'enzyme de digestion. Une fois digérés, la grande majorité des peptides auront une masse comprise entre 800 et 4000 Da, ils seront alors facilement ionisables en MALDI et possèderont un nombre de carbones compatible avec la détection du pic monoisotopique. La mesure de masse sur des peptides sera donc plus précise que sur des protéines entières.
De nombreuses enzymes peuvent être utilisées mais la plus courante est la trypsine. Il s'agit d'une enzyme protéolytique qui, en milieu basique, hydrolyse spécifiquement en Cterminal des acides aminés basiques (Lysine et Arginine). La digestion trypsique réalisée in-gel sur des bandes choisies de gel électrophorétique (c'est le cas de la première série d'analyse pull-down) ou en solution (c'est le cas de la deuxième série d'analyse pull-down).

En MS simple, on obtient des empreintes peptidiques massiques. Il s'agit de la liste des m/z correspondant à chaque peptide de chaque protéine. La masse d'un peptide, bien qu'étant précise, ne suffit pas systématiquement à l'associer à une seule protéine. C'est pour cette raison qu'en plus de la MS simple, l'identification des protéines est plus facile avec l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) (Clauser KR et al, 1995).

La fragmentation va produire des ruptures des liaisons peptidiques spécifiques du mode de fragmentation. Les principales coupures se trouvent au niveau des liaisons peptidiques : certaines entre le carbone et l'azote intervenant dans la liaison peptidique (ion b et y selon le côté où se trouve la charge après coupure), d'autres entre l'azote intervenant dans la liaison peptidique et le carbone _ portant la chaîne latérale (ion c et z selon le coté où se trouve la charge après coupure). Une fragmentation en CID créera préférentiellement des ions b et y, tandis qu'une fragmentation ETD apportera plutôt des ions c et z.

Sur un spectre MSMS, la différence entre l'ion y2 et l'ion y3 correspond à la masse du second acide aminé du peptide en partant de l'extrémité C-terminale. En calculant ainsi les écarts de masse entre les ions d'un spectre MSMS, on peut reconstituer la séquence du peptide fragmenté.

Les séquences obtenues sont beaucoup plus spécifiques d'une protéine que les masses des peptides obtenus par MS simple. En les comparant à une banque de données de séquences protéiques, on peut alors définir de façon beaucoup plus fiable les protéines présentes dans l'échantillon de départ. Cette technique est utilisée pour identifier les protéines provenant d'une bande de gel électrophorétique.

1.2.4 Couplage chromatographie Liquide / spectrométrie de masse (LC-MS)

Lorsqu'un protéome complexe est étudié, c'est-à-dire un protéome constitué de plusieurs protéines différentes, une analyse directe du digestat en spectrométrie de masse n'est pas suffisante. Comme indiqué précédemment, malgré la haute résolution des appareils, il n'est pas rare que plusieurs peptides aient la même masse. La sélection d'un précurseur entraîne la sélection d'un mélange de peptides pratiquement isobariques. Le spectre MSMS obtenu devient difficile à analyser car il présente les fragments provenant de plusieurs peptides de m/z proches. Par ailleurs, plus il y a de matériel plus le phénomène de suppression d'ions est important.
La suppression d'ions est une disparition du signal détecté en raison d'un défaut d'ionisation dans la source. Ce défaut est dû à la compétition entre les molécules du mélange pour obtenir

les charges. Une suppression d'ions peut venir d'une molécule prédominante s'ionisant particulièrement facilement ou bien de la présence de nombreuses molécules à ioniser.
Pour remédier aux spectres MSMS trop complexes et à la suppression d'ions qu'engendrent les mélanges peptidiques complexes, il est fréquent d'utiliser en amont une séparation chromatographique. Les peptides sont le plus souvent fractionnés selon leur hydrophobicité en milieu acide sur une phase reverse C18 à l'aide d'un gradient d'acétonitrile. Un fractionnement permet d'améliorer l'identification des protéines. La chromatographie sépare et concentre les peptides et donne accès aux protéines mineures du mélange. Il est à noter que, plus l'échantillon est complexe et la gamme dynamique des protéines étendue, plus le fractionnement est indispensable pour pouvoir identifier des protéines minoritaires du protéome profond. La LC-MS est la technique que nous appliquerons aux échantillons complexes (pull-down, rafts).

