

Séance plénière

Protéomique et médecine transfusionnelle

Proteomics and transfusion medicine

N. Lion, M. Prudent, D. Crettaz, J.-D. Tissot*

Service régional vaudois de transfusion sanguine, 2, route de la Corniche, 1066 Épalinges, Suisse

Résumé

Le terme protéomique regroupe un ensemble de techniques permettant la caractérisation et l'identification de mélanges complexes de protéines dans des échantillons biologiques. Dans cette revue, l'étude d'une situation typique d'analyse protéomique appliquée à la médecine transfusionnelle est rapportée, permettant, dans une première partie, de décrire les outils habituellement utilisés dans les laboratoires de protéomique, puis, dans une seconde partie, d'analyser les données de la littérature rapportant sur l'application de la protéomique dans les différents champs de la médecine transfusionnelle.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Protéomique ; Médecine transfusionnelle ; Plasma ; Plaquettes ; Globules rouges

Abstract

The term “proteomics” covers tools and techniques that are used to analyze and characterize complex mixtures of proteins from various biological samples. In this short review, a typical proteomic approach, related to the study of particular and illustrative situation related to transfusion medicine is reported. This “case report” will allow the reader to be familiar with a practical proteomic approach of a real situation, and will permit to describe the tools that are usually used in proteomic labs, and, in a second part, to present various proteomic applications in transfusion medicine.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Proteomics; Transfusion medicine; Plasma; Platelets; Red blood cells

1. Introduction

L'application des outils protéomiques à la médecine transfusionnelle correspond à la rencontre de deux disciplines, l'une orientée sur la biochimie et la bioinformatique, l'autre sur les produits sanguins, leur production et leur usage. Les développements récents dans ces deux domaines scientifiques ont été majeurs, et ont permis des avancées rapides à l'interface des disciplines cliniques et fondamentales. Afin d'illustrer le potentiel de l'application de la protéomique en médecine transfusionnelle, la description d'un protocole d'étude et des résultats obtenus sont brièvement décrits, de manière à permettre au lecteur de se retrouver plus simplement lors de l'analyse des outils protéo-

miques, ainsi que des données de la littérature récentes portant sur la protéomique appliquée à la médecine transfusionnelle.

2. Étude de cas

Des recherches importantes ont été et sont encore menées depuis de nombreuses années afin de développer des solutions de conservation qui soient adaptées à la conservation à moyen-long terme des globules rouges destinés à la transfusion sanguine. Depuis quelques années, notre laboratoire s'intéresse aux microparticules qui sont relâchées au cours du temps lors de la conservation des concentrés érythrocytaires à 4 °C. Les microparticules, également connues sous le terme d'ectosome, correspondent à des populations hétérogènes de vésicules phospholipidiques ayant une taille inférieure à 1 µm [1,2]. Les microparticules ont différentes origines et propriétés biologiques ; elles peuvent être relâchées par les plaquettes, les cellules endothéliales ou les globules blancs, notamment les

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : jean-daniel.tissot@mavietonsang.ch (J.-D. Tissot).

monocytes. Les mécanismes impliqués dans la formation et la libération des microparticules des membranes cellulaires sont probablement très divers et correspondent à des réponses physiopathologiques variées et représentent un des mécanismes de défense du globule rouge, notamment lors de son vieillissement. Greenwalt a été un des premiers à montrer l'importance des microparticules en tant qu'élément clé représentatif des lésions de stockage des concentrés érythrocytaires lors de leur conservation à 4 °C et c'est dans ce contexte que notre laboratoire s'est intéressé à cette problématique [3,4]. En effet, par différentes analyses par cytométrie de flux, nous avons pu confirmer l'augmentation progressive du nombre de microparticules relâchées durant le temps de conservation et caractériser certaines de leurs propriétés biochimiques. Afin de déterminer si différentes solutions additives autorisées par les autorités sanitaires modifient ou non le nombre et le type de ces éléments, nous avons analysé les microparticules obtenues après 42 jours de stockage soit en solution SAGM (solution A ; conservation maximale possible de 42 jours à 4 °C), soit en solution PAGGS (solution B ; conservation maximale possible de 50 jours à 4 °C). Les microparticules ont été isolées après 42 jours de stockage ($n=8$ dans chaque groupe). Brièvement, 4 × 50 mL de sang mélangé à la solution de conservation ont été prélevés de chaque poche et centrifugés (2000 × g pendant 20 minutes à 4 °C). Le surnageant est ensuite recentrifugé dans les mêmes conditions, puis, ultracentrifugé (120 000 × g pendant 60 minutes à 4 °C). Le culot est alors « lavé 2 × » (mélange 2 × avec 40 ml de NaCl, suivi d'ultracentrifugations). Les culots lavés sont finalement suspendus dans 0,4 ml de NaCl, et les protéines dosées. Après une nouvelle centrifugation, la solution de NaCl est éliminée, puis les protéines resuspendues dans un tampon d'électrophorèse contenant divers détergents permettant leur solubilisation et leur dénaturation, notamment en réduisant les ponts disulfures. Afin d'éliminer l'hémoglobine contenue dans les microparticules, 600 µg de protéines ont été séparés par focalisation isoélectrique en milieu liquide (*off-gel electrophoresis*). Après séparation des protéines, les fractions alcalines (pH > 7) contenant l'hémoglobine ont été éliminées. Les fractions 1–8, plus acides, ont été mélangées, le volume réduit par filtration sur micro-colonne (volume final 50 µl). Finalement, les protéines de ces échantillons ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle, séparation dans la première dimension par focalisation isoélectrique dans un gel caractérisé par son gradient de pH, puis, dans la seconde dimension, par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE, séparation selon la taille apparente). Les protéines ont été colorées dans ces gels soit par argentation (Fig. 1), soit par coloration au bleu de Coomassie. Les analyses comparatives et quantitatives des images ont été effectuées en utilisant un logiciel dédié. En utilisant cette approche, les électrophorégrammes des microparticules générées en solution A ont été comparés à ceux correspondant aux microparticules de la solution B ; plusieurs tâches (spots) ont montré des différences significatives de leur expression, suggérant que les microparticules générées dans des conditions de stockage distinctes avaient des caractéristiques protéiques différentes (Fig. 1). Afin d'identifier les protéines discriminant ces deux types de microparticules, une approche

