

TLEMCEM
N° D'ORDRE

UNIVERSITE DE TLEMCEM- ABOU-BEKR BELKAID
FACULTE SNV/STU- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie



Mémoire

Présenté pour obtenir le grade
DE MASTER II EN BIOLOGIE ET SANTE
Option : **ALIMENTATION ET NUTRITION**

Par

Abdelkrim HADDJERI

Soutenu le 8 juillet 2012

Intitulé :

**ETUDE PROTEOMIQUE CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE LYMPHOME NON-
HODGKINIEN**

JURY :

Mme MOKHTARI N

Maître de conférences A

Présidente

Mme BOUANANE S

Maître de conférences A

Examinatrice

Mr ARIBI M

Maître de conférences A

Promoteur

8 juillet 2012

Background

Les lymphomes malins non-Hodgkiniens sont des hémopathies malignes qui se développent à partir des cellules lymphoïdes. La protéomique offre la possibilité d'étudier l'expression différentielle des protéines dans l'état physiologique et pathogène, dans les tissus et les liquides biologiques afin de rechercher les marqueurs de la maladie.

Objectif : Ce travail consiste à rechercher des protéines candidats susceptibles d'être des biomarqueurs sanguins du lymphome non-Hodgkinien.

But : Le but est de détecter les protéines communes chez les patients atteints du LNH et différemment exprimées chez les contrôles.

Matériels et Méthodes : Les sérums de vingt trois (23) patients atteints LNH (huit femmes et quinze hommes âge moyen $48,26 \pm 0,92$ ans) ainsi que vingt trois sujets sains (huit femmes et quinze hommes d'âge moyen de $38,04 \pm 0,14$ admis respectivement au service d'Hématologie et au centre de transfusion sanguin du Centre Hospitalo-universitaire de Tlemcen ont servi à l'étude protéomique par la technique SDS-PAGE

Résultats

Il existe une différence dans la séparation des protéines entre les patients et les témoins et 3 bandes protéiques sont détectées chez tout les patients atteints du lymphome non-Hodgkinien.

Conclusion

A l'issue de ce travail, portant sur la recherche des protéines candidats susceptibles d'être des biomarqueurs du LNH nous avons pu détecter trois protéine de faible poids moléculaire qui caractérisent les profils électrophorétique des patients.

Mots clés : Lymphome Non-Hodgkinien, protéomique, biomarqueur, protéine, profils électrophorétique.

Abstract**Background**

Malignant non-Hodgkin's lymphomas are malignancies that develop from lymphoid cells. Proteomics offers the possibility to study differential protein expression in the state and physiologic pathogen in tissues and body fluids to look for markers of the disease.

Objective

This work is to search for proteins that could be candidates for blood biomarkers of non-Hodgkin lymphoma.

Aim

The purpose is to detect proteins common in patients with NHL and differentially expressed in controls.

Materials and Methods

Sera from twenty three (23) NHL patients (eight women and five men mean age 48.26 ± 0.92 years) and twenty-three healthy subjects (eight women and fifteen men with mean age of 38.04 ± 0.14 respectively) admitted to the service of Hematology and blood transfusion Centre of the University Hospital of Tlemcen have served in the proteomic study by SDS-PAGE

Results

There is a difference in the separation of proteins between patients and controls however 3 proteins are detected in the patient with Non-hodgkin lymphoma.

Conclusion

At the end of this work, research on proteins likely to be candidate biomarkers of NHL we could detect three low molecular weight proteins that characterize the electrophoretic profiles of patients.

Keywords

Non-Hodgkin lymphoma, proteomics, biomarker, protein, electrophoretic profiles.

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier tout particulièrement les membres du jury pour leur ferveur et dévotion, ainsi que leur honorable présence.

- Docteur Mourad ARIBI, Directeur du laboratoire BIOMOLIM, UABT.
- Mme SOULAIMANE MOKHETARI Nassima. Maître assistant A, UABT.
- Mme BOUANANE Samira. Maître assistant A, UABT.

J'exprime aussi ma sincère gratitude à mes enseignants pour leur soutien et leurs conseils durant les cinq années universitaires.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie, sous la direction du docteur Mourad ARIBI. Qu'il soit persuadé de mes vives reconnaissances. A pour objectif de rechercher des protéines candidats, susceptibles d'être des biomarqueurs sanguins du lymphome non-Hodgkinien.

Il a été accompli en collaboration avec mes collègues Mme ABABSA Khiera, Melle OUMANSOUR Hanane, Mr SALAH Nadir, Mr AMIMER Ali.

Le présent mémoire est structuré en six chapitres : Revues de la littérature, Matériels et méthodes, Résultats et interprétation, Discussion, Conclusions et Perspectives, Bibliographie.

Il s'inscrit dans le cadre de ma formation universitaire pour l'obtention du grade de Master II de biologie moléculaire et cellulaire, option : Alimentation et nutrition.

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, à ma fiancée et à toutes les personnes que j'estime.

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	III
Abstract.....	IV
Avant-propos	V
Table des matières.....	VI
Liste des tableau.....	VIII
Liste des figures.....	IX
Liste des abréviations	X
Introduction.....	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	3
1.1 Lymphomes non-Hodgkinien.....	3
1.1.1 Epidémiologie	3
1.1.1.1 LNH à Tlemcen	3
1.1.2 Diagnostique.....	4
1.1.3 Classification	4
1.1.3.1 Classification selon OMS	4
1.1.3.2 Classification d'Ann Arbor	6
1.1.4 Les lymphomes à grandes cellules B.....	7
1.2 Protéines	8
1.2.1 1.2.1 Le chemin entre gènes et protéines.....	8
1.2.2 Complexité des systèmes moléculaires cellulaires.....	9
1.2.3 Les acides aminés.....	9
1.2.4 Liaison peptidique.....	11
1.2.5 Protéomique	12
1.2.6 Approche protéomique sur les fluides biologiques.....	12
1.3 Biomarqueures.....	13
1.3.1 Biomarque tumoral protéique.....	14
1.3.2 Protéines du plasma/sérum	14

1.3.3 Recherche de biomarqueurs dans LNH	17
Chapitre 2 Matériels et méthodes.....	19
2.1 Caractéristiques de l'échantillon	19
2.2 Matériel biologique.....	21
2.3 Méthode d'étude.....	21
2.3.1 Electrophorèse	21
2.3.2 SDS-PAGE.....	21
2.3.3 Extraction des protéines sériques.....	22
2.3.4 Préparation des gels.....	22
2.3.4.1 Gel de séparation (running gel).....	23
2.3.4.2 Gel de concentration (staching gel).....	23
2.3.4.3 Tampon d'electrophorèse.....	23
2.3.4.4 Marqueur protéiques du poids moléculaire.....	24
2.3.4.5 Migration	24
2.3.4.6 Coloration et fixation.....	25
Chapitre 3. Résultats et interprétations.....	27
Chapitre 4. Discussion.....	29
Chapitre 5. Conclusion et perspective.....	30
Chapitre 6. Bibliographies.....	31
Annexe.	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Classification de l'OMS 2008 des lymphomes non-Hodgkinien.....	4
Tableau 1.2 Classification d'Ann Arbor.....	6
Tableau 1.3 Lymphomes diffus à grandes cellules B : classification OMS 2008.....	7
Tableau 1.4 Les vingt acides aminés.....	10
Tableau 1.5 Liste des protéines identifiées dans le plasma	16
Tableau 2.1 Caractéristiques des patients et des témoins.....	19
Tableau 2.2 Caractéristiques du LNH chez les patients atteints.....	20

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Liaison peptidique.....	11
Figure 1.2 Diagrammes circulaires illustrant la classification des protéines identifiées dans le sérum humain selon les trois principes organisations du consortium Gene Ontology.....	15
Figure 2.1 Répartition de LNH selon les stades (Ann Arbor).....	20
Figure 2.2 Casette pour le gel de polyacrylamide.....	22
Figure 2.3 Vue de face et de profil de cassette.....	23
Figure 2.4 Migration des protéines selon leurs poids moléculaire.....	24
Figure 2.5 Cuve d'électrophorès verticale.....	25
Figure 2.6 Cuve d'électrophorèse verticale et le générateur de courant.....	25
Figure 2.7 Coloration du gel avec le bleu de Coomassie R250.....	26
Figure 2.8 Le gel après coloration.....	26
Figure 3.1 electrophorégramme avec un témoin et deux patients.....	27
Figure 3.2 profils electrophoretique des patients.....	27
Figure 3.3 la distance parcourue par les bondes protéiques en fonction du poids moléculaires.....	28

LISTE DES ABREVIATION

1D : première dimension.

ADN: acide désoxyribonucléique.

APS : persulfate d'ammonium.

ARN: acide ribonucléique.

ARNm: acide ribonucléique messenger.

CRP : protéine C-réactive.

DLBCL : diffuse large B-cell lymphoma.

DSCAM : Down Syndrome Cell Adhesion Molecule.

DTT : Dithiothréitol.

HCV : virus de l'hépatite humaine.

HIV : virus d'immuno-déficiencé humaine .

HUPO: Human Proteome Organization.

kDa : kilodalton

LLC : Leucémie lymphoïde chronique.

LNH : Lymphome non-Hodgkinien.

mA : Mili ampère.

NIH : Institut national américain de la santé.

NK : Natural killer.

NOS : not otherwise specified.

OMS : Organisation Mondiale de Santé.

p : poid.

PPP : Plasma Proteome Project.

R: radicale.

rpm : rotation par minutes.

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

TCA : 2,4,6-tétrachloro-anisole.

TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine.

Tris HC : trishydroxyméthylaminométhane

V : volte.

v : volume.

Introduction

Les lymphomes non-Hodgkiniens (LNH) forment un groupe hétérogène de cancers issus de la transformation néoplasique des lymphocytes B, T et rarement les NK, de nombreuses formes de la maladie (ou entités) existent, une trentaine dans la classification actuelle de l'OMS qui sont identifiées sur la base de données cliniques, histologiques et génétiques (Dupuis et Haioun., 2008). Leur incidence a augmenté au cours des 20 dernières années dans le monde, principalement dans les pays développés, les données épidémiologiques montrent que cette pathologie affecte une population large et très hétérogène (âge, sexe) (Amégbor *et al.*, 2010).

