

Analyse protéomique dans le cancer du sein : rôle des récepteurs aux oestrogènes α dans la résistance à la radiothérapie

Iman HADDAD¹, Robert-Alain TOILLON², Guy LECLERCQ², Nicolas MAGNÉ², Joëlle VINH¹

¹ UMR 7637 CNRS/ESPCI - Unité de Neurobiologie & Diversité Cellulaire - 10 rue Vauquelin, 75231 Paris cedex 05

² Laboratoire J.C. Heuson de Cancérologie Mammaire - ULB- Institut Jules Bordet, 127, boulevard de Waterloo, 1000 Bruxelles, Belgique

INTRODUCTION

Les récepteurs aux œstrogènes de type α jouent un rôle majeur dans la croissance, la survie, la différenciation et le développement du cancer du sein. Il a été précédemment décrit que les œstrogènes diminuent la sensibilité des cellules à la radiothérapie [1-2]. L'étude de protéines dans les cellules cancéreuses mammaires traitées par radiothérapie, permettrait d'expliquer le mécanisme de radio-résistance induit par les œstrogènes.

Les effets du 17-beta-oestradiol (E2) ont été déterminés sur les cellules MCF-7 irradiées par une dose de 8 Gy (correspondant à l'IC-50). Après lyse des cellules, les protéines ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle sur gel. Les protéines modulées par l'E2 dans les cellules irradiées ont été identifiées par LC-MS/MS.

Les analyses protéomiques suggèrent que l'E2 empêche les effets inhibiteurs des radiations ionisantes sur la croissance des cellules MCF-7, en affectant l'expression de différentes protéines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire et la sensibilité vis-à-vis de l'apoptose.

RESULTATS

Recherches et identification dans les banques de données

Les recherches dans les banques de donnée ont été utilisées pour identifier les protéines par comparaison des masses expérimentales des fragments tryptiques obtenus avec les masses calculées à partir des séquences des banques protéiques (NCBI).

NM23 (nucléoside diphosphate kinases), la stratifin (14-3-3 sigma) et l'HSP27 ont été identifiées pour cette analyse. Ces protéines interviennent dans les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et la survie induits par l'E2 (Figure 3).

MATERIEL ET METHODES

Echantillons protéiques

Les effets des œstrogènes ont été étudiés sur les cellules cancéreuses de sein hormono-dépendantes MCF-7. Les cellules MCF-7 ont été cultivées pendant 48 h dans un milieu MEM sans rouge de phénol contenant 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et déstéroïd (sur charbon actif). 30 minutes avant irradiation, les cellules sont stimulées ou non par 10^{-9} M d'E2. 24 h après irradiation (8 Gy), les protéines sont extraites et séparées par électrophorèse bidimensionnelle sur un gel de polyacrylamide (12 %) et visualisées par une coloration au nitrate d'argent.

Analyses LC-MS/MS et MS/MS

Les protéines séparées sur gel SDS-PAGE ont été digérées par la trypsine, d'après le protocole de Shevchenko *et al.* (1996). Chaque échantillon est réduit et alkylé par le dithiothréitol (DTT) et l'iodoacétamide avant la digestion enzymatique.

Pour l'identification, le produit de digestion de la bande de gel a été analysé par chromatographie capillaire en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), à l'aide d'un système chromatographique Famos-Switchos-UltiMate (LC Packings) connecté à un spectromètre de masse hybride nanoESI-QqTOF (QTOF2, Waters).

Les séparations chromatographiques ont été menées sur une colonne capillaire à polarité de phase inversée (Atlantys C18, 75 μ m d.i., 15 cm de longueur, Waters), à un débit de 200 nL/min, avec un gradient de 100% A (0.1% acide formique/2% acetonitrile / 98% H₂O, v/v) à 30% B (0.085% acide formique/10% H₂O / 90% acétonitrile, v/v) en 9 min, suivi d'un palier de 30 à 60 % pendant 35 min, suivi d'un gradient de 100% de B pendant 15 min.

