

## Liste des abréviations

---

ACN	Acétonitrile
AcOH	Acide acétique
ATP	Adénosine triphosphate
BCA	Acide abcinchoninique
BSA	Bovine serum albumin
Da	Dalton
DARTS	Drug Affinity Responsive Target Stability
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
ESI	Electrospray ionisation
FA	Acide formique
FDR	False discovery rate
FT	Flow-through
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IAA	Acide indole 3-acétique
IL-3	Interleukin 3
IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography
IQR	Interquartile range
LC	Chromatographie en phase liquide
m/z	Masse/charge
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization
MS	Spectromètre de masse
MS/MS	Spectromètre de masse en tandem
pH	Potentiel d'hydrogène
PP2A	Protéine phosphatase 2A
Rpm	Tour par minutes
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SCX	Strong Cation-Exchange
SILAC	Stable Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture
TFA	Acide trifluoroacétique
UV	Ultra-violet
WASH	Wiskott-Aldrich syndrome protein and scar homolog

# Table des matières

---

Remerciements .....	ii
Liste des abréviations .....	iii
1. Introduction.....	1
1.1 Phosphorylation .....	1
1.1.1 Protéine phosphatase 2A .....	2
1.1.2 C2-Ceramide et SH-BC-893.....	3
1.2 Stratégie .....	5
1.2.1 SILAC.....	6
1.2.2 Enrichissement en phosphopeptides .....	7
1.2.3 Séparation par échange d'ions.....	8
1.3 Spectrométrie de masse.....	9
1.3.1 Nano LC-MS.....	10
2. Matériels et Méthodes.....	12
2.1 Matériels.....	12
2.1.1 Equipement .....	12
2.1.2 Produits chimiques.....	12
2.1.3 Colonnes.....	13
2.1.4 Molécules biologiques.....	13
2.1.5 Culture cellulaire .....	13
2.2 Méthodes .....	14
2.2.1 Culture cellulaire .....	14
2.2.1.1 Culture cellulaire .....	14
2.2.1.2 Passage des cellules.....	14
2.2.1.3 Traitement des cellules .....	14
2.2.1.4 Collecte de cellules.....	14
2.2.2 Extraction et purification des protéines.....	15
2.2.2.1 Lyse des cellules et extraction des protéines.....	15
2.2.2.2 Digestion enzymatique.....	15
2.2.2.3 Purification et concentration .....	15
2.2.2.4 BCA Assay .....	15
2.2.2.5 Enrichissement des phosphopeptides.....	16
2.3 Méthodes analytiques.....	17
2.3.1 Chromatographie d'échange d'ion.....	17

2.3.2	Chromatographie liquide.....	18
2.3.2.1	Préparation d'échantillon.....	18
2.3.2.2	Colonne.....	18
2.3.2.3	Système de séparation LC .....	18
2.3.3	Spectrométrie de masse.....	19
2.3.3.1	Solution test: Promix .....	19
2.3.4	Software .....	20
3.	Résultats et Discussion .....	21
3.1	Système de contrôle.....	21
3.2	Statistiques .....	23
3.3	Cinétique .....	28
3.4	Sites de phosphorylation dynamiques .....	29
3.5	SH-BC-893 vs C2-ceramide .....	31
4.	Perspectives.....	36
5.	Conclusion .....	37
6.	Bibliographies .....	38
7.	Annexes .....	41
7.1	Protocole BCA assay .....	41
7.2	Colonne capillaire .....	43
7.3	Promix.....	44
7.4	Résultats du BCA assay.....	45

# 1. Introduction

---

Le cancer est la principale cause de mortalité au Canada. En effet, il est responsable d'environ 30 % de tous les décès [1]. En Suisse, 38'000 nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués annuellement [2]. Depuis quelques décennies, la recherche scientifique a permis la découverte de traitements qui ont grandement augmenté le taux de survie à certains types de cancers. Malgré cette avancée, la médecine ne dispose pas encore de solutions face à la plupart des cas.