La découverte des biomarqueurs permettant le diagnostic de différentes pathologies telles que la troponine libérée dans le sang après un infarctus du myocarde, la protéine C-réactive (CRP) dans l'état inflammatoire, la thyroglobuline dans le cancer de la thyroïde métastatique après ablation de la thyroïde, et bien d'autres marqueurs de maladies a encouragé la recherche des marqueurs protéiques spécifiques notamment dans les cancers et les maladies néoplasiques en utilisant une approche protéomique (Anderson, 2010).

La notion de protéomique est apparue dans les années 1990 en définissant le protéome, mot hybride associant protéine et le suffixe « ome » (désignant un ensemble ou un système), comme l'ensemble des peptides et protéines codés par un génome à un instant donné et dans un environnement spécifique. Depuis, le concept a été étendu à l'ensemble des protéines d'un organite, d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme entier. La protéomique fait partie des approches dites « post-génomiques ». Contrairement au génome, le protéome d'une cellule ou d'un tissu est hautement dynamique puisqu'il évolue en fonction de son environnement. Ces paramètres extérieurs influencent la complexité du protéome par la régulation au niveau transcriptionnel de l'expression des gènes et en modulant les modifications post-traductionnelles des protéines (Trocmé *et al.*, 2011)

La protéomique ouvre de nouveaux horizons dans plusieurs domaines de recherche en sciences de la vie (Vitzthum, 2005). En effet, l'analyse des protéines offre de nombreuses occasions de détecter et caractériser les dysfonctionnements moléculaires liés à la maladie et sa progression chez le sujet atteint (Anderson, 2010), en plus il y a un intérêt substantiel dans l'application de la protéomique pour l'identification des marqueurs de maladies. Les approches incluent l'analyse comparative de l'expression des protéines dans les tissus normaux et pathologiques pour identifier les protéines exprimées de manière aberrante qui peuvent représenter des nouveaux biomarqueurs (Hanash, 2003).

Dans la plupart des cancers, la transformation en cellules malignes résulte d'altérations épigénétiques qui se traduisent par l'expression aberrante de gènes spécifiques d'un tissu ou d'un type cellulaire particulier. L'expression illégitime de ces gènes constitue un potentiel de biomarqueurs. A l'heure actuelle, il n'existe pas de marqueurs protéiques tumoraux possédant une spécificité et une sensibilité suffisantes pour avoir des retombées pratiques, notamment dans le diagnostique, le pronostique et le traitement des cancers. Grace aux différentes approches protéomiques développées récemment, plusieurs marqueurs protéiques ont été caractérisés laissant ainsi entrevoir de nouvelles stratégies de dépistage et de traitement. (Hamrita *et al*, 2011).

Les LNH diffus à grande cellule B (*DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma*) causent un vrai problème de santé publique dans notre pays et dans le monde (OMS, 2008) et sont la classe la plus fréquente et représente un tiers des LNH (Fermé et Roman, 2010).

A cet égard, nous avons mis en place une étude à la recherche de protéines candidats, susceptibles d'être des biomarqueurs sanguins du lymphome non-Hodgkinien à grande cellule B, en adoptant une approche protéomique et en utilisant la séparation des protéines en première dimension (1D), par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante, la technique est appelée *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1 Lymphomes non-Hodgkiniens

Les LNH sont des néoplasies qui peuvent réaliser tantôt des leucémies, tantôt des tumeurs solides, les deux présentations pouvant coexister ou se succéder chez un même patient. Trois groupes de lymphomes sont à distinguer selon la morphologie des cellules néoplasiques, en particulier leur taille, et selon leur immunophénotype. La taille des cellules comparée au noyau d'un macrophage permet de distinguer des lymphomes à petites cellules (plus petite que le noyau des macrophages), à cellules moyennes et à grandes cellules (2 à 4 fois la taille de ce noyau). L'immunophénotype permet de distinguer trois autres groupes de lymphomes non-hodgkiniens (Diebold *et al.*, 2008).

1.1.1 Epidémiologie

Le LNH représente une maladie fréquente en raison d'une augmentation annuelle de 3% à 4% de leur taux d'incidence dans l'ensemble des pays du monde, depuis plus de 30 ans il est devenu le septième cancer le plus fréquent (Drouet *et al.*, 2010). Les taux d'incidence augmentent pour toutes les tranches d'âge, excepté chez l'enfant (< 15 ans), l'incidence la plus importante est observée parmi la population la plus âgée (Leak *et al.*, 2011; Chassagne-Clement *et al.*, 1998).

Dans les pays développés, il est responsable de 3 à 5 % des décès par cancer et de près de 1 % du total de décès, quelle que soit la cause (Bosly, 2007), il est le sixième cancer le plus commun aux États-Unis, avec plus de 65540 nouveaux diagnostics de LNH et 20210 décès attendus en 2010 (Leak *et al.*, 2011). Les LNH représentent aussi la sixième cause de cancers en France (Dupuis *et al.*, 2008).

En Algérie le LNH a une incidence globale de 5.22/100.000 habitants, un âge médian des patients de 49 ans et un pic de fréquence chez les patients de moins de 35 ans (Nacer *et al.*, 2009).

1.1.1.1 LNH à Tlemcen

Le service d'hématologie clinique du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen a enregistré de janvier 2006 à décembre 2011, 112 cas avec un âge moyen de 55 ans ce qui représente une incidence de 7,5 cas pour 100 000 habitants/an (Bouayed et Mesli, 2012).

1.1.2 Diagnostic

Le diagnostic positif repose sur la biopsie d'un échantillon tumoral. Lorsqu'un lymphome est suspecté, il est essentiel que tous les prélèvements (ganglions, biopsie d'une masse extraganglionnaire, biopsie médullaire) soient réalisés. Une analyse histologique et immunohisto-chimique sur le fragment fixé au formol sera pratiquée. (Jo Molina *et al.*, 2011).

1.1.3 Classification

1.1.3.1 Classification selon OMS

Le principe majeur de la classification établie par l'OMS en 2008 est la reconnaissance des LNH selon une combinaison de la morphologie (cytologique, histopathologique), immunophénotype (selon les marqueur CD), cytogénétique, biologie moléculaire, et les caractéristiques cliniques (Campo *et al.*, 2011 ; Drouet *et al.*, 2010 ; Diebold *et al.*, 2008).

Tableau 1.1 Classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) 2008 des lymphomes (Campo *et al.*, 2011 ; Swerdlow *et al.*, 2008).

LYMPHOMES B	LYMPHOMES T et NK
Prolifération de Cellules B «précurseurs »	Prolifération de Cellules T « précurseurs »
Lymphome /leucémie lymphoblastique B	Lymphome/leucémie lymphoblastique T
Proliférations B matures (périphériques)	Proliférations T matures (périphériques)
Leucémie lymphoïde chronique (LLC) B /	Leucémie prolymphocytaire T
Lymphome lymphocytaire	Leucémie lymphocytaire T à gros grains
Leucémie prolymphocytaire B	Syndromes lymphoprolifératifs chroniques à
Lymphome splénique de la zone marginale	cellules NK
Leucémie à tricholeucocytes	Leucémie agressive à cellules NK
Lymphome B splénique/leucémie inclassable	Syndromes lymphoprolifératifs T EBV+ de
Lymphome lymphoplasmocytaire	l'enfant
Maladies des chaînes lourdes	Leucémie/lymphome T de l'adulte (HTLV1+)
Tumeurs plasmocytaires	Lymphome T/NK extraganglionnaire, de type
Lymphome de la zone marginale	nasal
extraganglionnaire du MALT (lymphome du	Lymphome T associé à une entéropathie
MALT)	Lymphome T hépatosplénique
Lymphome de la zone marginale	Lymphome T sous-cutané de type

<p>ganglionnaire</p> <p>Lymphome folliculaire</p> <p>Lymphome primitif cutané centro-folliculaire</p> <p>Lymphome à cellules du manteau</p> <p>Lymphome diffus à grandes cellules B</p> <p>Lymphome B à grandes cellules riche en c.T/histiocytes</p> <p>Lymphome B à grandes cellules du SNC</p> <p>Lymphome B à grandes cellules primitif cutané, de type jambe</p> <p>Lymphome B à grandes cellules EBV+ du sujet âgé</p> <p>Lymphome B à grandes cellules associé à une inflammation chronique</p> <p>Granulomatose lymphomatoïde</p> <p>Lymphome B à grandes cellules du médiastin (thymique)</p> <p>Lymphome B à grandes cellules intravasculaire</p> <p>Lymphome B à grandes cellules ALK+</p> <p>Lymphome plasmablastique</p> <p>Lymphome B à grandes cellules associé à une maladie de Castleman multicentrique HHV8+</p> <p>Lymphome primitif des séreuses</p> <p>Lymphome de Burkitt / leucémie de Burkitt</p> <p>Lymphome B, inclassable, avec aspects intermédiaires entre L. B à grandes c. et Burkitt</p> <p>Lymphome B, inclassable, avec aspects intermédiaires entre L. B à grandes c. et Hodgkin</p>	<p>panniculite</p> <p>Mycosis fongoïde</p> <p>Syndrome de Sézary</p> <p>Syndromes lymphoprolifératifs T CD30+ primitifs cutanés</p> <p>Lymphomes T primitifs cutanés, de sous-type rare</p> <p>Lymphomes T primitifs cutanés gamma-delta</p> <p>Lymphomes primitifs cutanés agressifs épidermotropes CD8+cytotoxiques</p> <p>Lymphomes primitifs cutanés CD4+</p> <p>Lymphomes T périphériques sans autre précision</p> <p>Lymphome T angio-immunoblastique</p> <p>Lymphome anaplasique à grandes cellules ALK+</p> <p>Lymphome anaplasique à grandes cellules ALK⁻</p>
---	--

1.1.3.2 Classification d'Ann Arbor

Cette classification se fait selon le nombre d'aires ganglionnaires atteintes et leur localisation par rapport au diaphragme. ainsi par rapport à la présence ou non d'atteinte extra-ganglionnaires (Drouet *et al.*, 2010).