Les données de LC-MS/MS sont soumises au logiciel de recherche dans les banques de données Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). Les protéines ont été identifiées par confrontation des données expérimentales à la banque de données NCBI.

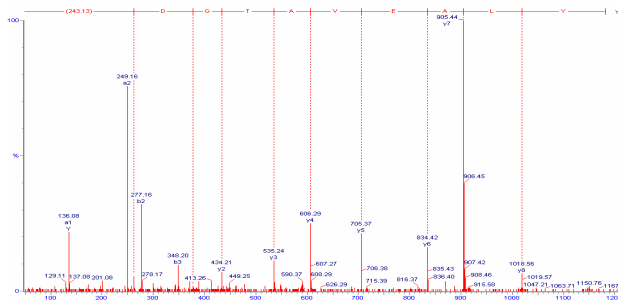


Figure 2 : spectre de fragmentation du peptide (591.24,2+) de la protéine stratifin obtenu en analyse LC-MS/MS automatique.

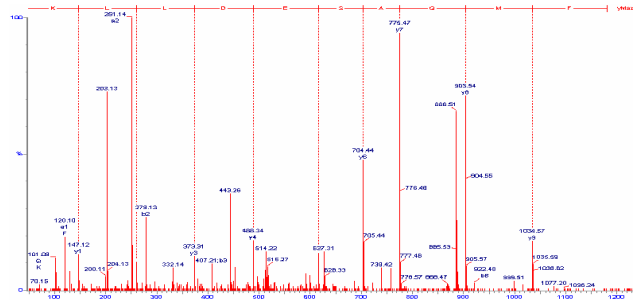


Figure 2 : spectre de fragmentation du peptide (591.28,2+) de la protéine NM23 obtenu en analyse LC-MS/MS automatique.

n° d'accèsion NCBI	Protéine	Peptides identifiés	%de couverture de la séquence	Masse (kDa)	pI
gi1662841	heat shock protein 27 [Homo sapiens]	3	18	22.75	5.98
gi135068	Nm23 protein [Homo sapiens]	7	35	20.03	7.07
gi187302	epithelial cell marker protein 1 (stratifin)	4	16	27.76	4.72

CONCLUSION

Les analyses protéomiques suggèrent que l'E2 entrave les effets inhibiteurs des radiations ionisantes sur la croissance des cellules MCF-7, en affectant l'expression de différentes protéines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire (NM23, 14-3-3 sigma) mais aussi dans la survie (HSP27). Cette étude préliminaire a permis d'identifier les protéines impliquées dans l'effet protecteur des œstrogènes vis à vis des radiations ionisantes. L'implication de ces protéines dans les cascades de transduction induites par l'E2 dans les cellules irradiées est en cours d'étude. L'ensemble de ces recherches devrait à terme permettre de mieux appréhender l'importance des œstrogènes dans les mécanismes de résistances à la radiothérapie (et/ou chimiothérapie) et du point de vue clinique d'améliorer l'efficacité des traitements adjuvants en modifiant leurs associations et leurs séquences d'administration.

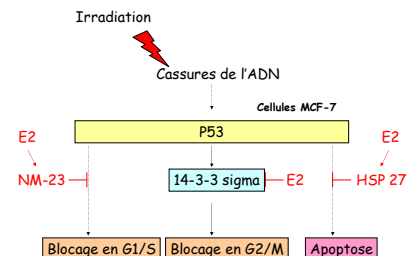


Figure 3

Références

- [1] Schmidberger H, Herrmann RM, Hess GF, Emons G. Interactions between radiation and endocrine therapy in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* (2003) 10(3), 375-388.
- [2] Toillon RA, Magné N, Laïos I, Lacroix M, Devriendt D, Van Houtte P, Leclercq G. Effects of low gamma-ray irradiation doses on sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to estrogenic and anti-estrogenic stimuli. *Breast Cancer Research and Treatment*, sous presse.