

Nouvelles cibles thérapeutiques et diagnostiques du Cancer Anaplasique de la Thyroïde (CAT)

Sophie Liuu¹, Veronica De Simone², Daniela Califano², Gennaro Chiappetta², Giovanni Chiappetta¹, Joëlle Vinh¹

¹ Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique, CNRS USR 3149, ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris, France.

² Functional Genomic Unit, National Cancer Institute, Fondazione G. Pascale, via M. Semmola, 80131 Naples, Italy

Introduction

Le cancer anaplasique de la thyroïde (CAT), est l'un des cancers les plus graves chez l'être humain. La survie moyenne des patients atteints est de quatre à neuf mois après le diagnostic, et pour le moment, il n'existe pas de traitement curatif.

Récemment, il a été démontré qu'une protéine anti-apoptotique, Bag3, était impliquée dans la croissance des cellules cancéreuses et métastases. Sa régulation négative conduit à l'apoptose des cellules du cancer de la thyroïde [1-3].

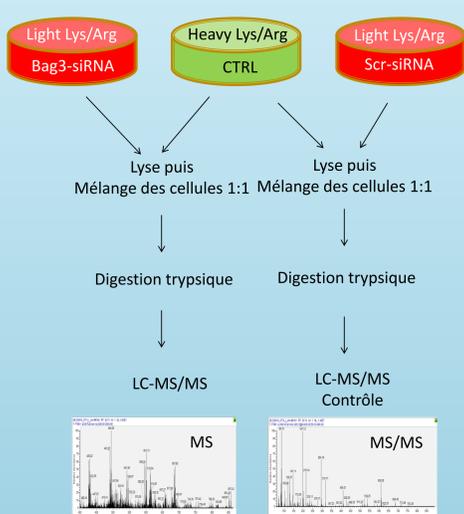
Objectifs

Dans cette étude, il s'agit de trouver les protéines régulées par cette protéine par la spectrométrie de masse tandem à haute résolution, couplée à la nano-chromatographie en phase liquide (Ultimate3000 RSLC, QExactive, ThermoFisher Scientific) en utilisant une approche quantitative SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture [4]) sur des cellules cancéreuses du CAT (8505C).

Les résultats permettront de mieux comprendre les mécanismes de croissance et de dégradation métastatique dans le CAT, et d'identifier de nouvelles cibles pour le pronostic, les études thérapeutiques et le diagnostic.

Matériel et Méthodes

- Culture des cellules 8505C dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) pauvre en arginine et lysine contenant 10% de sérum fœtal bovin, et du normal ou arginine ¹³C₆, ¹⁵N₄ et Lysine ¹³C₆, à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂
- Lipotransfection des cellules avec un ARN interférent spécifique de Bag3 (Bag3-siRNA) et non spécifique (Scr-siRNA)
- Lyse des cellules à l'aide d'une sonde à soniquer (MicroSon XL)
- Digestion avec la trypsine porcine modifiée (Roche) après réduction (DTT 10 mM) et alkylation (iodoacétamide, 50mM) dans 50mM d'ammonium bicarbonate pH8.4
- Analyse nanoLC-MS/MS en triplicatas (Ultimate 3000 RSLC - Qexactive, ThermoFisher Scientific)



- Colonne nano C18 Acclaim pepMap100 (Dionex) Viper 75µm d.i. x 50cm longueur
- Gradient 1% à 50%B en 180 min, éluant A: H₂O/ACN/AF 98:2:0.1 (v/v/v) éluant B: H₂O/ACN/AF 10:90:0.1 (v/v/v)
- Méthode d'acquisition : 1 FTMS (résolution 70 000) + top 10 HCD MS/MS
- Interrogation des données dans la base Uniprot-Swissprot humaine (11/07/2012) à l'aide du moteur de recherche MaxQuant v1.2.5.5, peptides tryptiques, jusqu'à 2 miss cleavages autorisés, modifications variables: CAM (C), PHOSPHO (S,T,Y), OX (M)
- Seules les protéines ayant été identifiées et quantifiées avec 2 peptides et un FDR<1% sont retenues

Figure 1: Schéma de la stratégie analytique

Résultats

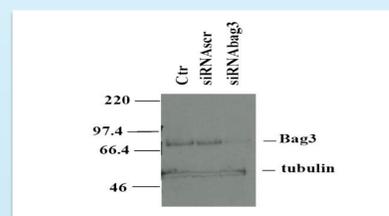


Figure 2: Western Blot
Vérification de la transfection

La transfection de l'ARN interférent spécifique et non spécifique de Bag3, a été contrôlé par Western blot, en utilisant les anticorps anti-Bag3 et anti-tubuline pour le contrôle.

La transfection d'interférent non-spécifique n'a rien modifié à l'expression des protéines.

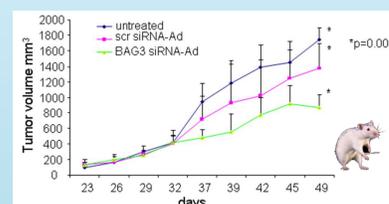


Figure 3: Suivi de la tumeur avec ou sans traitement

Des cellules 8505C ont été implantées dans des souris nues. L'injection intramusculaire de l'adénovirus bag3-siRNA a conduit à une réduction pouvant aller jusqu'à 60% de la tumeur *in vivo* après 49 jours de traitement.

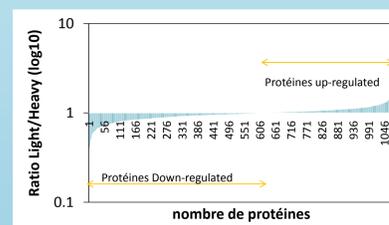


Figure 4: Distribution des protéines quantifiées

Plus de mille protéines ont été quantifiées avec l'optimisation des conditions chromatographiques et le traitement des données. Parmi ces protéines, une vingtaine présente un changement d'expression significatif par rapport au contrôle.

Conclusions & Perspectives

Cette approche protéomique a permis d'identifier une vingtaine de protéines régulées par la protéine anti-apoptotique Bag3. Par la suite, ces protéines seront quantifiées avec une méthode multiplexe originale en targeted-SIM, targeted-MS/MS (PRM) avec le QExactive et SRM avec le TSQ Vantage (ThermoFisher Scientific). En parallèle, elles seront confirmées à l'aide d'anticorps.

Les protéines validées seront ensuite quantifiées dans des tissus biologiques par sonication (Voir poster typage des amyloses).

La phase finale portera sur l'évaluation de ces protéines comme cible thérapeutique et le développement d'un outil diagnostique robuste.

Références

1. Ammirante M. et al., Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107(16):7497-502
2. Chiappetta G. et al., J Clin Endocrinol Metab. 2012; 97(1):E115-20
3. Rosati A et al., Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(7-8):1337-42
4. Ong S. et al., Mol Cell Proteomics. 2002 ; 1(5):376-86