Tableau 1.2 Classification d'Ann Arbor

Stade	Extension de la maladie
Stade I	Une seule aire ganglionnaire
Stade II	Une seule localisation extra-ganglionnaire (IE)
Stade III	Deux aires ganglionnaires du même côté du diaphragme Si atteinte extra-ganglionnaire de contiguïté (IIE)
Stade VI	Plus de deux territoires ganglionnaires atteints et situé des deux côtés du diaphragme (III) <ul style="list-style-type: none"> - Si atteinte extra-ganglionnaire localisée (IIIE) - Si atteinte splénique (IIIS) - Si atteinte extra ganglionnaire localisée et splénique (IIISE) <ul style="list-style-type: none"> - Atteinte diffuse d'une ou plusieurs structures non ganglionnaires avec ou sans atteinte ganglionnaire
Sigle	Classification clinico-biologique
A	absence des signes cliniques suivants: amaigrissement > 10% au cours des derniers 6 mois, sueurs, fièvre.
a	présence d'au moins des signes cliniques
B	absence de syndrome inflammatoire

b	présence de syndrome inflammatoire
x	présence d'une masse bulky

1.1.4 Les lymphomes à grandes cellules B

Les lymphomes diffus à grandes cellules B sont la variété la plus fréquente des lymphomes non hodgkiniens : ils représentent 30 à 40 % de de l'ensemble des lymphomes. Leur incidence a augmenté de façon importante sans aucune explication précise ne soit apportée. (Bosly *et al.*, 2007). Ces lymphomes sont très hétérogènes sur le plan clinique, morphologique, phénotypique et moléculaire. Toute fois, il existe au sein de ce groupe hétérogène, des entités anatomocliniques bien définies que le pathologiste doit pouvoir identifier selon les données de la classification OMS 2008 (Jo Molina *et al.*, 2011).

Tableau 1.3 Lymphomes diffus à grandes cellules B : classification OMS 2008

1. Lymphome diffus à grandes cellules B, NOS (not otherwise specified)
Variants morphologiques classiques
Centroblastique
Immunoblastique
Anaplasique
Sous-groupes moléculaires
De type centrofolliculaire (germinal center-like)
De type activé B (activated B cell-like)
Sous-groupes immunohistochimiques
DLBCL CD5+
De type centrofolliculaire (GCB)
De type non centrofolliculaire (non GC-B)
2. Sous-types de DLBCL
Lymphome à grandes cellules B riche en lymphocytes T
DLBCL primitif du système nerveux central
DLBCL cutané primitif, de type jambe (leg-type)
DLBCL EBV positif du sujet âgé.

3. Autres lymphomes à grandes cellules
Lymphome à grandes cellules B primitif du médiastin (thymique) Lymphome à grandes cellules B intravasculaire DLBCL associé à inflammation chronique Granulomatose lymphomatoïde Lymphome à grandes cellules B ALK+ Lymphome plasmoblastique Lymphome à grandes cellules B survenant dans les maladies de Castleman multicentrique HHV-8+ Lymphome primitif des séreuses
4. Formes frontières
Lymphome B, inclassable, avec des aspects intermédiaires entre un DLBCL et un lymphome de Burkitt Lymphome B, inclassable, avec des aspects intermédiaires entre un DLBCL et un lymphome Hodgkinien classique

1.2 Protéines

Les protéines sont des polypeptides, c'est-à-dire des polymères non branchés d'acides aminés. Les acides aminés sont porteurs de deux fonctions chimiques : amine et acide carboxylique. Il existe deux types de conformation locale de la chaîne polypeptidique : une forme où le squelette est replié en hélice (hélice α), et une forme où le squelette est replié de manière à former une surface plus ou moins plane (plissée, feuillet β) [Malliavin et Dardel., 2002]. Les protéines sont des véritables machines moléculaires responsables de l'exécution de la fonction catalytique et structurelle, ainsi que de nombreuse signalisation qui assurent les fonctions des organismes vivants (Andersones., 2010).

1.2.1 Le chemin entre gènes et protéines

La transcription de l'ARN est la première étape de récupération de l'information codée dans l'ADN, elle est régulé au niveau de la zone promotrice et des régions de régulation beaucoup plus en amont ou en aval du gène. Les L'ARNm subiront une maturation dans le noyau des cellules avec clivage des introns et aboutement des exons (épissage) [Edelman., 2005 ; Porquet, 2003]. Les protéines issus de la traduction de l'ARNm mature subiront des modifications dites post-traductionnelles, pour parvenir à leurs formes biologiquement active,

cette maturation des protéines a lieu d'abord dans la cavité du réticulum puis dans l'appareil de Golgi, où il aura lieu le repliement tridimensionnel, des phosphorylations intervenant souvent dans des régulations métaboliques, des modifications chimiques des extrémités N et C terminales de la chaîne polypeptidiques (Baudin *et al.*, 2010).

1.2.2 Complexité des systèmes moléculaires cellulaires

La forte complexité des mécanismes cellulaires résulte de la succession de nombreux niveaux parmi lesquels :

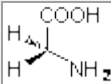
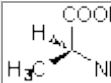
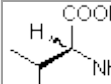
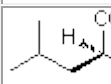
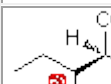
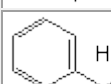
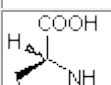
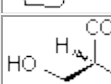
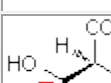
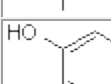
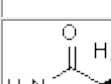
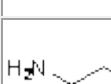
Un grand nombre de gènes environ 30 000, la méthylation des cytosines qui est une modification épigénétique centrale et qui joue un rôle essentiel dans les processus de la diversité cellulaires y compris la régulation du génome dans le développement normal et dans la maladie (Lister *et al.*, 2009), les séquences non codantes des gènes sont également transcrites, l'épissage alternatif des transcrits primaires en plus ces modifications surviennent avec des recombinaisons plus ou moins aléatoires (pinet *et al* 2007) ; on cite souvent l'exemple du gène *DSCAM* de la drosophile qui comporte 38 000 transcrits possibles, A cela s'ajoute que le protéome est une entité variable d'un type cellulaire à l'autre (il existe chez l'humain environ 200 types cellulaires de base, donc 200 protéomes de base) et d'une condition physiologique à une autre puisque les cellules ajustent leur contenu protéique en fonction des conditions dans lesquelles elles se trouvent (en cas de stress par exemple) et d'autre part les protéines sont constituées de 20 éléments chimiques de bases (les acides aminés majoritaires) qui peuvent être modifiés de multiples façons environs 200 types de modifications post-traductionnelles: phosphorylation, glycosylation, ubiquitination etc (Falgarone et Boissier, 2004).

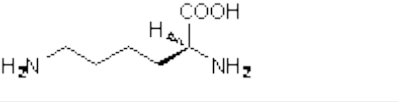
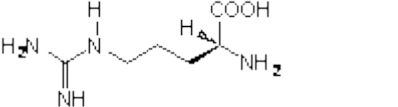
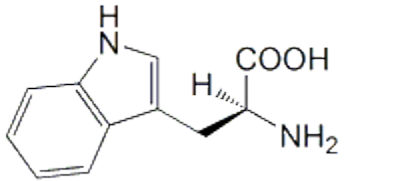
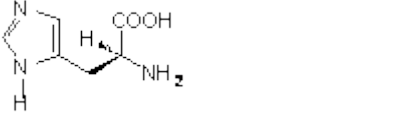

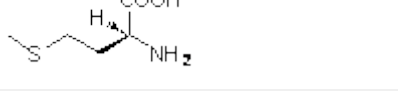
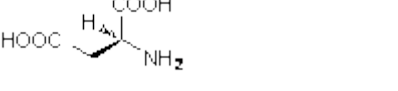
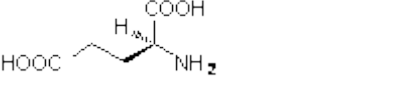
1.2.3 Les acides aminés

Chez l'Homme, ainsi que chez de nombreuses espèces, il existe vingt acides aminés différents qui composent les protéines. Un acide aminé est une substance organique contenant un carbone tétraédrique central sur lequel sont fixés une fonction amine, une fonction acide carboxylique, un hydrogène et un groupement variable (R) Les atomes lourds au sein des chaînes latérales sont numérotés dans l'ordre de l'alphabet Grec, le carbone α étant le carbone aliphatique sur lequel la chaîne latérale se greffe. Les hydrogènes sont numérotés en fonction de l'atome lourd auquel ils sont liés (Malliavin et Dardel, 2002).

Les vingt acides aminés portent différents types de chaînes latérales : des chaînes latérales aliphatiques non chargées, des chaînes latérales portant des groupements amides chargés à leurs extrémités ou des chaînes latérales non chargées mais polaires (à cause de la présence de fonctions carboxyliques). Les acides aminés sont classés en quatre groupes correspondant à ces différents types de chaînes latérales (Malliavin et Dardel, 2002).

Tableau 1.4 Les vingt acides aminés

Formule	Nom Code à 3 lettres Code à 1 lettre	pKa (COOH)	pKa (NH ₂)	pI
	Glycine Gly G	2.3	9.6	6.0
	Alanine Ala A	2.3	9.7	6.0
	Valine Val V	2.3	9.6	6.0
	Leucine Leu L	2.4	9.6	6.0
	Isoleucine Ile I	2.4	9.6	6.0
	Phénylalanine Phe F	1.8	9.1	5.5
	Proline Pro P	2.0	10.6	6.3
	Sérine Ser S	2.2	9.2	5.7
	Thréonine Thr T	2.1	9.1	5.6
	Tyrosine Tyr Y	2.2	9.1	5.6
	Asparagine Asn N	2.0	8.8	5.4
	Glutamine Gln Q	2.2	9.1	5.7

	Lysine Lys K	2.2	9.0	9.7
	Arginine Arg R	2.2	9.0	10.8
	Tryptophane Trp W	2.8	9.4	5.9
	Histidine His H	1.8	9.2	7.6
	Cystéine Cys C	2.0	10.3	5.1
	Méthionine Met M	2.3	9.2	5.7
	Acide Aspartique Asp D	1.9	9.6	2.8
	Acide Glutamique Glu E	2.2	9.7	3.2

1.2.4 Liaison peptidique

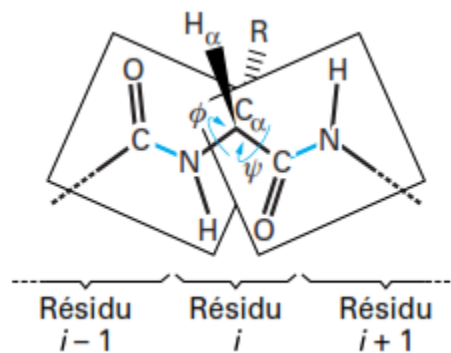


Figure 1.1 Liaison peptidique. Les quatre atomes C, O, N et H sont coplanaires. Au sein de chaque résidu i , la conformation de la chaîne principale de la protéine est définie par les valeurs des angles dièdres ϕ et ψ .