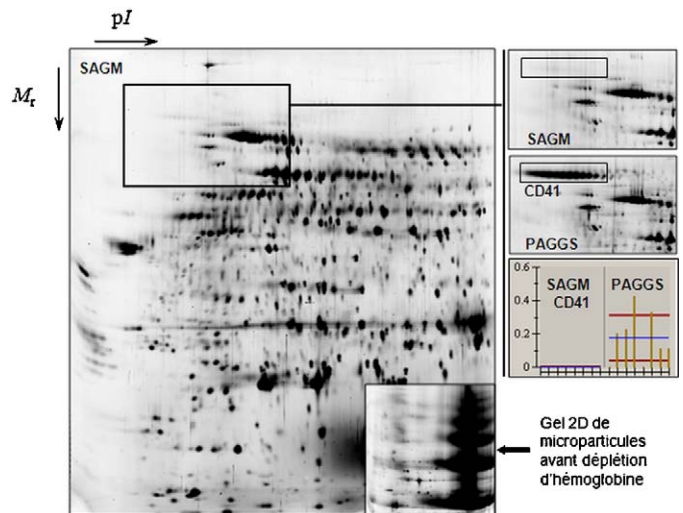


Fig. 1. Gel d'électrophorèse bidimensionnelle, après coloration à l'argent, de microparticules érythrocytaires conservées en solution SAGM. Les microparticules ont été au préalable déplétées en hémoglobine par off-gel. Une miniature d'un gel sans déplétion montre que l'essentiel des protéines qui sont visibles correspondent à de l'hémoglobine. Plusieurs protéines, absentes des gels 2D de microparticules en solution SAGM ont été détectées en solution PAGGS, telle que le CD41, identifié par MS. Les histogrammes obtenus par le logiciel d'analyse d'image montrent clairement des différences d'expression des protéines, (exprimées en pourcentage du volume de la tâche considérée) entre les deux séries de gels, comme l'illustrent les détails représentés à la droite de la figure.

standard de protéomique analytique a été utilisée consistant en la caractérisation par spectrométrie de masse (MS) des protéines surexprimées dans un échantillon comparativement à l'autre. La première étape a consisté en une préparation d'échantillon avec une concentration plus importante de protéines (au minimum dix fois plus élevée), une séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle, coloration au bleu de Coomassie, repérage et découpage des tâches d'intérêts, digestion des protéines contenues dans ces fragments de gels par de la trypsine, séparations des peptides par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et analyses de ces fragments par spectrométrie de masse. Finalement, les spectres générés sont étudiés par des outils bioinformatiques permettant, sur la base de ces spectres générés *in silico* et correspondant de manière très précise aux masses des différents peptides générés par la digestion à la trypsine, d'identifier la protéine d'origine (Fig. 2, démontrant l'identification de CD41, par exemple). À notre grande surprise, les peptides identifiés correspondaient à des protéines plaquetaires ! (Fig. 1 et 2). À notre grand désespoir, des contrôles préanalytiques stricts n'avaient pas été faits. Lorsque ceux-ci ont été pratiqués rétrospectivement, nous nous sommes rendus compte que les concentrés érythrocytaires préparés en solution A étaient totalement dépourvus en plaquettes, alors que ceux préparés en solution B en contenaient (Fig. 3). Pour tester que l'hypothèse préanalytique était la bonne, des plaquettes ont été ajoutées aux concentrés érythrocytaires stockés en solution A ; les mêmes modifications d'expression protéique ont été détectées en solution B ! (Fig. 4).

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/1105733>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/1105733>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)