

ANALYSE DU PROTÉOME DE LA MYOPATHIE DE DUCHENNE PAR PROFILAGE EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI TOF-TOF ET PAR ÉLECTROPHORÈSE 2D

Farida MESSOUAF¹, Sylvie LAZEREG¹, Sabine DE LA PORTE², Alain BRUNELLE¹, Olivier LAPRÉVOTE¹

¹Laboratoire de Spectrométrie de Masse, ICSN-CNRS, 1 Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette

²Laboratoire de neurobiologie cellulaire et moléculaire, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, INAF-CNRS, 1 Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette

La myopathie de Duchenne (DMD) est une maladie génétique récessive liée au chromosome X qui touche 1/3500 naissances chaque année en France [1]. Cette maladie neuromusculaire létale est caractérisée par une atrophie musculaire progressive des muscles squelettiques et cardiaque. Le gène en cause est le plus grand identifié à l'heure actuelle (2,5 millions de paires de bases) [2] codant une protéine de poids moléculaire 427kDa : la dystrophine. Elle forme avec d'autres protéines le complexe dystrophine-glycoprotéines (DGC) transmembranaire impliqué dans le maintien de l'intégrité des fibres musculaires en liant leur cytosquelette à la matrice extracellulaire (Figure 1). Dans 65% des cas de mutations observées, une protéine non fonctionnelle est synthétisée. L'un des principaux modèles animaux est la souris *mdx*.

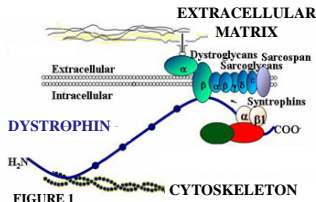
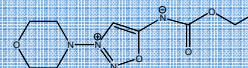


FIGURE 1

Aucun traitement n'existe actuellement mais de nombreuses thérapies sont en cours d'étude. L'une des approches étudiées ici est la voie du NO (Nitric Oxide) afin d'exprimer l'atrophine, une protéine du cytosquelette, présente sous la membrane des cellules musculaires chez l'embryon et progressivement remplacée par la dystrophine au cours du développement [3]. La Molsidomine est un médicament métabolisé par le foie et libérant le radical NO.

Molsidomine



Le but de notre étude est de comparer le profil protéique des souris saines, traitées et *mdx*.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Note : Il est important de savoir que l'atrophie musculaire causée par la DMD se caractérise morphologiquement par la présence de zones nécrosées au sein du tissu (Figure 2).



FIGURE 2

Dépôt de matrice

- acide sinapinique, 20 mg/mL
- système : prototype spotteur automatisé (SiliFlow SAS, Valence, France) (Figure 3)
- système : microcavité contenant la matrice, déformable par une impulsion piézoélectrique (Figure 4)
- diamètre dépôts : 300 à 600 µm (selon la taille de la buse d'éjection et sur plaque inox)
- déposer de façon précise des gouttelettes de matrice dans les zones nécrosées (Figure 5)

LE SPOTTEUR

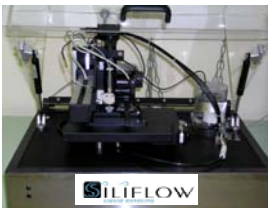


FIGURE 3

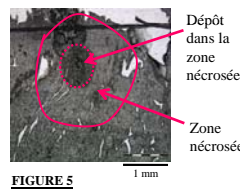


FIGURE 5

LES SOURIS

Tissus

- diaphragme souris 11 semaines (uniquement 2D)
- pattes souris 11 semaines (souris saines et *mdx*)
- pattes de souris de 12 semaines (traitées)
- deux animaux étudiés à chaque fois, 16 coupes pour chaque
- 70 spots analysés pour souris saines, traitées et zones non nécrosées *mdx*
- 20 spots analysés pour les zones nécrosées *mdx*

Coupes de tissus

- épaisseur 16 µm
- à -20°C par cryostat CM3050-S (Leica Microsystems SA, Rueil-Malmaison, France).

LES TECHNIQUES

Spectrométrie de masse

- MALDI TOF-TOF 4800, laser YAG à 335 nm pulsé à 200 Hz (Applied Biosystems)
- Mode linéaire de 3 000 à 20 000 Da
- plaque inox 4700

Électrophorèse 2Dimensions (2D)

- séparation protéines fonction du point isoélectrique (pI) et poids moléculaire (PM)
- hauts PM analysable
- quantité tissu : mg