1.2.5 Protéomique

L'ère de la protéomique contemporaine commence en 1994. Cette année-là, Mark Wilkins définit pour la première fois le protéome comme un ensemble de protéines codées par un génome. Aujourd'hui, nous entendons dire par étude du protéome, l'analyse systématique des protéines, qui englobe identification, quantification, structure et fonction à l'échelle d'un organe, d'une cellule, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme. Le but de ces études est de mieux comprendre les fonctions des protéines à l'état normal et pathologique (Edelman, 2005), un organisme possède une très grande diversité de protéomes alors qu'il ne renferme qu'un seul génome. C'est une différence fondamentale entre protéome et génome qui doit conduire à une approche réaliste de l'analyse protéomique. Chez les procaryotes, le protéome est une notion assez simple (un seul compartiment, un nombre restreint de protéines, peu de modifications post-traductionnelles). A l'opposé, un vertébré supérieur qui renferme environ 200 tissus différents, dans une dizaine de contextes de développement physiologiques, sans compter les situations pathologiques, ce qui se traduit par l'existence de milliers de protéomes (Garin *et al.*, 2001). La protéomique est donc l'analyse du protéome et elle consiste à caractériser de manière quantitative et qualitative l'ensemble des protéines présentes dans un échantillon biologique obtenu dans des conditions définies, la comparaison des profils protéiques d'échantillons variés dans le but de définir les protéines différentiellement exprimées est appelé protéomique différentielle (Pinet *et al.*, 2007) la protéomique différentielle clinique utilise des techniques de protéomique pour étudier la pathologie et sa progression. (Wen *et al.*, 2012).

Il faut d'emblée signaler que l'analyse protéomique se heurte à de nombreuses difficultés : il y a une quantité considérable de protéines possibles à analyser (sans doute plusieurs millions chez l'homme, en particulier du fait de la diversité des modifications post-traductionnelles) ; la mise en évidence de protéines faisant l'objet de modifications mineures (mutation nucléotidique ponctuelle de type faux sens, aboutissant à une modification portant sur un seul acide aminé) reste très difficile ; les protéines sont des entités chimiques qui présentent une certaine fragilité en particulier vis-à-vis des protéases et des agressions physiques (Porquet, 2003).

1.2.6 Approche protéomique sur les fluides biologiques

Pendant des années, les bios fluides tels que le sérum, le plasma et l'urine ont joué un rôle de première importance dans le domaine de découverte des biomarqueurs. Ils sont considérés comme des rivières de protéines et des peptides qui s'écoulent à travers les

cellules ou tissus de l'organisme, et reflètent comme un miroir l'état physiologique ou pathologique (Biosa *et al.*, 2011) .

Les nombreuses études protéomiques publiées jusqu'à présent et s'intéressant à une multitude de pathologies ont abouti à la caractérisation de biomarqueurs de diagnostics, pronostiques ou thérapeutiques dans la majorité des liquides biologiques tels que, par exemple, l'urine, le liquide céphalo-rachidien, le lavage broncho-alvéolaire, le liquide synovial, la salive, le liquide amniotique ou encore le sperme. Néanmoins la plupart de ces recherches est réalisée sur du plasma ou du sérum qui sont les liquides biologiques les plus accessibles. La qualité de l'étude et la pertinence des résultats nécessitent une maîtrise de la collection et la conservation des échantillons. La *Human Proteome Organization* (HUPO) a en particulier publié des recommandations pour le traitement du plasma et du sérum (Trocmé *et al.*, 2011).

1.3 Biomarqueurs

En 2001, le groupe de travail de l'Institut national américain de la santé (NIH) a standardisé la notion d'un biomarqueur en le définissant comme une caractéristique objectivement mesurée et évaluée et comme indicateur des processus biologiques normaux, des processus pathogènes, ou des réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique (Mendoza et Abreu, 2009). La biochimie clinique fait une très vaste utilisation réussie des biomarqueurs, comme le cholestérol, le niveau du glucose, etc ; afin de déterminer et de surveiller l'état de santé d'un patient. Leur interprétation est généralement intégrée dans un cadre de diagnostic, principalement parce que très peu d'entre eux sont spécifiques à une maladie particulière. (Kolch *et al.*, 2005).

Les biomarqueurs peuvent être décrits comme les signatures biochimiques modèles qui peuvent être associés à un état pathologique. Par exemple, l'abondance, la concentration et l'état physique des protéines peut avoir une liaison avec un processus biologique ou d'une maladie. Ces marqueurs peuvent aider à améliorer la compréhension des états pathologiques et jouent un rôle important comme facteurs pour le diagnostic précoce et la progression de la surveillance de diverses maladies cardiovasculaires, respiratoires, rénales et des maladies néoplasiques (Ratcliffe *et al.*, 2009).

L'arrivée de l'âge du génome semble avoir promis que nous allons être en mesure d'affiner l'analyse des biomarqueurs à un niveau où il peut à lui seul, permettre le diagnostic des maladies, et de prévoir la meilleure forme de thérapie pour une personne, mais les

changements génomiques sont relativement statiques, alors que le protéome est dynamique, ce qui reflète les changements physiologiques et pathologiques beaucoup plus aiguës et précis. Le défi est de taille et la protéomique joue un rôle clé dans le développement de la recherche de nouveaux biomarqueurs spécifiques et sensibles. (Kolch *et al.*, 2005).

1.3.1 Biomarqueur tumoral protéique

Un marqueur tumoral est une molécule présente dans l'environnement tumoral qui peut être utilisée à des fins de diagnostic et de pronostic. De tels marqueurs sont généralement sécrétés ou libérés par les cellules tumorales ou par leur microenvironnement. La recherche du marqueur idéal doit répondre à plusieurs critères, notamment la spécificité, la sensibilité et la valeur prédictive positive. Ils sont souvent divisés en trois grands groupes : les marqueurs sécrétés par la tumeur, les marqueurs sériques et les marqueurs témoignant d'une réaction de l'hôte à l'environnement tumoral (auto-anticorps) [Hamrita *et al.*, 2011].

1.3.2 Protéines du plasma/sérum

Le plasma ou le sérum représente un échantillon idéal pour l'analyse protéomique pour sa facilité de prélèvement et parce que de nombreuses protéines se trouvent excrétées dans ce fluide devenant ainsi très informatif (Ortiz *et al.*, 2011 ; Kim, 2010). Le protéome plasmatique / sérique est la version la plus utile du protéome humain pour des investigations cliniques à des fins de diagnostic et de traitement. (Wen *et al.*, 2012). En effet, le plasma /sérum contient les hormones, les facteurs de croissance, des neuropeptides et les neurotransmetteurs qui fournissent des informations précieuses concernant le courant état de santé ou de maladie et les nombreux processus qui ont lieu dans le corps (Biosa *et al.*, 2011 ; Cheung *et al.*, 2008), le protéome plasmatique/sérique est une source inestimable d'informations biologiques, en particulier dans le cadre de l'identification des biomarqueurs de la maladie (Greening et Simpson, 2011) .

Cependant, le plasma /sérum peut être considéré comme l'une des matrices biologiques les plus complexes : plus de 60 % de la masse protéique plasmatique est représentée par l'albumine sérique, et dans le même ordre d'idée, quelque 80 % des protéines totales sont seulement représentées par cinq polypeptides majeurs (albumine, α 1-antitrypsine, α 2-macroglobuline, transferrine et γ -globuline) [Ortiz *et al.*, 2011].

Pour identifier des biomarqueurs dans le sérum, toute donnée des protéines identifiées doivent être le reflet de l'organisme dans son ensemble et ne pas seulement contenir les protéines de système circulatoire attendu. Les protéines qui ont été identifiées proviennent d'un

large éventail de classes fonctionnelles. Plus de 22 protéines abondantes, ont été identifiés comme des protéines commun associés avec le sérum, les facteurs de coagulation les protéines du complément, de transport, cytokines, les facteurs de croissance, et les hormones. (Chan *et al.*, 2004).

Mais tout à fait remarquable, un nombre de protéines qu'on n'associe généralement pas avec le sérum, par exemple, intracellulaire et membranaire constituent 39,6% et 32,1% des protéines identifiées, respectivement. En effet, des protéines comme les facteurs de transcription, des protéines nucléaires, les récepteurs, et les canaux étaient identifié, ce qui corrobore la notion que le sérum possède un archive potentiellement physiopathologique ; les informations résultant du fait que les protéines cellulaires et les peptides peut être libéré dans la circulation sanguine au cours de la nécrose, l'apoptose, et l'hémolyse (Chan *et al.*, 2004)

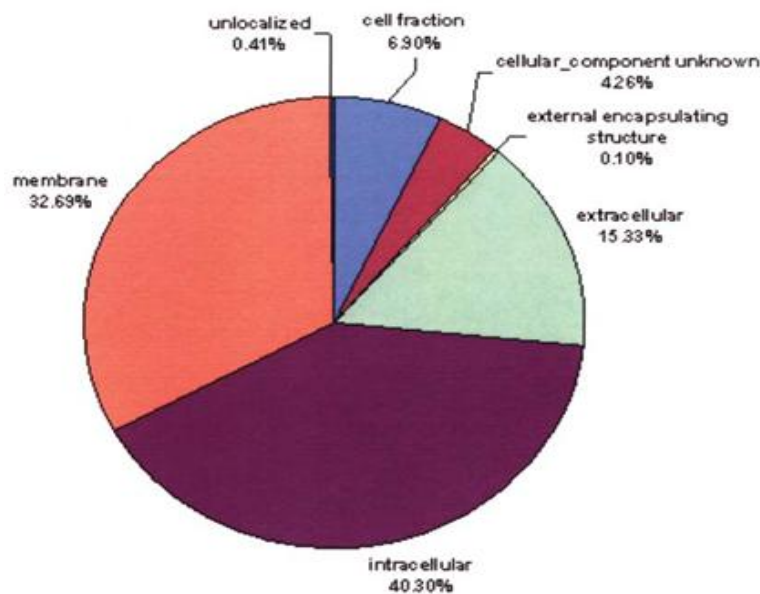


Figure 1.2 diagrammes circulaires illustrant la classification des protéines identifiées dans le sérum humain selon les trois principales organisations du consortium Gene Ontology

En 2005, Human Proteome Organisation (HUPO) Plasma Proteome Project (PPP) a généré sur une base de haute confiance un ensemble de 889 protéines sériques et plasmatiques (Greening et Simpson, 2011).