Limiter l'accès à des substances métaboliques pourrait être un moyen efficace et sélectif pour bloquer la croissance du cancer. Les études récentes accréditent l'hypothèse que la limitation de substrat est une stratégie thérapeutique puissante pour efficacement affamer les cellules cancéreuses jusqu'à la mort [3]. Développer des thérapies nouvelles et sélectives qui exploitent les différences de métabolisme entre les cellules normales et transformées est un objectif prioritaire. En effet, de nombreux inhibiteurs d'enzymes anaboliques essentiels dans les cellules cancéreuses ont été évalués comme antinéoplasiques. Une stratégie à l'inhibition de l'enzyme anabolique est de limiter l'accès aux nutriments qui alimentent ces enzymes. Bloquer l'entrée des éléments nutritifs, essentiels pour les cellules cancéreuses, ciblerait la pyramide métabolique à son sommet. Les sphingolipides offrent une stratégie intéressante pour coordonner la régulation de plusieurs transporteurs de nutriments. Ces lipides réduisent le niveau de surface de certains transporteurs de nutriments. Chez les cellules mammifères, le sphingolipide céramide permet de tuer sélectivement les cellules cancéreuses en déclenchant le mécanisme d'affamation. La céramide induit la perte de nutriments en activant directement la protéine phosphatase 2A (PP2A). PP2A est un gène suppresseur de tumeur qui limite la prolifération des cellules cancéreuses [3]. La céramide elle-même est extrêmement hydrophobe et est métabolisée rapidement dans les cellules ce qui en fait un mauvais candidat comme médicament.

Le but de ce projet est donc d'étudier deux agonistes de PP2A, soit la C2-céramide et la SH-BC-893. Le premier objectif est de comparer les changements de phosphorylation de protéines dans des cellules de mammifères après traitement avec la C2-céramide et la SH-BC-893. Un autre objectif est d'identifier les cibles protéiques qui répondent de façon plus sélective aux différents traitements.

## 1.1 Phosphorylation

La phosphorylation est l'une des formes les plus communes de modification de protéine. Il s'agit d'une modification réversible jouant un rôle important dans les cascades de signalisation intracellulaire [4]. L'analyse des protéines phosphorylées représente un intérêt majeur dans le domaine de la recherche. En effet, des études ont montrés que des maladies tels que le cancer, le diabète ou encore les maladies neurodégénératives peuvent être associées à une phosphorylation anormale des cellules touchées [4]. Bien que la phosphorylation soit une modification post-traductionnel qui régule la fonction des protéines, elle se produit seulement sur un résidu de trois acides aminés : la sérine, la thréonine et la tyrosine dans les cellules eucaryotes. Il est estimé qu'environ 30 à 50 % du protéome est phosphorylé [5]. La phosphorylation est réversible et étroitement régulée par des centaines de protéines kinases et phosphatases qui reconnaissent des motifs spécifiques d'acides aminés sur les protéines. La figure 1 représente la réaction de phosphorylation sur l'acide aminé sérine. Les enzymes assurant ces réactions de phosphorylation sont des kinases.

Plus précisément, leur tâche est de transférer le groupement phosphate- $\gamma$  provenant de l'ATP au groupement hydroxyle des sérines, thréonines et tyrosines d'une protéine [6].

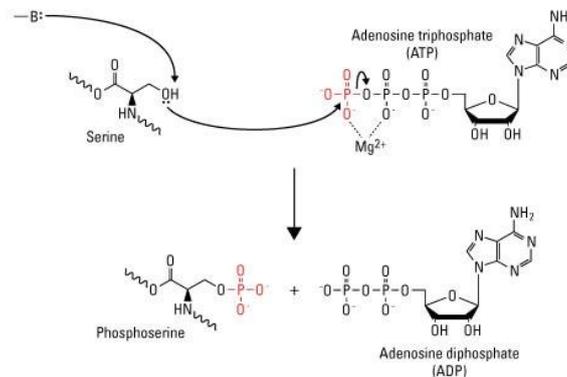


Figure 1 : Phosphorylation de l'acide aminé sérine [6].

Les phosphatases font, quant à elles, le travail inverse. En effet, elles hydrolysent la liaison ester phosphorique et libèrent un groupement phosphate [7]. La charge d'une protéine peut être modifiée par la phosphorylation, ceci conduit généralement à un changement de conformation. Ces effets peuvent modifier de façon significative la liaison protéine-ligand, provoquant alors une augmentation ou une diminution de l'activité de la protéine [8].

