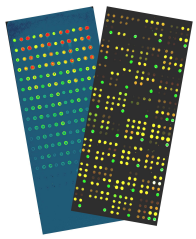
# Applications des puces à anticorps pour la recherche sur le cancer

**ANGELINI M.[1], BROSSARD A.[1], HERLEDAN A.[2], LE BARON J.[1], SAKANYAN V.[1, 2]**

[1] ProtNeteomix, Nantes & [2] Laboratoire de Biotechnologie, UMR-CNRS 6204, Université de Nantes

contact@protneteomix.com

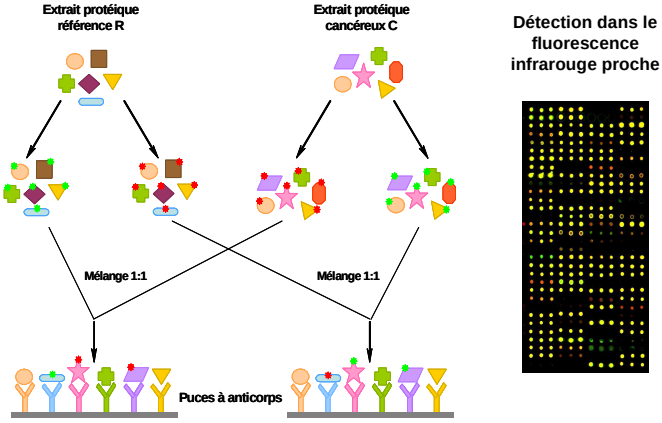
Les puces à anticorps ont des implications croissantes dans la recherche à haut débit sur le cancer pour l'analyse globale de l'expression des protéines, pour l'évaluation de l'activité fonctionnelle des voies de signalisation et pour la découverte de biomarqueurs. Compte tenu de la faible quantité d'échantillons cliniques (fluides biologiques et biopsies) nécessaire pour l'analyse, ces puces deviennent hautement attractives dans le domaine de la cancérologie. L'approche la plus appropriée est basée sur la comparaison du profil d'expression des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, en utilisant la détection par fluorescence.



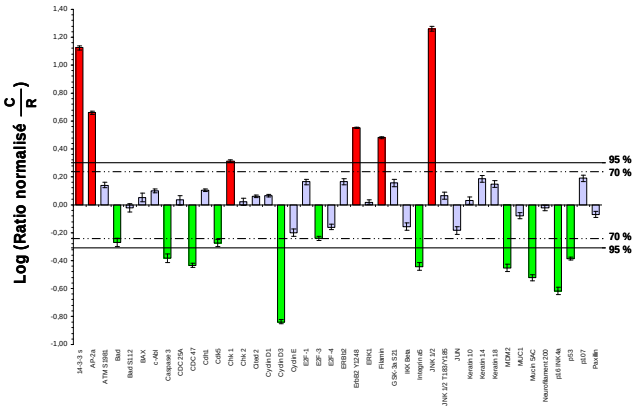
Nous avons développé des puces à anticorps destinées à la recherche biomédicale et leur faisabilité a été montrée à travers des études sur différents échantillons cancéreux. La faible concentration des protéines-cibles et la réactivité croisée des anticorps avec plusieurs protéines constituent encore des obstacles pour l'extension des applications des puces à anticorps. Cependant, l'enrichissement ou le fractionnement des protéines-cibles des différents compartiments peuvent améliorer la performance de cette technologie (Yeretssian *et al*., 2005; Sakanyan *et al*., 2008).

## Profil d'expression des protéines

Nous avons développé une puce nommée MAGYarray, constituée de 128 anticorps, dédiée à l'évaluation des variations d'expression des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, la formation du cytosquelette, etc…Cette méthode repose sur le principe de la compétition des protéines. Deux extraits protéiques, obtenus à partir de cellules ou de biopsies, sont marqués par deux fluorophores émettant dans l'infrarouge proche (Alexa fluor 680 en vert ; IRD800 en rouge) qui augmentent la sensibilité de la détection des signaux (Snapyan *et al*., 2003). L'intensité de fluorescence provenant des spots correspond à la capture des protéines par les anticorps spécifiques immobilisés sur le support et reflète l'abondance de ces protéines-cibles.



