

Protéomique, cellules endothéliales et cancer

Bruno Baudin (1,2) , Arnaud Bruneel (1,2), Joëlle Vinh (3), Nelly Bosselut (1)
 (1) Biochimie A, Hôpital St-Antoine (APHP), Paris ; (2) EA-4530, UFR Pharmacie (UPS), Châtenay-Malabry ;
 (3) USR-3149, ESPCI (CNRS), Paris

Introduction
 Les cellules endothéliales (CE) bordent la face interne des artères, des veines et des capillaires où elles sont à l'interface du sang et des vaisseaux. Elles exercent de nombreuses fonctions finement régulées, dont des échanges avec le sang et les tissus sous-jacents, et les régulations du tonus vasculaire, de l'hémostase, de la fibrinolyse, des réponses inflammatoires et immunitaires.
 Les CE interviennent dans le cancer sous plusieurs aspects : leur prolifération menant à l'angiogenèse des tumeurs, la production de facteurs de croissance pour les cellules musculaires lisses de la média favorisant la vasculogenèse tumorale, et leur sensibilité aux chimiothérapies véhiculées par le sang, menant à des effets indésirables.
 Nous avons étudié par la protéomique les CE de la veine ombilicale humaine (HUVEC) cultivées in vitro dans diverses conditions :

- (1) au repos à confluence;
- (2) après traitement par des médicaments (étoposide) anticancéreux toxiques pour les vaisseaux sanguins;
- (3) par des substances (PMA) mimant l'angiogenèse tumorale.

Résultats (2)
 2-DE/HUVEC 60 µg pH 4-7 (CCB) :
 7 Δ protéines identifiées (Proteomics 2005)

	Contrôle	Etoposide 1 mg/ml
cofilin	+	-
LRP	+	-
bovine apo-A 1	+	-
tropomyosin 1	+	-
GRP 94	-	+
GRP 78	-	+
PI-9	+	-
VCP	+	-