### 1.1.1 Protéine phosphatase 2A

La protéine phosphatase 2A (PP2A) est une enzyme qui déphosphorylise les sérines et les thréonines. La famille des phosphatases PP2A regroupe plusieurs holoenzymes qui jouent un rôle important dans plusieurs processus cellulaires fondamentaux dont le contrôle du cycle cellulaire et du cytosquelette, la régulation de la transcription ou encore le contrôle de la survie cellulaire et du processus de transformation tumorale [9]. PP2A est composée de trois sous-unités, A, B et C. Les sous-unités catalytiques C (PP2A<sub>C</sub>) de 36 kDa et structurales A (PP2A<sub>A</sub>) de 65 kDa sont liées de façon constitutive. Chez les mammifères, les deux isoformes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) sont codés pour chaque sous-unité (A $\alpha$ , A $\beta$ , C $\alpha$  et C $\beta$ ). La structure de PP2A est composée d'une sous-unité régulatrice B. En ce qui concerne cette dernière, quatre différentes familles, avec un poids moléculaire allant de 50 à 130 kDa ont été identifiées, PP2A<sub>B</sub>, PP2A<sub>B'</sub>, PP2A<sub>B''</sub> et PP2A<sub>B<sub>3</sub></sub>. [10]. Avec toutes ces possibilités d'assemblage, plus de 75 holoenzymes distincts de PP2A peuvent être formés. La figure 2 représente l'enzyme PP2A et ses 3 sous-unités.

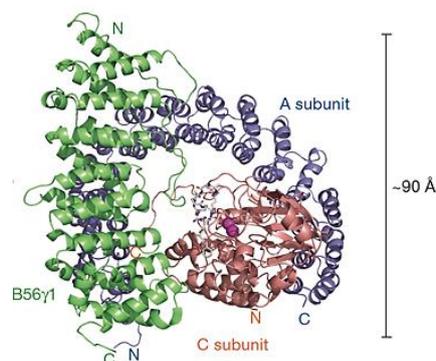


Figure 2 : Différents sous-unités composant l'enzyme PP2A [11].

Comme plusieurs cancers sont caractérisés par l'activation de protéines kinases, il n'est pas surprenant qu'une phosphatase comme PP2A ait été progressivement considérée comme un suppresseur potentiel de tumeur [12]. Cependant, étant donné la complexité de la régulation de PP2A et son implication dans une grande variété de mécanismes cellulaires, il est très difficile de définir clairement son rôle de suppresseur de tumeur.

### 1.1.2 C2-Ceramide et SH-BC-893

Les sphingolipides représentent un groupe majeur de lipides membranaires. Ce sont des molécules indispensables au maintien et au développement des organismes vivants. Les sphingolipides jouent un rôle structural de récepteur et interviennent également dans des fonctions majeures de la vie cellulaire. De plus, de nombreuses maladies génétiques s'expliquent par un dysfonctionnement de leur métabolisme [13]. Les sphingolipides sont des dérivés de la sphingosine, un alcool aminé qui contient une longue chaîne hydrocarbonée insaturée [14].

Des études montrent que les sphingolipides altèrent le transport des éléments nutritifs dans les cellules [15]. Ces dernières se retrouvent donc en manque de nutriments. Les cellules cancéreuses, qui ont une croissance incontrôlée, réagissent à ce phénomène en augmentant l'expression des transporteurs de nutriments ainsi qu'en régulant de manière positive les voies anaboliques. Bien que l'accélération de l'absorption des nutriments permet une prolifération non-homéostatique, la demande toujours plus grande de substrats métaboliques des cellules cancéreuses devient problématique lors de conditions de limitation en nutriments. Lorsque les nutriments extracellulaires se font rares, les cellules saines, quant à elles, arrivent à s'adapter. Elles développent une voie métabolique plus performante comme par exemple, la réduction de la glycolyse ou encore l'augmentation de la phosphorylation oxydative. Elles sont également capables de baisser leur besoin énergétique en ralentissant leur prolifération et même d'augmenter leur processus catabolique en produisant des nutriments à partir de composés intracellulaires [15]. En conclusion, les cellules cancéreuses meurent lorsque l'apport de nutriments est limité alors que les cellules saines vont arriver à s'adapter.

La recherche a permis de découvrir de petites molécules, dont la structure s'apparente à celle des sphingolipides, qui altèrent le transport des éléments nutritifs dans les cellules [15]. Ceci permet d'élaborer une nouvelle stratégie efficace pour éliminer les cellules cancéreuses en réduisant leur apport en nutriments.

Par exemple : les composés C2-Ceramide et SH-BC-893 empêchent l'absorption des nutriments en perturbant le trafic intracellulaire des transporteurs du glucose et des acides aminés dont les fonctions requièrent l'activation de la protéine phosphatase 2A (PP2A) [16]. Les figures 3 et 4 représentent respectivement les molécules de C2-Ceramide et de SH-BC-893.