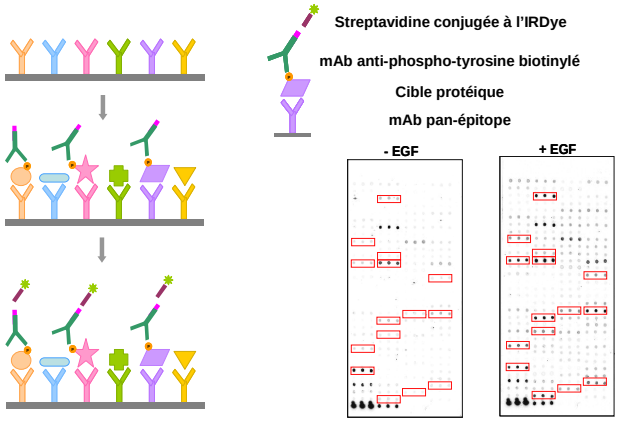

L'analyse des résultats s'effectue par normalisation des ratios (NMRAT) pour chaque protéine, suivie d'une analyse de variance par ANOVA révélant des variations dans le niveau d'expression avec des confiances statistiques supérieures à 70% ou 90%. Les résultats obtenus peuvent être confirmés par Western-blot.



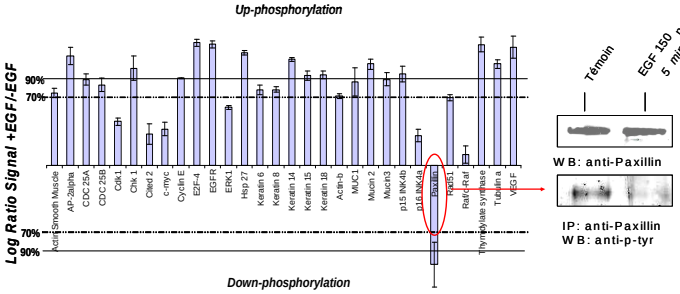

Exemple de l'expression différentielle des protéines dans une biopsie d'hépatocarcinome

## Analyse du phosphoprotéome

Une autre puce nommée Phosphoarray a été développée afin d'évaluer le niveau de phosphorylation des protéines. Elle est constituée de 121 anticorps dirigés majoritairement contre les protéines des voies de signalisation. Cette méthode repose sur le principe du «sandwich». Les protéines-cibles, capturées par leur anticorps respectif, sont par la suite détectées par un système biotine-streptavidine faisant intervenir un anticorps dirigé contre un acide aminé phosphorylé (ex : tyrosine).




Le procédé d'analyse est identique à celui du profiling des protéines. Les résultats obtenus peuvent être confirmés par immunoprécipitation (anticorps de capture) suivie d'un Western-blot (anticorps contre le résidu phosphorylé).




Exemple de la comparaison des niveaux de phosphorylation sur le résidu tyrosine des protéines de la lignée cancéreuse mammaire MDA MB 468 non stimulée et stimulée à l'EGF.

REFERENCES :

Sakanyan V., Angelini M., Yeretssian G., Brossard A., Lecocq M. and Herledan A. 2008 (soumis).

Snapyan M., Lecocq M., Guével L., Arnaud MC., Ghochikyan A. and Sakanyan V. Proteomics, 3, 647-657, 2003.

Yeretssian G., Lecocq M., Lebon G., Hurst C.H. and Sakanyan V. Mol Cell Proteomics,4, 605-617, 2005.

ProtNeteomix en collaboration avec la plate-forme «Puces à Protéines» d'Ouest-Génopôle propose ses services pour la recherche du profil d'expression et de la phosphorylation des protéines en utilisant les puces à anticorps commercialisées ou à façon.