1.2.5 Principe de préfractionnement peptidique

Le fractionnement doit être proportionnel à la complexité ainsi qu'à la gamme dynamique de l'échantillon protéique. En regard avec le principe cité précédemment, un fractionnement supplémentaire à la chromatographie peut permettre d'accéder au protéome profond. C'est le but recherché avec l'étude des rafts lipidiques. La composition des peptides leur confère des propriétés physiques et chimiques variées sur lesquelles les protéomistes peuvent s'appuyer afin de les séparer. Avec les propriétés hydrophobes des peptides, nous pouvons également utiliser la charge ou le point isoélectrique (pHi) des peptides pour fractionner encore plus un mélange très complexe.

En fixant le pH d'une solution peptidique au plus bas niveau (pH 2-3). Les groupements C-terminaux seront donc sous forme COOH et les groupements N-terminaux sous forme NH_3^+. Les peptides seront donc plus ou moins chargés positivement suivant les groupements présents sur les diverses chaînes latérales des acides aminés les composants. Ils peuvent alors être séparés à l'aide d'une chromatographie échangeuse de cation (SCX) sur laquelle passe un gradient de sel. Les sels vont entrer en compétition avec les peptides pour les charges négatives présentes à la surface de la phase stationnaire. Ainsi, avec ce type de chromatographie, les peptides seront élués dans l'ordre suivant : les peptides avec 1 charge positive (phosphopeptides, peptides C-terminaux …) puis les peptides doublement chargés (peptides trypsiques typiques) et enfin les peptides chargés 3 fois et plus (peptides présentant un clivage raté, ou contenant une histidine et autres peptides trypsiques atypiques …).

Il est aussi possible de réaliser une isoélectrofocalisation des peptides (Hörth P et al, 2006). Les peptides ne seront pas séparés selon leur charge mais selon leur pHi. Un dispositif de cuves permet de créer 12 compartiments au dessus d'une bandelette d'acrylamide comportant un gradient de pH immobilisé (IPG). L'échantillon est réparti à volume égal dans les 12 cuves puis un potentiel électrique est appliqué. Ce potentiel électrique va induire la migration des peptides d'une cuve à l'autre jusqu'à la cuve correspondant à leur pHi . Lorsque l'isoélectrofocalisation est terminée, le contenu de chaque cuve est prélevé et préparé pour être fractionné en nLC avant d'être analysé par spectrométrie de masse.

Le préfractionnement par chromatographie SCX produit environ 70 fractions qui seront poolées en 10 fractions de manière à égaliser les quantités de peptides dans chacune d'elle. Le préfractionnement par point isoélectrique fournit 12 à 24 fractions avec une quantité de peptides très variable par fraction. Dans le cas d'un préfractionnement par pHi, la capacité de réduire ces écarts de quantité de matériel par fraction est beaucoup plus réduite que pour la chromatographie SCX. Cependant, des expériences précédentes nous ont permis de mettre en

évidence une nette amélioration des identifications en faveur de la séparation par pHi (2 fois plus de protéines identifiées). Ceci viendrait d'une meilleure orthogonalité de la séparation en pHi qu'en SCX avec la séparation par hydrophobicité en C18 en amont du spectromètre de masse. Les pHi d'une série de peptides sont plus diversifiés que la charge de cette même série de peptides à un pH donné (jusqu'à 4 états de charge en SCX contre des dizaines de pHi différents). La séparation par pHi présente donc une meilleure résolution (0,2 à 0,4 pHi) que la séparation SCX. En raison de son efficacité à améliorer le nombre de protéines identifiées et quantifiées, il a été décidé d'ajouter une étape de préfractionnement par pHi à la préparation des échantillons de rafts lipidiques avant l'analyse couplée LC-MS.