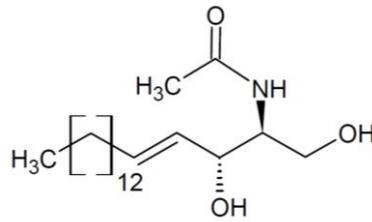


Figure 3 : Molécule de C2-Ceramide.

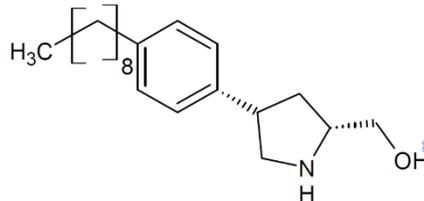


Figure 4 : Molécule de SH-BC-893.

Le composé SH-BC-893 empêche l'accès aux nutriments en perturbant le trafic intracellulaire des transporteurs de nutriments mais également en bloquant les réactions de fusion lysosomale se qui produit la vacuolation cytoplasmique. Une vacuole est un organe lié à la membrane et présent dans le cytoplasme de la plupart des cellules. Elle est constituée principalement d'eau avec des éléments dissous comme des sels, des sucres, des enzymes et des acides aminés. La vacuolation est donc la formation de ces vacuoles. Ces deux effets se produisent lors de l'activation de la protéine phosphatase 2A (PP2A). La C2-ceramide active également l'enzyme PP2A. Comme expliqué dans le paragraphe ci-dessus, la molécule de C2-ceramide bloque les transporteurs de nutriments de la surface des cellules. La différence entre les deux molécules est que la C2-ceramide ne permet pas la vacuolation. Le tableau 1 récapitule les différents rôles des deux drogues utilisées.

Tableau 1 : Récapitulatif des rôles des deux drogues utilisées.

	Activateur de PP2A	Bloque les transporteurs de nutriments	Cause la vacuolation
C2-Ceramide	+	+	-
SH-BC-893	+	+	+

Ces résultats suggèrent que le SH-BC-893 vise deux complexes de PP2A distincts. Le premier qui concerne également la C2-ceramide inhibe la régulation du trafic des transporteurs. Le second complexe, activé uniquement par le SH-BC-893, bloque les réactions de fusion lysosomale. Afin de comprendre le mécanisme par lequel l'activation de PP2A permet d'augmenter l'endocytose et réguler l'activité d'autres substrats, la cinétique de phosphorylation des protéines dans les cellules hématopoïétiques de souris (FL5.12) après l'incubation avec ces deux molécules a été étudiée.

Des études préalables ont été faites, dans les laboratoires d'A. Edinger, sur les drogues étudiées pour prouver leurs rôles sur les transporteurs de nutriments ainsi que sur la vacuolation [17]. Les résultats sont observables sur la figure 5. Le graphique de gauche montre que le SH-BC-893 (rouge) bloque la surface d'expression des transporteurs de nutriments. En effet, la courbe rouge diminue fortement. La courbe bleue représente le contrôle, ce qui explique le fait qu'elle reste constante.

Concernant la C2-céramide, le graphique de droite indique qu'elle bloque également la surface d'expression des transporteurs de nutriments. Cet effet est observé de manière moindre que pour le SH-BC-893 [17]. Les images prises au microscope montrent que le composé SH-BC-893 favorise la vacuolation tandis que les cellules traitées avec la C2-céramide n'en présentent aucune forme.

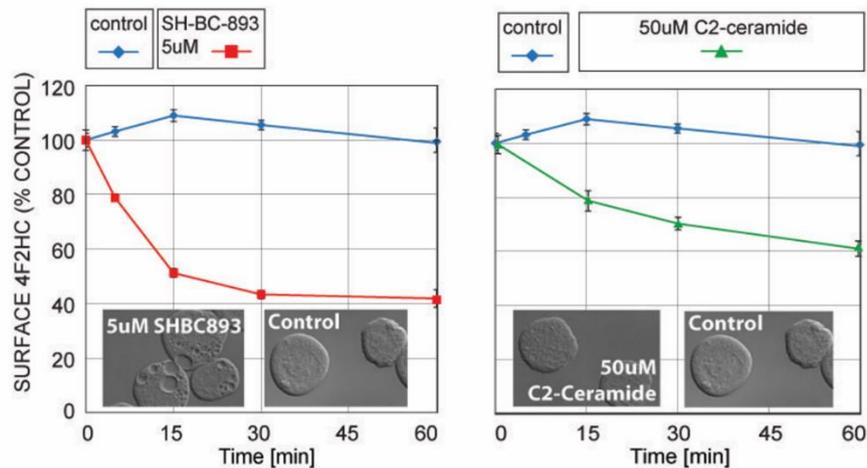


Figure 5 : Rôles des différentes drogues concernant le transport de nutriment à travers les cellules et la vacuolation.