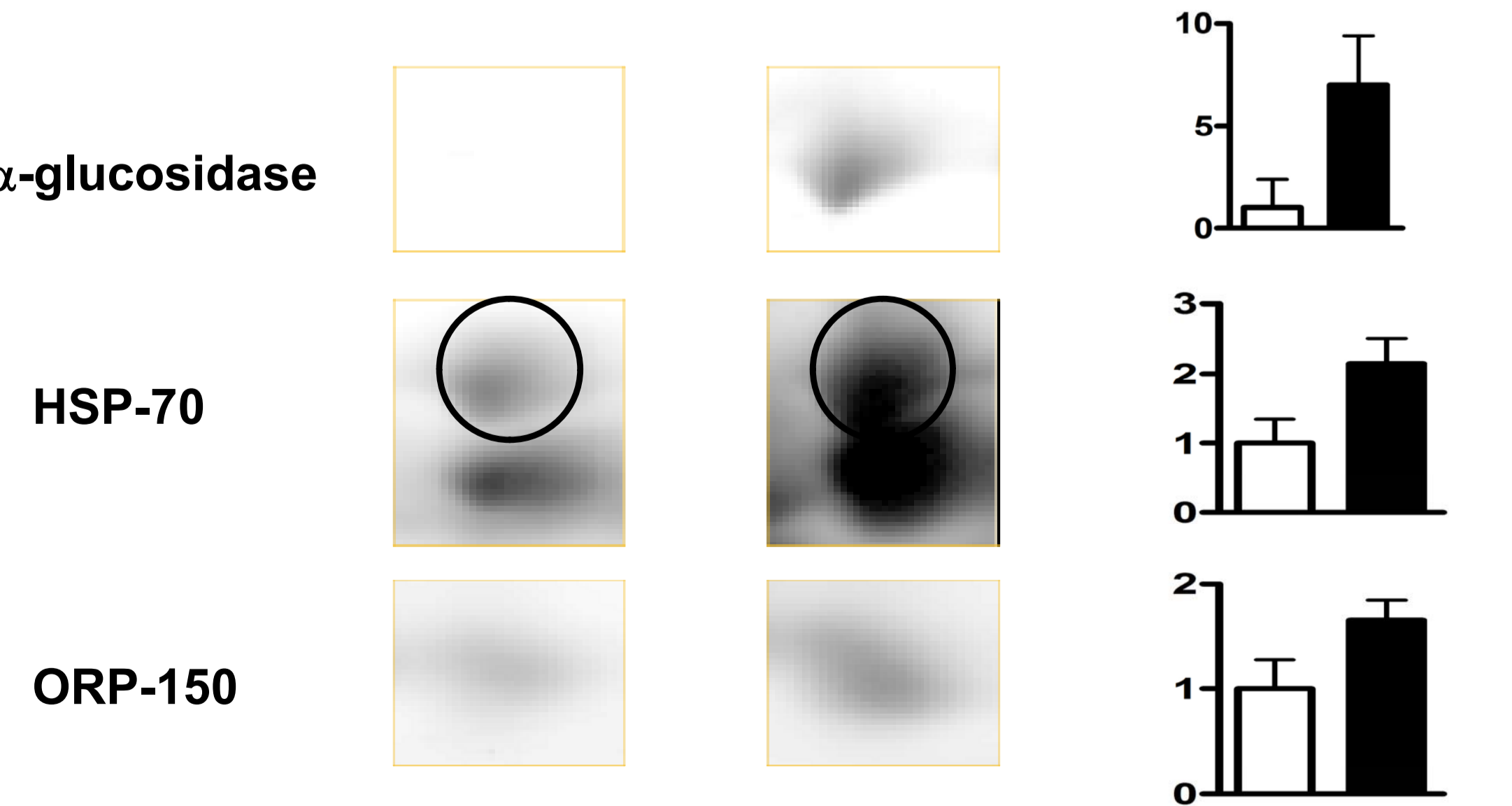
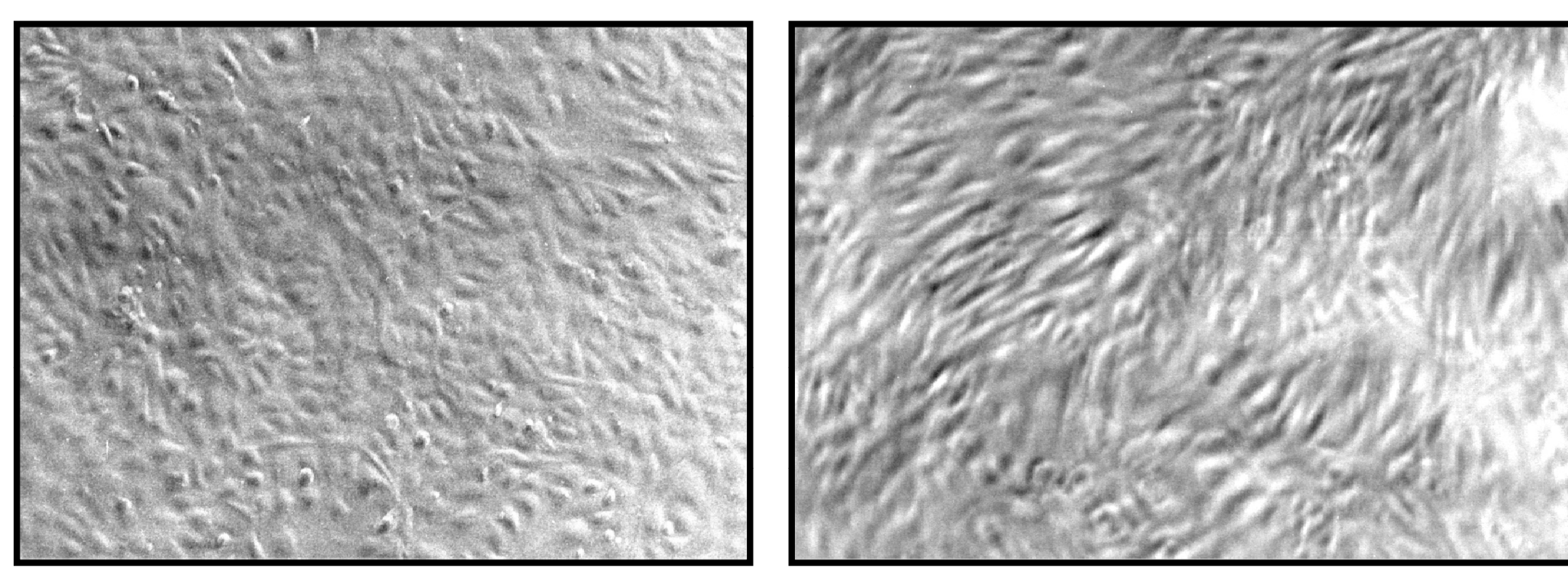
Matériel et méthodes