1.2.6 Quantification iTRAQ

Depuis plusieurs années, différentes approches de protéomique quantitative se sont développées. En LC-MSMS, les méthodes de quantification par spectrométrie de masse les plus connues sont les marquages iTRAQ, SILAC et ICAT. Le principe général est le même.

Chaque échantillon est marqué avec une étiquette différente. Il peut s'agir d'une même molécule sous différentes formes isotopiques fixée de façon covalente sur certains acides aminés pour les approches iTRAQ et ICAT, ou de l'incorporation d'un acide aminé lui aussi sous différentes formes isotopiques pour la méthode SILAC. La quantité de marqueurs incorporés est proportionnelle à la quantité de protéines marquées présentes dans l'échantillon. Les échantillons sont ensuite combinés, digérés et séparés. Les peptides obtenus vont servir à l'identification des protéines. Les étiquettes isotopiques associées aux peptides permettront de faire une étude différentielle.

Toutes ces méthodes permettent de réaliser des quantifications relatives : on compare la quantité de chaque protéine dans les différents échantillons. Cependant, il est possible d'adapter les protocoles afin de réaliser une quantification absolue. L'ajout d'une quantité connue de protéines bien choisies donne une relation entre le signal obtenu et la masse de protéines indexée par ce signal.

1.2.6.1 Les réactifs iTRAQ

La technique iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) est une technique de marquage isobarique (Ross PL et al, 2004). Le principe du marquage est le suivant. Une étiquette de masse 145 Da est ajoutée aux peptides d'échantillons différents après digestion. Les réactifs iTRAQ sont des molécules de masses globales identiques mais dont la répartition en isotopes de Carbone, d'Azote et d'Oxygène est différente. La molécule iTRAQ peut être divisée en trois parties : le groupe NHS, le rapporteur et la balance.

Le groupement NHS pour N-hydroxy-succinimide est connu pour réagir très facilement avec les amines primaires et créer ainsi des liaisons covalentes avec l'extrémité N-terminale des peptides et les groupements amines présents sur les chaînes latérales des lysines. Il est notable que le groupe NHS peut aussi réagir avec le groupement alcool des sérines, tyrosines et thréonines mais de façon très faible dans nos conditions de travail (pH basique).

Le rapporteur est la partie du réactif qui va être libérée au cours de la fragmentation des peptides en spectrométrie de masse. Les m/z des rapporteurs seront visibles sur les spectres MS/MS en plus des ions obtenus par fragmentation au niveau de la liaison peptidique. La différence d'intensité entre chacun des pics des ions rapporteurs permettra une quantification relative tandis que l'exploitation des autres pics du spectre MSMS permettra le séquençage du peptide et au final l'identification de la protéine associée. En cumulant les ratios des peptides

d'une même protéine, on obtient la quantification relative (ratio) de la protéine entre les 2 conditions d'intérêt.

Les réactifs iTRAQ améliorent la fragmentation des peptides marqués (ABSciex technical note). En effet, on remarque que, pour une quantité égale, les signaux obtenus en MS et MS/MS sont plus intenses pour le peptide marqué que pour le même peptide non marqué. Ce phénomène est plus marqué pour les peptides trypsiques à lysine. On explique ce phénomène par la fonction basique du groupement pyridine de la molécule iTRAQ. Cette augmentation de basicité améliore l'ionisation. De plus, on remarque qu'en MS/MS les ions b sont plus présents pour un peptide marqué. Cette présence des ions b vient du fait que la charge est mieux équilibrée sur la séquence peptidique grâce à la présence en C-terminal de l'étiquette iTRAQ basique.