Tableau 1.5 liste des protéines identifiées dans le plasma d'après Cheung *et al.*, 2008

Protéine	Fonction biologique
A-1-anti-chymotrypsine	inhibiteur de la protéase
A-1-antitrypsine	inhibiteur de la protéase
A-1-microglobuline	inhibiteur de la protéase
A-2-macroglobuline	inhibiteur de la protéase
afamine	transporteur
L'albumine	transporteur
L'angiotensinogène	Régulateur de pression artérielle
L'apolipoprotéine A1	Transporteur (cholestérol)
L'apolipoprotéine C2	Transporteur (VLDL)
apolipoprotéine D	Transporteur (bilin)
biotinidase	métabolisme de la biotine
N2 carboxypeptidase	Enzyme Subunit stabilisation
CD5L	peptide associé à IgM
La céruloplasmine	Transporteur (Cu)
Clusterin	inconnu
Complément C1s	l'immunité innée
Complément C3	l'immunité innée
Complément C4a / b	l'immunité innée
Fétuine-A	minéralisation
Ficoline-3	l'immunité innée
Glutathion peroxydase-3	Anti-oxydant enzymatique
L'haptoglobine (liées)	Scavenger hémoglobine
Hemopexin	Transporteur (hème)
Ig chaîne lourde V-I (UE)	L'immunité adaptative
Ig chaîne lourde V-III (TIL)	L'immunité adaptative
Ig chaîne lourde V-III (VH26)	L'immunité adaptative
Ig J	Protéines de liaison IgA / M
Ig a-1 de la chaîne C	L'immunité adaptative
Ig chaîne C j	L'immunité adaptative

Ig j chaîne V-II de sperme	L'immunité adaptative
Ig k chaîne C	L'immunité adaptative
Ig chaîne L C	L'immunité adaptative
Ig I protéine lourde maladie des chaînes	inconnu
Inter-a- inhibiteur de la trypsine H2	Transporteur (acide hyaluronique)
Inter-a-inhibiteur de la trypsine H4	phase aiguë
La lécithine: cholestérol acyl-transférase	estérification du cholestérol
Mac-2-binding protein	Cell Adhesion
Peroxyrédoxine-2	Anti-oxydant enzymatique
La transferrine	Transporteur (Fe)
Paraoxonase sérique / arylestérase 1	Anti-oxydant enzymatique
Vitamine D protéine de liaison	Transporteur (vitamine D)
Riche en leucine a-2-glycoprotéine	inconnu
Un-1B-glycoprotéine	inconnu

1.3.3 Recherche de biomarqueurs dans LNH

Le développement des analyses génomiques a permis l'amélioration des connaissances sur la physiopathologie de LNH, permettant d'identifier différents types de profils d'expression génique, chacun de ces profils pouvant être rattachés à un pronostic distinct. Cependant, ces approches ont fait appel à des explorations larges sur le tissu tumoral d'origine, qui n'est cependant pas toujours facilement disponible pour ces études exhaustives (Pangault *et al.*, 2007).

Il apparaît donc particulièrement intéressant d'évaluer l'impact de ces pathologies au niveau du sang qui est d'un accès plus facile. Toute modulation de l'équilibre physiologique peut générer une réponse entraînant une modification d'expression de certains gènes et protéines, dont l'expression dans le sang circulant reflétera la réponse de l'organisme face à l'agression et permettra d'identifier des signatures spécifiques d'une situation pathologique donnée et éventuellement de détecter de nouvelles cibles thérapeutiques (Pangault *et al.*, 2007).

Par contre, la LNH est un groupe hétérogène résultant de facteurs multiples, ce qui rend difficile d'utiliser un marqueur biologique unique pour son évaluation. La découverte d'un marqueur de LNH spécifique et très sensible est toujours un objectif principal pour la

recherche dans le diagnostic différentiel, la pathogenèse, la réponse au traitement suivi et l'évaluation pronostique de la LNH (Zhi Zhang *et al.*, 2009).

Chapitre 2. Matériels et méthodes

2.1 Caractéristiques de l'échantillon

Nous avons recruté vingt trois (23) patients, huit (8) femmes et quinze (15) hommes d'âge moyen de $48.26 \pm 0,92$ ans ainsi que vingt trois (23) sujets sains huit (8) femmes et quinze (15) hommes d'âge moyen de $38.04 \pm 0,14$ contrôlés (HIV HCV négatif) admis respectivement au service d'Hématologie clinique et au centre de transfusion sanguin du Centre Hospitalo-universitaire de Tlemcen .

Tableau 2.1 Caractéristiques des patients et des témoins.

Variable	Patients n = 23 x ± ES	Témoins n = 23 x ± ES
Age (an)	48,26± 0,92	38.04 ± 0,14
Sexe (F/M)	15/8	15/8
Groupe sanguin		
A	7	9
B	4	3
AB	0	1
O	12	10
Rhésus (P/N)	22/1	20/3
IMC (kg/m ²)	22,67±0,086	26,29±0,084
Tabagisme		
Fumeur	14	23
Non fumeur	9	0

Les données sont présentées sous forme de moyenne (X) ± erreur standard (ES). LNH : lymphome non-Hodgkinien. IMC: Indice de masse corporelle, M: masculin, F : féminin.

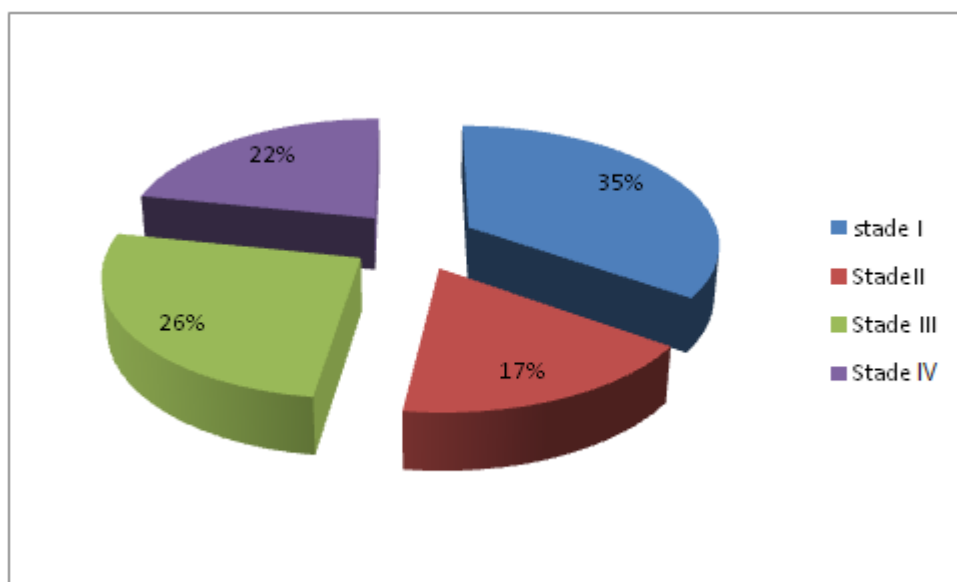


Figure 2.1 Répartition de LNH selon les stades (Ann Arbor).

Tableau 2.2 Caractéristiques du LNH chez les patients atteints

Patients (ordre)	Type de LMNH	Localisation	SAN	LDH
1	B bas grade de malignité	Médullaire et ganglionnaire	IV	655
2	Grande cellule B	ganglionnaire	III _B	480
3	Folliculaire de bas grade	Intestin grêle	I _E	277
4	Grande cellule B . haut grade malignité	ganglionnaire	I _B	365.90
5	B haute grade malignité	mandibulaire	I _A	333
6	Grande cellule B .haut grade malignité	ganglionnaire	II _{EB}	578
7	Lymphocytaire B	/	IV	332
8	B haute grade	Métastatique ganglionnaire	IV	640
9	Burkitt like médiastin	médiastin	I	192
10	Grande cellule B	osseuse	III	310
11	T	ganglionnaire	III _A	346
12	digestif	L'estomac	I	417
13	Grande cellule B .haut grade malignité	Ganglionnaire	I	538
14	B folliculaire	Ganglionnaire	III _A	269
15	Grande cellule B	Pancréatique splénique	I _{BE}	326
16	B intestinale	Intestin	III _E	228.1
17	Haut grade	gastrique	II	338.4
18	T	Ganglionnaire	II _B	353

19	T agressif	Ganglionnaire	I _A	285.2
20	Grande cellule B	Médullaire hépatique pleural	IV _B	254
21	B à petit cellule	Ganglionnaire médullaire	IV	588
22	B à petit cellule	Gastrique	II	437
23	Haut grade type	Médiastin	III _A	673.8

2.2 Matériel biologique

Les échantillons du sang veineux ont été prélevé dans des tubes secs à partir des patients atteints de LNH admis au service d'hématologie et des donateurs au centre de transfusion sanguine du CHU Tlemcen sont soumis à une centrifugation pendant 20 min à 3000 rotations par minutes (rpm). Les sérums sont récupérés, aliquotés et conservés à - 20 °C.

2.3 Méthode d'étude

2.3.1 Electrophorèse

L'électrophorèse un procédé biochimique qui permet le fractionnement des molécules biologiques (protéines, acides nucléiques) par le passage du courant électrique sur support poreux en fonction de leur charge nette ou de leur poids moléculaire.

La vitesse de migration dépend non seulement de la charge des protéines, de leur taille et de leur forme mais aussi des conditions expérimentales de tels que le pH, la composition des solutions et le support électrophorétique.

2.3.2 SDS-PAGE

L'électrophorèse dodécylsulfate de sodium sur gel de polyacrylamide décrite par Laemmli (1970) est utilisée en raison de sa haute résolution dans la séparation des protéines. (Wu et Koiwa, 2011). Le procédé SDS-PAGE comprend la dénaturation des protéines avec un détergent, le dodécylsulfate de sodium SDS, et l'utilisation d'un courant électrique qui passe à travers un gel de polyacrylamide, ce processus est appelé électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE). SDS se lie fortement aux protéines, avec environ une molécule de détergent qui se lie à deux acides aminés. Lors du chauffage avec du SDS, les protéines acquièrent une charge négative en proportion à leur tailles moléculaires, et donc ils vent ce déplacer dans le gel de polyacrylamide selon leur tailles moléculaires. Plus la taille de la protéine est petite, plus vite elle se déplace à travers les pores du gel. Ainsi, les protéines se

retrouvent sous forme de bandes, avec les protéines de haut poids moléculaire sur le haut du gel et les protéines de bas poids moléculaire en bas du gel (Ortiz *et al.*, 2011)

2.3.3 Extraction des protéines sériques

Elle a été réalisée à partir des sérum des patients atteints de LNH et des contrôles en ajoutant 100µl de la solution d'extraction composée de SDS à 10% et d'un réducteur le Dithiothréitol (DTT) à 1%. Le contenu de chaque tube est vortexé puis placé au bain marie à 60°C pendant 30min.