- **Modèle d'étude** : HUVEC (*Nature Protocols*, 2007)
- **2-DE** : IPG 3-10 ou 4-7; PAGE-SDS 8-18 %; AgNO₃ ou Colloïdal Coomassie Blue (CCB)
- **Analyse d'images** : ImageMaster (GE Healthcare)
- **Spectrométrie de masse** : ESPCI
- **MALDI-TOF** : Voyager DE-STR (Applied Biosystems)
- **MALDI-TOF/TOF** : 4800 Applera (Applied Biosystems)
- **nanoLC-MS/MS** : Ultimate LC/C18 (LC-Packings) et Q-TOF2 (Micromass)
- **FTICR-MS** : Ultimate 3000 Dionex (LC-Packings) et LTQ-FT (Thermo Scientific)
- **Identifications** : Mascot (UniProtKB ou GPS Explorer) pour recherche dans banques de données SwissProt

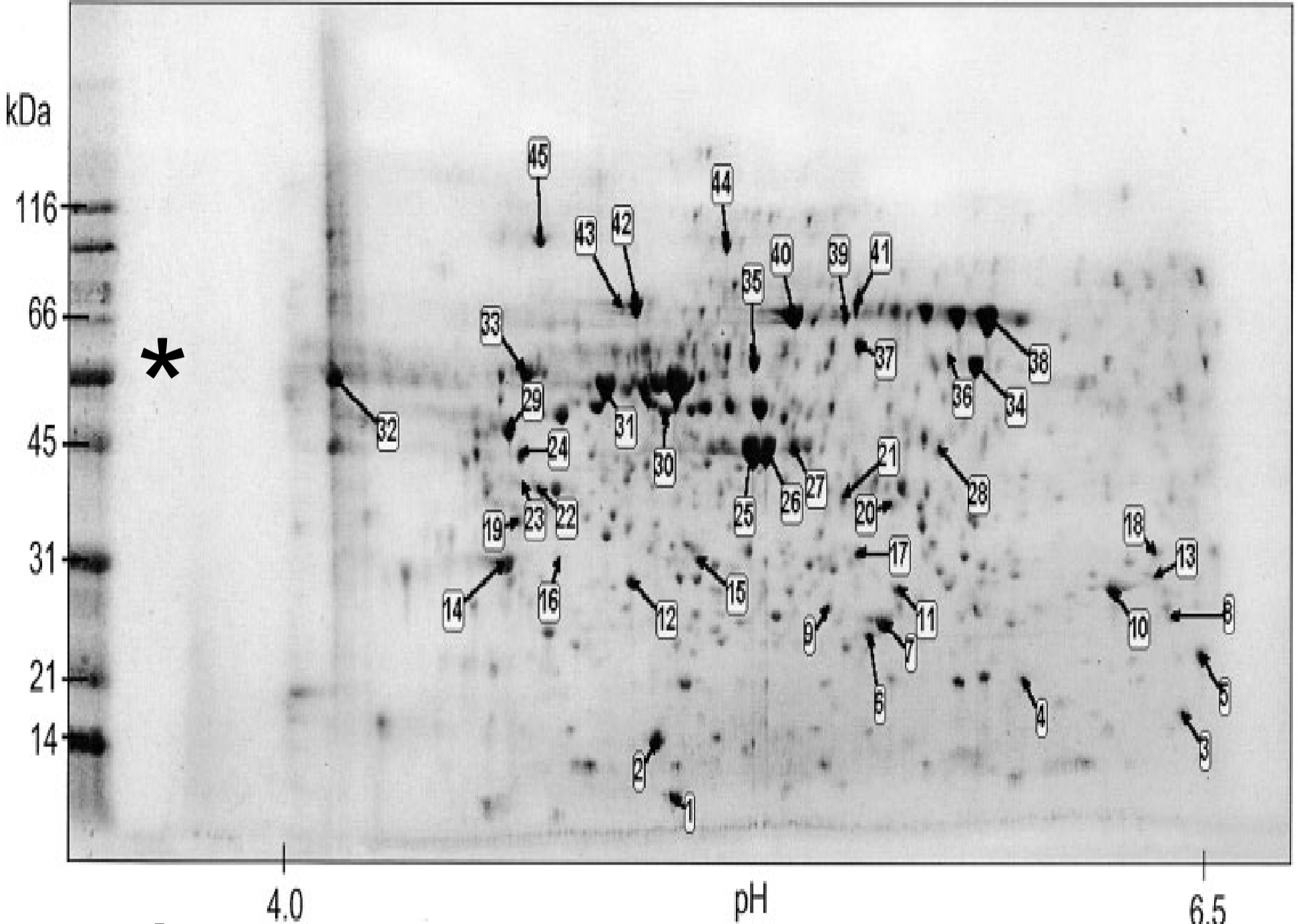
Résultats (1b)
 2-DE/HUVEC 60 µg pH 4-7 (CCB)
 FTICR-MS : 521 protéines identifiées