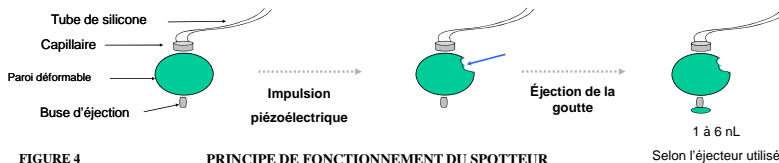


FIGURE 4

PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DU SPOTTEUR

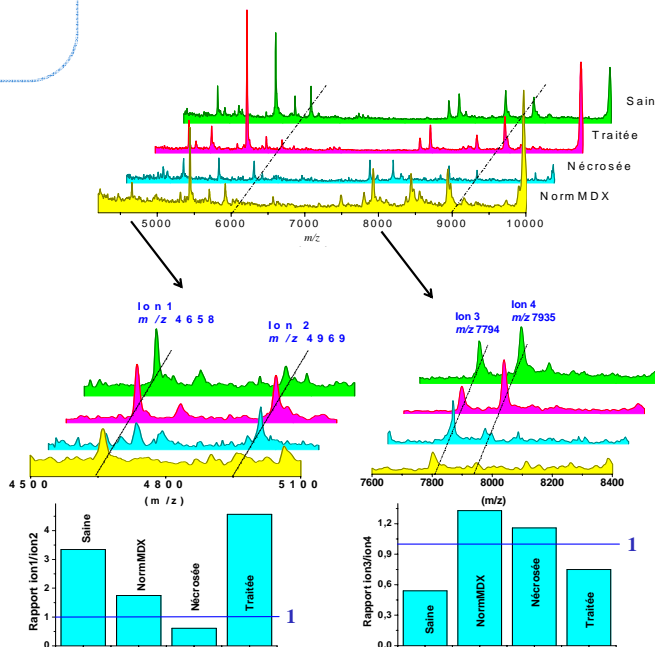


FIGURE 6

Rapport d'intensité des deux couples d'ions

Masse (kDa)

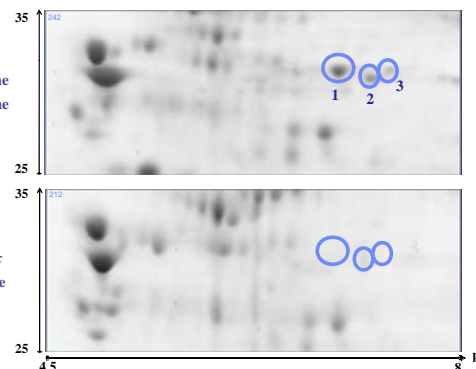


FIGURE 7

Lors de l'analyse par électrophorèse 2D des pattes de souris, aucun nouveau résultat n'a été obtenu. Toutefois, l'analyse du diaphragme a permis de révéler une différence entre le profil sain et le profil *mdx*. Trois spots présents lors de l'analyse du tissu sain ne le sont plus dans le profil malade. Un de ces spots a été identifié par analyse MS/MS en MALDI TOF-TOF, il s'agit du spot 3 pouvant correspondre à la protéine sérine thréonine kinase. Pour l'instant, il s'agit d'une première étude afin de voir si une analyse 2D DIGE est nécessaire. C'est une méthode permettant en plus de l'analyse 2D, une quantification des protéines.

RÉSULTATS

L'analyse du contenu protéique des coupes saines, traitées, *mdx* (zone nécrosée) et *normmdx* (zone non nécrosée) a révélé deux principales inversions d'intensité relatives entre deux ions selon de l'état de la souris. Pour le 1^{er} rapport d'ions (ion1/ion2), seul le tissu nécrosé présente un rapport inférieur à 1. Concernant le 2^d rapport (ion3/ion4), seulement les tissus nécrosés et *normmdx* ont un rapport supérieur à 1 (Figure 6). D'autres différences sont observables mais non reproductibles.

Concernant la reproductibilité de ces résultats, on observe une variation de 60 à 80% pour le rapport ion1/ion2 et de 32 (Norm*mdx*) à 78% pour le rapport ion3/ion4. Une étude publiée sur la reproductibilité des résultats en spectrométrie de masse MALDI en 2005 [4] a montré qu'il y avait une reproductibilité des résultats de l'ordre de 70% pour des analyses intra-animale et de l'ordre de 40% pour les analyses inter-animale. Sachant que nous nous basons sur une analyse inter-animale, la reproductibilité observée lors de notre étude semble correcte (sauf pour le rapport ion3/ion4 de Norm*mdx*).

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus par profilage MALDI TOF-TOF semblent être validés par de précédentes études sur la reproductibilité des résultats [4]. Il reste à identifier les 4 ions qui ont un profil différent selon l'état de la souris. Pour l'analyse 2D, le but aujourd'hui est une analyse 2D DIGE des échantillons de diaphragme.

La spectrométrie de masse et l'électrophorèse 2D ont montré leur potentiel complémentaire lors de cette étude. En effet, la spectrométrie de masse est une méthode sensible et rapide des pattes de souris. Elle permet d'analyser des tissus en faible quantité et des zones très ciblées telles que les zones nécrosées, notamment grâce à l'apparition ces dernières années de spotteurs automatisés qui permettent le dépôt de gouttelettes de matrices de façon très précise. L'électrophorèse 2D, permet de son côté une analyse de protéines de très haut poids moléculaire mais surtout permet l'analyse de tissus non analysables par profilage MALDI TOF-TOF, par exemple, le diaphragme qui est un tissu fin difficile à congeler et à couper.

RÉFÉRENCES

- [1] <http://www.genethon.fr>
- [2] KOENING M. Complete cloning of the duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50:1987:509-517
- [3] VOISIN V. L-Arginine improves dystrophic phenotype in *mdx* mice. *Neurobiology of Disease* 20:2005:123-130
- [4] MADDALAO G. Analytical assessment of MALDI-TOF Imaging Mass Spectrometry on thin histological samples. An insight in proteome investigation. *Clinica Chimica Acta* 357:2005:210-218.