2.3.4 Préparation des gels

Avant de préparer les gels, les deux plaques de verre sont nettoyées à l'éthanol et montées en les plaçant l'une contre l'autre et en les séparant avec deux espaceurs. Une pince serre les deux plaques empêchant la fuite du gel.

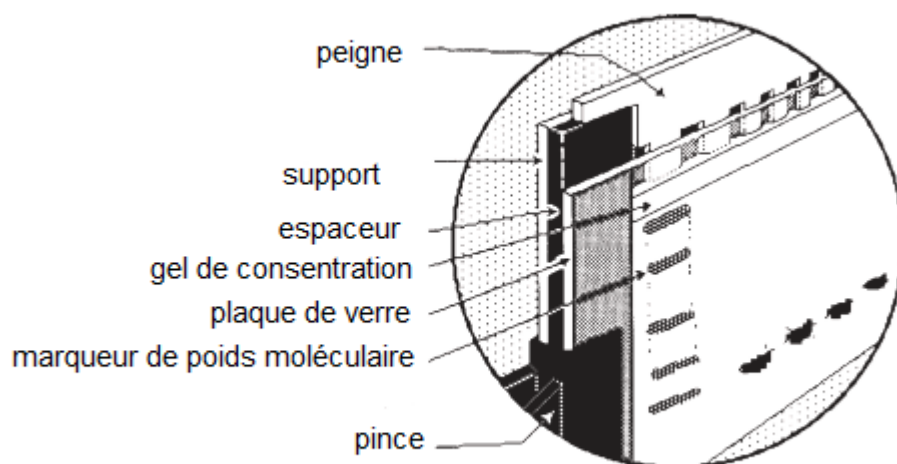


Figure 2.2 Cassette pour le gel de polyacrylamide

Dans la méthode de séparation par SDS-PAGE deux types de gels sont préparés : Un gel de séparation permettant le fractionnement des différentes protéines et des sous-unités protéiques selon leurs poids moléculaires et un gel de concentration qui retient les impuretés et tasse les protéines.

2.3.4.1 Gel de séparation (running gel)

Les dimensions du gel sont 110x90x1.5 mm, sa concentration est de 10%. Il est constitué de polyacrylamide à 30% (p/v), de Tris HC à pH=8.8 1M, de SDS à 10% (p/v) et d'eau distillée. La réaction de polymérisation est catalysée par l'ammonium persulfate (APS) à 10% (p/v) et le TEMED. Une fois tous les constituants mélangés les catalyseurs sont ajoutés en dernier lieu.

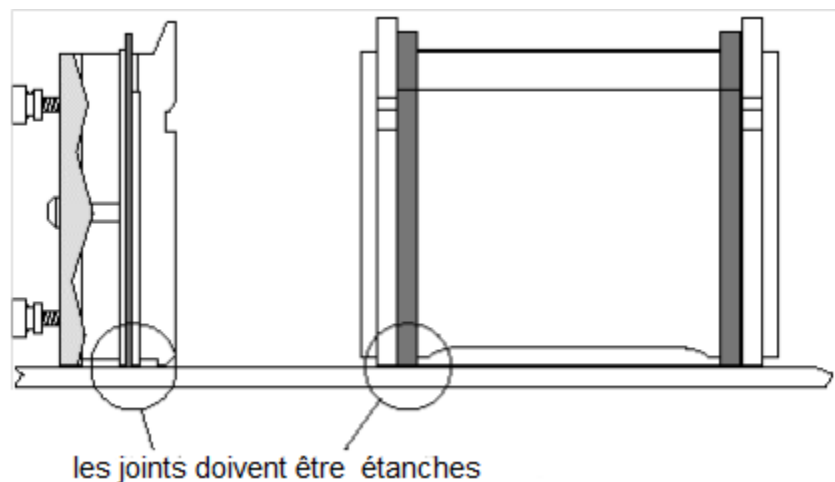


Figure 2.3 Vue de face et de profil de la cassette

Le gel est coulé entre les deux plaques (montées auparavant) doucement pour ne pas faire de bulles jusqu'à un niveau délimité sur la plaque pour laisser la place au gel de concentration (à 4 cm de l'encoche). Ensuite, une fine couche de butanol est coulée pour égaliser la surface du gel et pour éviter son contact avec l'air. Au bout de 30 à 45 minutes le gel prend, le butanol est jeté et le bord du gel est rincé à l'eau distillée.

2.3.4.2 Gel de concentration (stacking gel)

Les dimensions du gel sont 70x40x1.5 mm, ça concentration est de 4%. Il est constitué des mêmes composants que le gel de séparation avec une seule différence au niveau du Tris HCL qui a un pH de 6,8.

2.3.4.3 Tampon d'électrophorèse

Le tampon de migration est constitué de glycine à 1.41% (p/v), de Tris à 0.3% (p/v) et de SDS à 0.1% (p/v).

2.3.4.4 Marqueurs protéiques du poids moléculaire

Les marqueurs protéiques du poids moléculaire sont habituellement un mélange de protéines natives dont tailles et mobilités sont bien caractérisés, constituant une échelle de protéines, ils sont utilisés pour évaluer la taille moléculaire relative des protéines qui ont été séparés par électrophorèse.

En règle générale, les marqueurs de poids moléculaire sont coulés dans les couloirs extérieurs d'un gel pour la comparaison avec des échantillons de test coulés dans les voies du milieu.

Une courbe standard peut être construite à partir des distances migrées par chaque protéine marqueur. Puis les distances migré par les protéines des échantillons sont tracées et leur poids moléculaire exprimées en (kDa) peu êtres calculée par interpolation.

2.3.4.5 Migration

Après le dépôt des différents échantillons et du mélange des marqueurs de poids moléculaire; le bac inférieur de la cuve d'électrophorèse est rempli à un niveau suffisant avec le tampon d'électrophorèse.

Ensuite, le bac supérieur situé entre les deux plaques (bien serré contre les joints pour éviter les fuites) est rempli lui aussi avec le même tampon jusqu'à ce que les faces supérieures des gels soient immergées. Enfin, la cuve est fermée et est reliée à un générateur qui va assurer le passage du courant électrique. La migration est menée à une intensité constante de 40mA/gel à 120V.

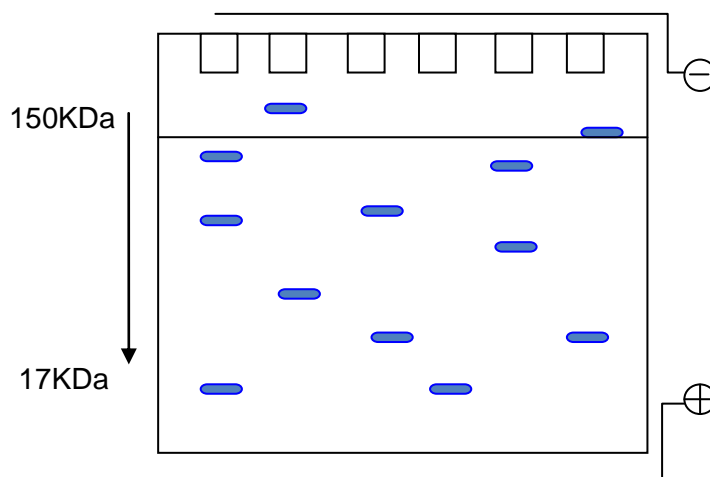


Figure 2.4 Migration des protéines selon leurs poids moléculaire

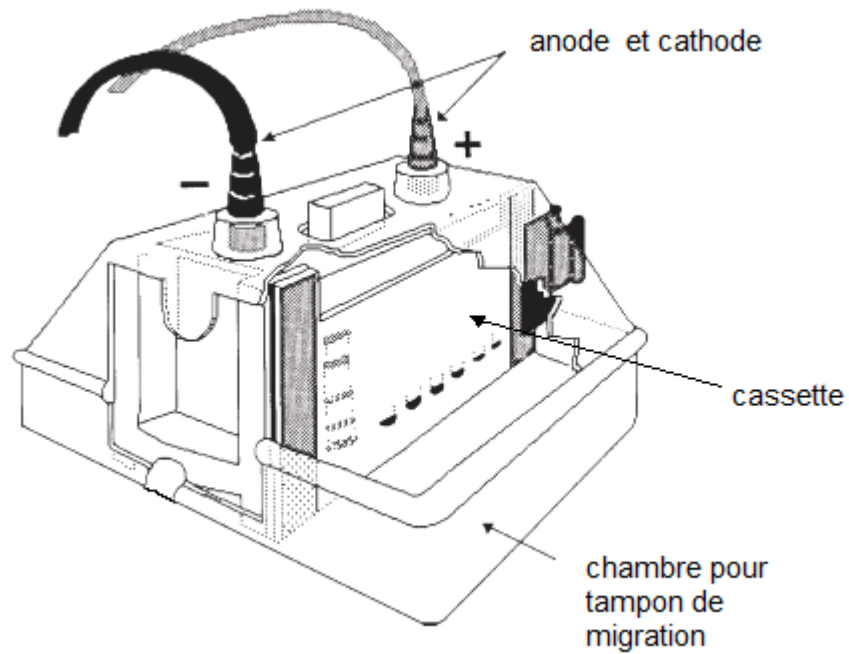


Figure 2.5 Cuve d'électrophorèse verticale



Figure 2.6 Cuve d'électrophorèse verticale et le générateur de courant. Photo prise au laboratoire BIOMOLIM la cuve a été fabriqué par HADDJERI. A

2.3.4.6 Coloration et fixation

Après la sortie du front de migration, la migration est arrêtée. Les gels sont démoulés et récupérés dans des bacs en plastique puis recouverts avec une solution de coloration constituée d'un fixateur des protéines, le acide ascitique à 60% et d'un colorant, le bleu de Coomassie R250. Les gels doivent être maintenus en agitation pendant 24 heures pour éviter le dépôt du colorant. Après ils sont décolorés dans de l'eau.