Les marqueurs iTRAQ commercialisés possèdent les rapporteurs de masses suivantes : 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 et 121Da. Ces masses ont été judicieusement choisies. En effet, sur un spectre MS/MS, on trouve très peu d'ions immoniums dans la zone correspondant à ces masses à quelques exceptions près. Les ions immoniums correspondent à des ions fragments spécifiques des acides aminés. Certains sont rencontrés autour de la région reportrice.

La hauteur du pic dépend de la fréquence d'apparition de l'ion. L'ion immonium de la phénylalanine est représenté avec une intensité non négligeable à 120 Da. Cet ion pourrait fausser la quantification s'il se superposait à un rapporteur, c'est pour cette raison qu'il n'existe pas de marqueur iTRAQ 120 mais 121. Par ailleurs, il faut savoir que 4 ions b1 (acide aminé en N-terminal du peptide) sont localisés sur les rapporteurs 114, 115 et 116. Il s'agit respectivement des ions b1 de la leucine, de l'isoleucine, de l'asparagine et de l'acide aspartique. Cependant, si les ions immoniums peuvent être fréquemment rencontrés, ce n'est pas le cas des ions b1. En effet, la charge de l'ion parent est portée préférentiellement en C-terminal du peptide et, pour former un ion b1, la charge doit "se déplacer" jusqu'au niveau de la coupure lors de la fragmentation en MS/MS. Or la coupure b1 se trouve proche de l'extrémité N-terminale du peptide et en conséquence cet ion est rarement détectable.

Enfin, la troisième partie de la molécule iTRAQ est un groupement d'atomes que l'on appelle la balance. Il se situe entre le groupement NHS et le rapporteur. Son rôle est de compenser la masse du rapporteur pour que les réactifs soient isobariques. En MS, le signal observé est donc le signal additif des différentes conditions.

1.2.6.2 Conditions de réaction

La réaction iTRAQ nécessite un pH supérieur à 7,5. Ce pH étant compatible avec la digestion précédant la réaction, il n'y a pas de changement de tampon à effectuer entre ces 2 étapes. Cependant le tampon doit être choisi judicieusement. En effet, les réactifs iTRAQ se fixent sur les amines primaires. Le tampon de reprise des échantillons protéiques ne doit donc pas contenir d'amine primaire afin d'éviter une perte du réactif vers les amines du tampon.

Les tampons habituels type ammonium bicarbonate sont à proscrire. Le Tri-Ethyl Ammonium Bicarbonate (TEAB) dont les groupements amines sont bloqués par des groupements Ethyles est préférable. Ainsi, les réactifs iTRAQ se focalisent sur les Lysines et les extrémités Nterminales des peptides.

Par ailleurs, les groupements NHS sont hydrolysés en milieu aqueux. C'est pour cette raison que les réactifs iTRAQ sont dissous dans un solvant organique (éthanol ou isopropanol). Au

cours de la réaction, les réactifs iTRAQ doivent être dans un milieu à 70 % organique (suffisant pour maintenir l'activité du NHS).

Enfin, pour être quantitatif le marquage doit être complet, c'est pour cette raison que le réactif iTRAQ est ajouté en excès. Cependant, il peut rester des peptides non marqués. Afin d'éviter les réactions croisées entre les échantillons au moment du pool, les réactifs en excès sont inactivés par une étape de « Quenching ». Les NHS sont simplement hydrolysés par déplacement du ratio de milieu aqueux/organique en faveur du milieu aqueux.

1.3 Objectifs

Le projet de recherche qui est décrit dans ce mémoire vise à mieux définir les mécanismes d'action des 2 éléments principaux du métabolisme du fer : l'hepcidine et la ferroportine. Il a été mené dans le cadre d'un projet ANR (GENOPAT) impliquant une collaboration entre 4 experts : Sophie Vaulont (Hepcidine), François Canonne-Hergaux (Ferroportine), Marie-Agnès Sari (Synthèse peptidique) et Luc Camoin (Protéomique). La préparation biologique et les Western Blot présentés dans ce rapport ont été réalisés par les équipes collaboratrices. J'ai été recrutée sur un financement ANR pour travailler dans l'équipe de Luc Camoin sur l'aspect protéomique du projet. J'ai été impliquée dans plusieurs questions biologiques.