205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221
188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204
171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187
154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153
120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136
103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102
69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17

Résultats (3)
 2-DE/HUVEC 30 µg pH 4-7 (CCB); PMF/MALDI-TOF/TOF :
 7 Δ protéines identifiées (3 élévations montrées ici)
 Contrôle PMA 1 µg/ml (24h)



Résultats (1a)
 2-DE/HUVEC 30 µg pH 4-7 (CCB)
 PMF/MALDI-TOF, LC-MS/MS : 53 protéines identifiées (Proteomics, 2003)



Résultats (1c) : HUVEC.com update 2010

HUVEC.COM
 Proteomics of Human Umbilical Vein Endothelial Cell

Home | Technicals | 2D patterns | Staff | Publications | Links | Admin

2D PATTERNS OF HUVECs

Click a gel for further informations

	<p>Gel #1</p> <ul style="list-style-type: none"> • Two-dimensional pattern of quiescent HUVECs in primary culture (459 spots) • ~30 µg of proteins • pH 4-6.5 • Colloidal Coomassie blue
	<p>Gel #2</p> <ul style="list-style-type: none"> • Two-dimensional pattern of quiescent HUVECs in primary culture (556 spots) • ~60 µg of proteins • pH 4-7 • Colloidal Coomassie blue

Conclusions

- **Protéome des HUVEC à confluence** : plus de 600 protéines identifiées, dont 40 % jamais identifiées dans les HUVEC, et 24 % jamais identifiées dans des CE. Création d'un site web (HUVEC.com) avec plus de 80.000 visites à ce jour. (*Genomics Proteomics Bioinformatics* 2006)
- **Apoptose des HUVEC induite par l'étoposide** :
 - **Élévations** : Glucose-related protein (GRP) 78
 - **Diminutions** : GRP 74, Valosin-containing protein (VCP), proteinase-inhibitor 9 (PI-9), 37-kDa laminin-receptor protein (LRP), cofiline, tropomyosine 1. GRP anti-apoptotiques (activation de la calpaïne et des caspases), PI-9 inhibiteur de Granzyme B (pro-apoptotique), VCP associée à l'apoptose de stress induite par le réticulum endoplasmique (RE), cofiline associée au cytosquelette d'actine (initiation de la voie mitochondriale de l'apoptose).
- **Modifications induites par le PMA** :
 - **α-glucosidase** : adaptation énergétique
 - **HSP 70** : chaperon de stress/VEGF
 - **150 kDa oxygen-regulated protein (ORP 150)** : réponse à l'hypoxie, sécrétion du VEGF par RE.