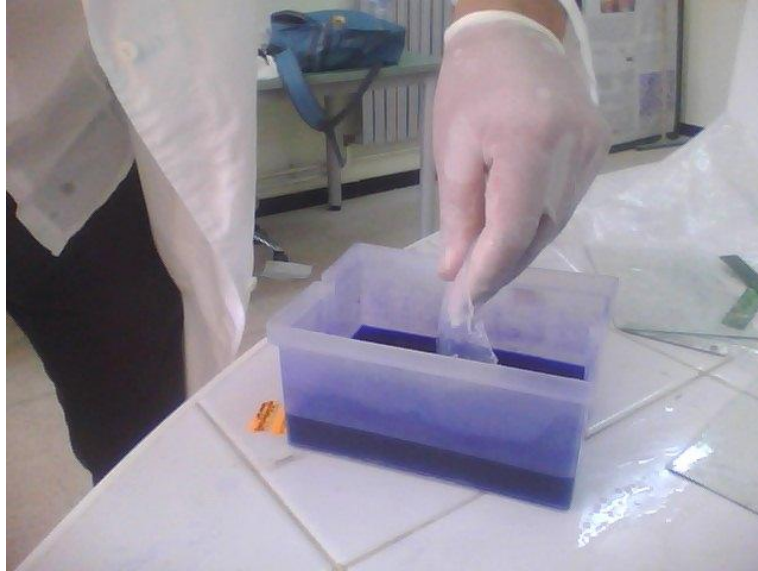


Figure 2.7 Coloration du gel avec le bleu de Coomassie R250



Figure 2.8 Le gel après coloration

Chapitre 3. Résultats et interprétations

Après la décoloration du gel les bandes de migration apparaissent et d'après les figures 3.1 et 3.2 on peut facilement constater une différence dans la séparation des protéines entre les patient et les témoins et une différence entre les bandes protéiques entre les patient eux même mais nous pouvons nettement remarquer 3 bandes de faibles poids moléculaire qui existent dans les profils électroforetique de tout les patients atteints de l'LNH ces bandes sont situé entre les poids moléculaires 64K Da et 25KDa.



Figure 3.1 électrophorégramme avec un témoin et deux patients

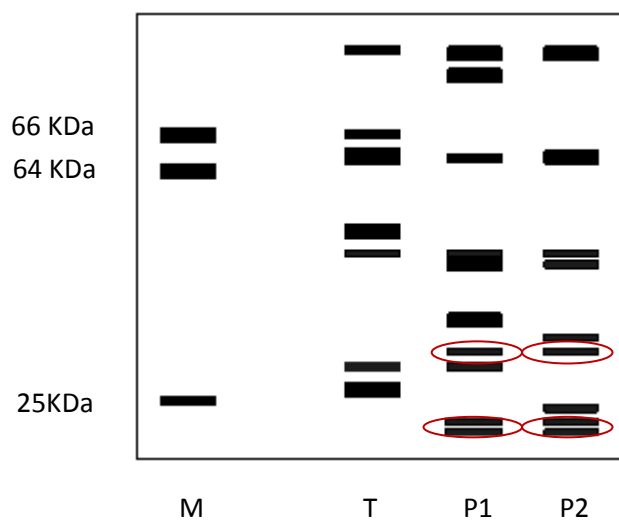


Figure 3.2 profils électroforetique des patients. M: marqueurs de tailles, T: témoin
p1 :patient1, p2:patient 2

La déduction des poids moléculaires des 3 bandes a été faite à partir d'une droite tracée exprimant la distance parcourue par les bandes en fonction du poids moléculaire des marqueurs de taille, et a donné les poids moléculaires d'environ 23.6, 23.80 et 26.2 KDa.

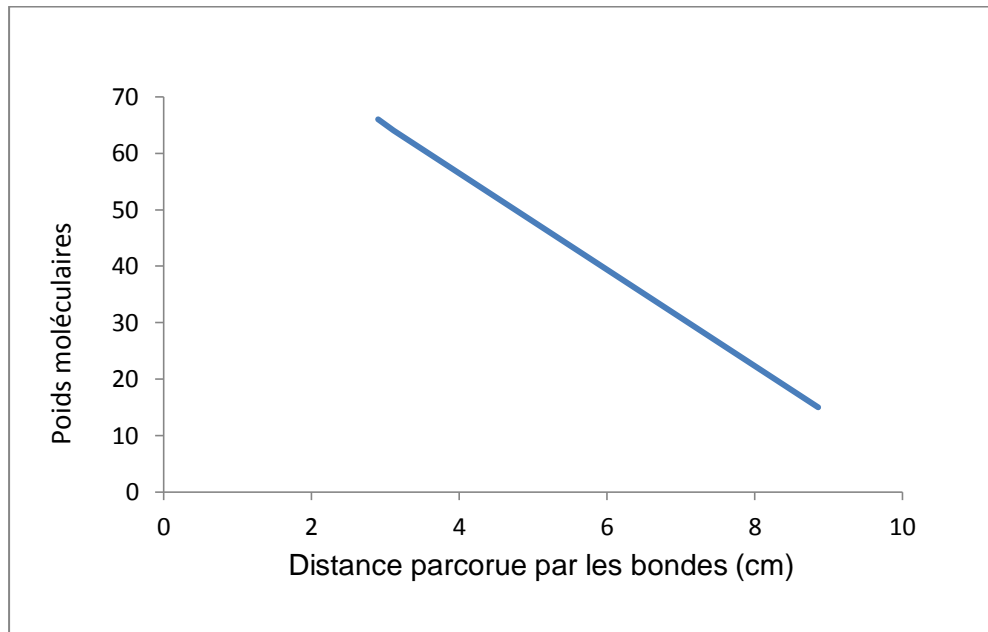


Figure 3.3 la distance parcourue par les bandes protéiques en fonction du poids moléculaires.

Chapitre 4. Discussion

Les lymphomes malins non-hodgkiniens sont des proliférations clonales de cellules lymphoïdes B ou T et rarement NK bloquées à un stade de différenciation donné, différent pour chaque type de lymphome, à point de départ ganglionnaire ou extraganglionnaire (Druet-Cabanac *et al.*, 2005).

Ce travail consiste à une étude à la recherche de protéines candidats susceptibles d'être des biomarqueurs sanguins du lymphome non-Hodgkinien.

Le but est de détecter les protéines communes chez les patients atteints du LNH et différenciellement exprimées chez les contrôles.

La découverte d'un marqueur de LNH spécifique et très sensible est toujours un objectif principal pour la recherche dans le diagnostic différentiel, la pathogenèse, la réponse au traitement suivi et l'évaluation pronostique de la LNH (Zhi Zhang *et al.*, 2009).

D'après la figure 3.2 et la figure 3.3 trois bandes protéique de faible poids moléculaires 23.6, 23.80 et 26.2 KDa existent chez tous les patients et sont absent chez les contrôles, ces résultats peuvent suggérer l'existence des protéines exprimées d'une façon aberrante chez les patients atteints à cause de la transformation maligne, sa progression ou encore en réaction aux traitements chimiotherapetiques (Pangault *et al.*, 2007).

La nature de ces protéines et leurs modes d'expression reste difficile à définir et nécessite l'appel à d'autre technique de l'analyse protéomique comme l'électrophorèse bidimensionnelle, la spectrométrie de masse, la chromatographie en phase liquide et les puces à protéines (Wen *et al.*, 2012).

Chapitre 5. Conclusion et perspectives

La recherche des marqueurs protéiques tumoraux possédant une spécificité et une sensibilité suffisantes pour avoir des retombées pratiques, notamment dans le diagnostique, le pronostique et le traitement des cancers reste d'un intérêt majeur grâce aux différentes approches protéomiques développées récemment plusieurs marqueurs protéiques ont été caractérisés laissant ainsi entrevoir de nouvelles stratégies de dépistage et de traitement.

A l'issu de ce travail, portant sur la recherche des protéines candidats susceptibles d'être des biomarqueurs du LNH nous avons pu détecter trois protéines de faible poids moléculaire qui caractérisent les profils electrophoretique des patients.

Il est donc probable que les protéines sont exprimées d'une manière irrationnelle suite à la transformation maligne, la progression de la tumeur ou/et le traitement chimioterapetique.

Pour confirmer que ces protéines sont bien des biomarqueurs de cette maladie il est nécessaire de faire une étude de cohorte et passer a l'étape suivante de l'analyse protéomique en utilisant l'électrophorèse bidimensionnelle et la spectrophotométrie de masse ou la combinaison entre SDS-PAGE et la chromatographie en phase liquide.

Chapitre 6. Bibliographie

A

Amégbor K, Darré T, Padaro E, Pegbessou E.P, Bagny A, Napo-Koura G. Profil histoépidémiologique des lymphomes au Togo : à propos de 755 cas observés au CHU Tokoin de Lomé. J. Afr. Cancer. 2010; 2 : 235-239.

Andersones N. L, The Clinical Plasma Proteome:A Survey of Clinical Assays for Proteins in Plasma and Serum. Clinical Chemistry 2010; 56:177-185.

B

Baudin B. Protéomique et spectrométrie de masse. REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - DÉCEMBRE 2011 - N°437.31-40.

Biosa et al : Comparison of blood serum peptide enrichment methods by Tricine SDS-PAGE and mass spectrometry JOURNAL OF PROTEOMICS.2011;75:93– 99.

Bosly .A, Delos.M, Michaux.L Lymphomes diffus à grandes cellules B .EMC Hématologie. 2007 ; 13-016-A-60.

Bouayed et Mesli 2012. Approche épidémiologique des lymphomes malins non hodgkiniens ganglionnaires de l'adulte. Congrès SFH 2012 21, 22 et 23 mars 2012 -PARIS.Valable par : <http://soumission.sfh.cyim.com/data/ModuleMiseEnLigne/Generation/Html/Web/evenements/6/programmes/14/resumes/1853.html>.

C

Campo E, Swerdlow S.H, Harris N.L, Pileri S, Stein H, Jaffe E .S. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications.blood Apr 2011 ; 117:5019-5032.

Centrifugal Ultrafiltration Methods in Molecular Biology 2011;728: DOI 10.1007/978-1-61779-068-3-6.

Chan K C, Lucas D. A, Hise D, Schaefer C. F,Xiao Z, Janini G. Buetow M, Kenneth H, Issaq H.J, Veenstra T.D,Conrads T.P. Clinical Proteomics. 2004;1:101-225.

Chan K. Analysis of the Human Serum Proteome Clinical Proteomics Journal. 2004, 01:101–225

Chassabne-Clément C, Philip T. Epidémiologie des lymphomes malins non hodgkiniens : données actualisées. Rev Méd Interne .1998 ;1 :9-11.