La première partie de ce projet concerne l'hepcidine avec deux questions principales. Tout d'abord, une problématique structurale concernant la catalyse du repliement de l'hepcidine. L'Hepcidine est une hormone peptidique très structurée par des ponts disulfures. La question posée est de savoir s'il était possible de démontrer qu'in-vivo le fer peut catalyser le repliement tridimensionnel de l'hepcidine ? Par ailleurs, l'hepcidine est une hormone circulante, or, rares sont les peptides circulant sous forme libre dans le sang. La deuxième question est donc de rechercher les partenaires sériques de l'hepcidine. Ces 2 problématiques ont nécessité la synthèse de différentes formes d'hepcidines par l'équipe de Marie-Agnès Sari.

J'ai vérifié la qualité des hepcidines synthétiques et évalué l'action du fer sur la structure tridimensionnelle de l'hepcidine par MS simple. Après isolement des partenaires sériques de l'hepcidine par différentes techniques réalisées par l'équipe de Marie-Agnès Sari, j'ai identifié ces protéines par digestion trypsique suivie d'une analyse LC-MS.

La deuxième partie du projet est de déterminer les mécanismes moléculaires régulant la ferroportine, récepteur de l'hepcidine. Il a été démontré que la ferroportine était localisée dans des rafts lipidiques de macrophages sous stimulation au fer. J'ai été amenée à étudier les différences de composition protéique entre des rafts de macrophages stimulés avec du fer et de l'hepcidine. Cette étude doit permettre de mieux définir les complexes fonctionnels de la ferroportine et de décrypter les signaux précoces participant à la signalisation de l'internalisation et à la dégradation de la ferroportine.

Nous avons décidé d'utiliser une analyse protéomique différentielle par marquage iTRAQ afin d'étudier la composition protéique des microdomaines associés à la ferroportine sous différentes conditions. L'analyse LC-MS sera précédée d'un préfractionnement peptidique par pHi afin de détecter des protéines minoritaires.

Le temps de traitement au Fer-NTA est de 17h tandis que le temps de traitement à l'hepcidine est de 10 minutes. Ce second temps de traitement est particulièrement court afin de détecter « l'impact immédiat » de l'hepcidine sur la composition des rafts. Cet « impact immédiat » doit

nous permettre de visualiser un effet de recrutement de protéines au niveau des rafts, et non pas une action à plus long terme impliquant l'expression de protéines.

L'analyse protéomique des Rafts étudiera 4 conditions (Non traité : NT, traité au Fer-NTA : F, traité au Fer-NTA et hepcidine 10nM : h, traité au Fer-NTA et hepcidine 350nM : H). Il est à noter que des duplicats de chaque condition de culture cellulaire seront réalisés et notés dans la suite du rapport ; NT1, NT2, F1, F2, h1, h2, H1, H2. Les étapes initiales, culture cellulaire et purification des rafts, ont été réalisés par l'équipe de François Canonne-Hergaux. J'ai réalisé toutes les étapes d'analyse protéomique (précipitation protéique, digestion, marquage isotopique, fractionnement, spectrométrie de masse, bioinformatique, analyse des résultats …) conduisant à l'identification et la quantification iTRAQ.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABSciex Technical Note. Multiplex Protein Quantitation using iTRAQ Reagent – 8plex**.**

Auriac A. (2009) Thèse : Les « rafts », radeaux lipidiques membranaires, participent à la régulation du transporteur de fer, la ferroportine, dans les macrophages.