Cheung.K.J et al: The HCV serum proteome: a search for fibrosis protein markers Journal of Viral Hepatitis. 2009; 16: 418–429.

D

Diebold J , Molina T , Agnès Le Tourneau , Josée Audouin. Hémopathies malignes : définition et différentes variétés selon la classification de l'OMS 2001. REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES EMC JANVIER 2008 ; 398.

Drouet D, Cahu X, Pointreau Y, Denis, Mahé A. Lymphomes malins non hodgkiniens. Cancer Radiothérapie. 2010 ;14 :210-229.

Druet-Cabanac M, Moalic-Juge S, Fritsch F, Dumont D, Bordessoule D. Etude de l'exposition professionnelle et environnementale dans la survenue de lymphome malin non hodgkinien. Arch Mal Prof Env. 2005;32:523-531.

Dupuis.J et Haioun.C .Lymphomes non hodgkiniens du sujet âgé : lymphome à grandes cellules B et lymphome folliculaire . Bull Cancer 2008 ; 95 F79-83.

E

Edelman A. Physiopathologie à l'ère de la protéomique contemporaine. septembre 2005 ; 2:8-9.

F

Falgarone et Boissier. Du génome au protéome • stratégies pour comprendre la complexité de la polyarthrite rhumatoïde. Revue du Rhumatisme. 2004 ; 71 : 22-27.

Fermé C, Roman O. Lymphome de Hodgkin de l'adulte. Hémtologie. 2011 ;05 :13-16.

G

Greening et Simpson. Low-Molecular Weight Plasma Proteome Analysis Using. *Methods in Molecular Biology*. 2011.728;109-124.

Garin J, FERRO M, ROLLAND N, JOYARD J. Stratégies en protéomique : outils, limites et développement. *Ecole thématique Biologie végétale*.2001.

H

Hamrita B, Nasr H.B, Kabbage M, Hamann P, Kuhn L, Guillier C, Remadi S, Chaieb A, H. Khairi , Chouchane L, Chahed K. L'apport thérapeutique des approches protéomiques dans les cancers. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* .2011 ; 39 :87–93.

Hanash.S. Disease proteomics *Nature*. 2003; 422: 226-232.

J

Jo Molina, Le Tourneau A, Damotte D, Diebold J, Audouin J . Pathologie moléculaire des lymphomes diffus à grandes cellules B : intérêt diagnostique et pronostique pour l'histopathologiste. *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES*.2011 ;428 :57-64 .

K

Kolch W, auteur et al .the molecular make-up of a tumour:proteomics in cancer research. *Clinical Science* 2005; 108:369–383.

Kim et al. Online monitoring of immunoaffinity-based depletion of high-abundance blood proteins by UV spectrophotometry using enhanced green fluorescence protein and FITC-labeled human serum albumin. *Proteome Science* 2010; 8:62-78.

L

LEAK A, MAYER D, SMITH S. Quality of life domains among non-Hodgkin lymphoma survivors: an integrative literature review. *Leuk Lymphoma*. June 2011 ; 52: 972–985.

Leigh Andersones.N : The Clinical Plasma Proteome:A Survey of Clinical Assays for proteins in Plasma and Serum. *Clinical Chemistry* 2010; 56:2177–185.

Lister.R et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences.Nature. 2009 ; 462: 315–322.

M

Malliavin T, Dardel F. Structure des protéines par RMN. Techniques de l'Ingénieur. Avril 2012 ; Doc. AF 6 608.

Mendoza J.L et Abreu. M.T. Biological markers in inflammatory bowel disease: Practical consideration for clinicians, Gastroentérologie. Clinique et Biologique 2009; 33.158-173.

N

Nacer M R, Hamladji R M, Belhani M, Ardjoun F.Z, Abad M.T, Touhami H, Ait Ali H, Zouaoui Z, Bekadja M.A, Boudjerra N, Sidi Mansour N. Revue Algérienne d'hématologie. mars 2009.

O

Ortiz.A, Tokarski.C, Rolando.C: Analyse des protéines ou protéomique. Techniques de l'Ingénieur. 2011.

P

Porquet.D Protéome et transcriptome Transfusion Clinique et Biologique 2003 ; 10 :214–216.

Pinet .F et auteur al Protéomique et marqueurs cardiaques Médecine Nucléaire. 2007 ; 31 : 580–586.

Pangault et al Les enjeux du préanalytique dans l'analyse du transcriptome et du protéome

Sanguins. MEDECINE/SCIENCES. 2007 ; 23: 13-7.

R

Ratcliffe L, Mian S, Slater K , King H, Napolitano M, Aucoin D, Mobasheri A. Proteomic identification and profiling of canine lymphoma patients. Veterinary and ComparativeOncology. 2009; 7:92–105.

S

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC : Lyon 2008.

T

Trocmé.C. La protéomique : comment cela fonctionne-t-il ?. Revue du Rhumatisme 2011;78 173-177.

V

Vitzthum F. Proteomics: From Basic Research to Diagnostic Application.A Review of Requirements & Needs. Journal of Proteome Research. 2005; 4:1086-1097.

W

Wen J-J, Zago M.P, Nuñez S, Gupta S, Burgos F. N, Jain Garg N. Serum Proteomic Signature of Human Chagasic Patients for the Identification of Novel Protein Biomarkers of Disease. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. April ,2012; 1-49.

Wu Xiaoqiang, Koiwa Hisashi. One-step casting of Laemmli discontinued sodium dodecyl

Sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis gel Analytical Biochemistry 2012; 421: 347-349.

Z

Zhi Zhang. MAnalysis of serum proteome profiles of non-Hodgkin lymphoma for biomarker identification Journal of Proteomisc. 2009; 72: 952 – 959.

ETUDE PROTEOMIQUE CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE LYMPHOME NON-HODGKINIEN

PROTEOMICS STUDY IN PATIENTS WITH NON-HODGKIN LYMPHOMA

Abdelkrim HADDJERI. MASTER II. ALIMENTATION ET NUTRITION

Résumé	
Introduction	Les lymphomes malins non-Hodgkiniens sont des hémopathies malignes qui se développent à partir des cellules lymphoïdes. La protéomique offre la possibilité d'étudier l'expression différentielle des protéines dans l'état physiologique et pathogène, dans les tissus et les liquides biologiques afin de rechercher les marqueurs de la maladie.
Objectifs	Ce travail consiste à rechercher de protéines candidats susceptibles d'être des biomarqueurs sanguins du lymphome non-Hodgkinien.
But	Le but est de détecter les protéines communes chez les patients atteints du LNH et différenciellement exprimées chez les contrôles.
Matériels et méthodes	Les sérums de vingt trois (23) patients atteints LNH (huit femmes et quinze hommes âge moyen $48,26 \pm 0,92$ ans) ainsi que vingt trois sujets sains (huit femmes et quinze hommes d'âge moyen de $38,04 \pm 0,14$ admis respectivement au service d'Hématologie et au centre de transfusion sanguin du Centre Hospitalo-universitaire de Tlemcen ont servi à l'étude protéomique par la technique SDS-PAGE.
Résultats	Il existe une différence dans la séparation des protéines entre les patient et les témoins et 3 bandes protéiques sont détectées chez les patient atteint du lymphome non-Hodgkinien
Conclusion	A l'issu de ce travail, portant sur la recherche des protéines candidats susceptibles d'être des biomarqueurs du LNH nous avons pu détecter trois protéine de faible poids moléculaire qui caractérisent les profils électrophoretique des patients.
Mots clés	Lymphome Non-Hodgkinien, protéomique, biomarqueur, protéine, profils électrophoretique.
Abstract	
Introduction	Malignant non-Hodgkin's lymphomas are malignancies that develop from lymphoid cells. Proteomics offers the possibility to study differential protein expression in the state and physiologic pathogen in tissues and body fluids to look for markers of the disease.
Objective:	
Aim	The purpose is to detect proteins common in patients with NHL and differentially expressed in controls.
Materials and Methods:	Sera from twenty three (23) NHL patients (eight women and five men mean age 48.26 ± 0.92 years) and twenty-three healthy subjects (eight women and fifteen men with mean age of 38.04 ± 0.14 respectively admitted to the service of Hematology and blood transfusion Centre of the University Hospital of Tlemcen have served in the proteomic study by SDS-PAGE.
Results	There is a difference in the separation of proteins between patients and controls however 3 plugs protein are detected in the patient with Non-hodgkin lymphoma.
Conclusion	At the end of this work, research on proteins likely to be candidate biomarkers of NHL we could detect three low molecular weight protein that characterize the electrophoretic profiles of patients.
KEY WORDS	Non-Hodgkin lymphoma, proteomics, biomarker, protein, electrophoretic profiles.
ملخص	
مقدمة	المفاويات اللاهودجكينية هي الأورام الخبيثة تتطور من الخلايا للمفاوية. البروتيوميكيات تمكن من دراسة التعبير التفاضلي للبروتينات في الحالات الفيزيولوجية العادية والحالات المرضية في الأنسجة والسوائل البيولوجية.
الهدف	هذا العمل هو للبحث عن بروتين مرشح ليكون من المؤشرات الحيوية في الدم عند المصابين بالأورام للمفاوية اللاهودجكينية والهدف من ذلك هو الكشف عن البروتينات المشتركة عند المرضى والأصحاء
المواد وطرق الدراسة	أمصال ثلاثة و عشرون (23) من مرضى الأورام للمفاوية اللاهودجكينية (ثمانى نساء وخمسة عشر رجلا مع متوسط العمر $48.26 \pm 0,14$ عاما) و 23 الأصحاء (ثمانى نساء وخمسة رجال مع متوسط العمر $38.04 \pm 0,92$) من مصلحة أمراض الدم و مركز نقل الدم على التوالي في المستشفى الجامعي بتلمسان في الدراسة البروتين بواسطة SDS-PAGE
النتائج	هناك اختلاف في فصل البروتينات بين المرضى وضوابط و ثلاث مراكز بروتينية ظهرت عند المصابين بالأورام للمفاوية اللاهودجكينية.
الخلاصة	في نهاية هذا العمل، والبحث على البروتينات التي من المحتمل ان تكون من المؤشرات الحيوية عند المصابين بالأورام للمفاوية اللاهودجكينية لقد لاحظنا ثلاث بروتينات ذات وزن مولى صغير.
الكلمات المفتاحية	الأورام للمفاوية اللاهودجكينية. البروتيوميكيات، العلامات البيولوجية، والبروتين