Auriac A, Willemetz A, Canonne-Hergaux F. (2010) Lipid raft-dependent endocytosis: a new route for hepcidin-mediated regulation of ferroportin in macrophages. Haematologica. 95 : 1269-77.

Bea TJ, Kim MS, Kim JW, Kim BW, Choo HJ, Lee JW, Kim KB, Lee CS, Kim JH, Chang SY, Kang CY, Lee SW, Ko YG. (2004) Lipid raft proteome reveals ATPsynthase complex in the cell surface. Proteomics. 4 : 3536-3548

Chen MZ, Chen J, Lu XJ, Shi YH. (2010) Molecular cloning, sequence analysis and expression pattern of hepcidin gene in ayu (Plecoglossus altivelis). Dongwuxue Yanjiu. 31 : 595-600.

Chen SL, Li W, Meng L, Sha ZX, Wang ZJ, Ren GC. (2007) Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (Scophthalmus maximus). Fish Shellfish Immunol. 22 : 172-81.

Clauser KR, Hall SC, Smith DM, Webb JW, Andrews LE, Tran HM, Epstein LB, Burlingame AL. (1995) Rapid mass spectrometric peptide sequencing and mass matching for characterization of human melanoma proteins isolated by twodimensional PAGE. Proc Natl Acad Sci U S A. 92 : 5072-6.

De Domenico I, Ward DM, Musci G, Kaplan J. (2007) Evidence for the multimeric structure of ferroportin. Blood. 109 : 2205-9.

De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, Ganz T, Musci G, Kaplan J. (2007) The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. Mol Biol Cell. 18 : 2569-78.

De Domenico I, Ward DM, di Patti MC, Jeong SY, David S, Musci G, Kaplan J. (2007) Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. EMBO J. 26 : 2823-31.

Deeg MA, Bierman EL, Cheung MC. (2001) GPI-specific phospholipase D associates with an apoA-I- and apoA-IV-containing complex. J Lipid Res. 42:442-51.

Delaby C, Pilard N, Gonçalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. (2005) Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. Blood. 106 : 3979-84.

Delaby C, Pilard N, Hetet G, Driss F, Grandchamp B, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. (2005) A physiological model to study iron recycling in macrophages. Exp Cell Res. 310 : 43-53.

Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI. (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. Nature. 403 : 776-81.

Dringen R, Bishop GM, Koeppe M, Dang TN, Robinson SR. (2007) The pivotal role of astrocytes in the metabolism of iron in the brain. Neurochem Res. 32 : 1884-90.

Foster LJ, Chan QW. (2007) Lipid raft proteomics: more than just detergent-resistant membranes. Subcell Biochem. 43 : 35-47.

Gokhale NH, Cowan JA. (2005) Inactivation of human angiotensin converting enzyme by copper peptide complexes containing ATCUN motifs. Chem Commun (Camb) 47 : 5916-8.

Goncalves A, Beaumont C. (2005) La ferroportine, une nouvelle molécule pour la régulation du métabolisme du fer. Hématologie. 6 : 453-63.

Gonçalves AS, Muzeau F, Blaybel R, Hetet G, Driss F, Delaby C, Canonne-Hergaux F, Beaumont C. (2006) Wild-type and mutant ferroportins do not form oligomers in transfected cells. Biochem J. 396 :265-75.

Hack CJ. (2004) Integrated transcriptome and proteome data: the challenges ahead. Brief Funct Genomic Proteomic. 3 : 212-9.

Harrison PM, Arosio P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochim Biophys Acta. 1275 : 161-203.

Hellman NE, Gitlin JD. (2002) Ceruloplasmin metabolism and function. Annu Rev Nutr. 22 : 439-58.

Hörth P, Miller CA, Preckel T, Wenz C. (2006) Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. Mol Cell Proteomics. 5 : 1968-74.

Hiller Y, Gershoni JM, Bayer EA, Wilchek M. (1987) Biotin binding to avidin Oligosaccharide side chain not required for ligand association. Biochem J. 248 : 167-71.

Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. (2002) The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. J Biol Chem. 277 : 37597-603.

Kahn P. (1995) From genome to proteome: looking at a cell's proteins. Science. 270 : 369-70.

Karas M, Hillenkamp F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons. Anal Chem. 60 : 2299-301.

Kautz L. (2009) Thèse : Rôle de BMP6 et de HFE dans la régulation de l'entrée du fer dans l'organisme.

Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. (2008) Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. Haematologica. 93 : 90-7.

Kuo YM, Su T, Chen H, Attieh Z, Syed BA, McKie AT, Anderson GJ, Gitschier J, Vulpe CD. (2004) Mislocalisation of hephaestin, a multicopper ferroxidase involved in basolateral intestinal iron transport, in the sex linked anaemia mouse. Gut. 53 : 201-6.

Liang Y, Pan A, Zhang S, Zhang Y, Liu M. (2011) Cloning, distribution and primary immune characteristics of amphioxus alpha-2 macroglobulin. Fish Shellfish Immunol. 31 : 963-9.

Liu XB, Yang F, Haile DJ. (2005) Functional consequences of ferroportin 1 mutations. Blood Cells Mol Dis. 35 : 33-46.

Livnah O, Bayer EA, Wilchek M, Sussman JL. (1993) Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 90 : 5076-80.

McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ. (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. Mol Cell. 5 : 299-309.

Metalidis C, Lerut E, Naesens M, Kuypers DR. (2011) Expression of CYP3A5 and Pglycoprotein in renal allografts with histological signs of calcineurin inhibitor nephrotoxicity. Transplantation. 91 : 1098-102.

Mishra S, Joshi PG. (2007) Lipid raft heterogeneity: an enigma. J Neurochem. 103 Suppl 1 : 135-42.

Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science. 306 : 2090-3.

Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T. (2006) The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. Blood. 107 : 328-33.

Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S. (2001) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 98 : 8780-5.

Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. (2002) The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. J Clin Invest. 110 : 1037-44.

Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. (2002) Hepcidin, a new iron regulatory peptide. Blood Cells Mol Dis. 29 : 327-35.

Nielsen MJ, Møller HJ, Moestrup SK. (2010) Hemoglobin and heme scavenger receptors. Antioxid Redox Signal. 12 : 261-73.

Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. J Biol Chem. 276 : 7806-10.

Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW, Soe-Lin S, Ponka P, Sutak R, Becker E, Huang ML, Suryo Rahmanto Y, Richardson DR, Vyoral D. (2009) Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2- macroglobulin in blood. Blood. 113 : 6225-36.

Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O. (2001) A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. J Biol Chem. 276 : 7811-9.

Ramey G, Deschemin JC, Durel B, Canonne-Hergaux F, Nicolas G, Vaulont S. (2010) Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. Haematologica. 95 : 501- 4.

Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlet-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. (2004) Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents. Mol Cell Proteomics. 3 : 1154-69.

Shinozuka T. (1994) Changes in human red blood cells during aging *in vivo*. Keio J Med. 43 : 155-63.

Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. (1970) The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. J Lab Clin Med. 75 : 410-21.

Van Waterschoot RA, Schinkel AH. (2011) A critical analysis of the interplay between cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: recent insights from knockout and transgenic mice. Pharmacol Rev. 63 : 390-410.

Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ. (1999) Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. Nat Genet. 21 : 195-9.

Wang F, Lothrop AP, James NG, Griffiths TA, Lambert LA, Leverence R, Kaltashov IA, Andrews NC, MacGillivray RT, Mason AB. (2007) A novel murine protein with no effect on iron homoeostasis is homologous with transferrin and is the putative inhibitor of carbonic anhydrase. Biochem J. 406 : 85-95.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. (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.

Yang DJ, Shi S, Yao TM, Ji LN. (2011) Cooperative folding of tau peptide by coordination of group IIB metal cations during heparin-induced aggregation. Biometals. 25 : 361-72.