## 1.2 Stratégie

Ce travail a pour but de regarder le changement de phosphorylation de protéine à l'aide du spectromètre de masse en tandem. La figure 6 représente toutes les étapes effectuées lors du travail en laboratoire. La cinétique est étudiée en collectant des échantillons avec 5 minutes d'intervalle entre chaque prise, ceci durant 60 minutes. Les cellules récoltées sont instantanément congelées dans de l'éthanol 40 % dans du PBS. Les cellules sont ensuite lysées et les protéines résultantes sont digérées à l'aide de la trypsine. Les phosphopeptides obtenus sont enrichis à l'aide de billes de  $TiO_2$ . L'échantillon complexe est ensuite fractionné par chromatographie d'échange cationique fort (SCX). Les phosphopeptides qui en résultent sont analysés par LC-MS/MS. Les données brutes sont traitées à l'aide de MaxQuant et mise en évidence grâce au logiciel de programmation R.

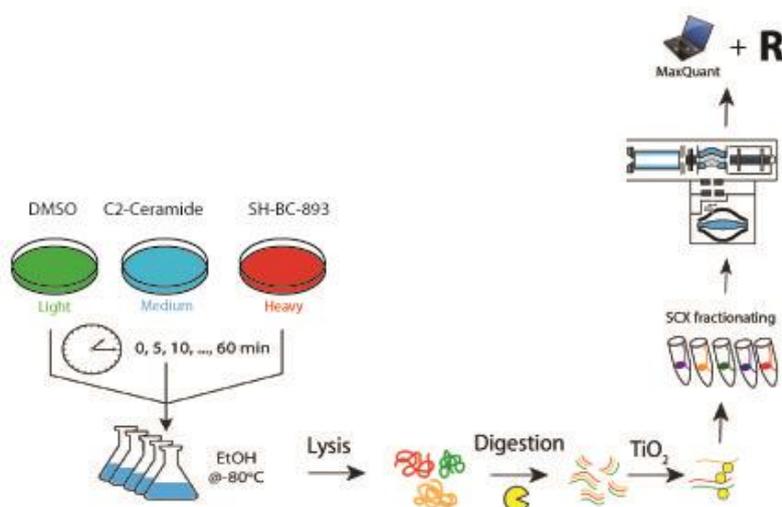


Figure 6 : Schéma représentant les différentes étapes planifiées du travail en laboratoire.

### 1.2.1 SILAC

La méthode SILAC ou « Stable Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture » est utilisée afin de quantifier les peptides et les changements liés à la phosphorylation de protéines. SILAC est une méthode de marquage métabolique *in vivo* utilisée dans la culture cellulaire. SILAC est initialement appliquée dans le domaine de la protéomique en 2002 pour la quantification des protéines [18]. Depuis, la méthode SILAC a montré qu'elle pouvait être utilisée dans de nombreux domaines tels que l'élucidation des mécanismes moléculaires impliqués dans les grandes fonctions cellulaires ainsi que pour l'identification de biomarqueurs de maladies [19].

Le principe de SILAC est de cultiver une population de cellules dans un milieu particulier avec un ou plusieurs acides aminés essentiels contenant des isotopes lourds. Les acides aminés utilisés sont le plus souvent l'arginine et la lysine. Différentes études ont démontré que l'utilisation de ces milieux de cultures modifiés n'affectait en rien la croissance, la division, la morphologie ou la réponse biologique des cellules [20]. Généralement, il est considéré que la totalité des protéines cellulaires ont incorporés les acides aminés lourds après 6 à 8 générations [21]. L'utilisation des acides aminés arginine et lysine n'est pas un hasard. En effet, lors de la digestion de protéines, la Trypsine qui est la protéase la plus souvent utilisée, coupe spécifiquement au C-terminus de la lysine et de l'arginine [22]. Un autre avantage de l'utilisation de la Trypsine est l'abondance de lysine et arginine dans les protéines. Par conséquent, chaque peptide tryptique va contenir au moins un acide aminé marqué. De plus, les acides aminés lysine et arginine sont basique, chaque peptide va donc porter deux charges, ce qui permet un séquençage simplifié.

Lors de ce travail, trois populations de cellules sont cultivées en milieu SILAC. La première population consiste au contrôle et est alimentée avec un milieu de croissance contenant des acides aminés normaux (légers). Ce milieu est donc composé d'acide aminé connus comprenant du carbone ( $^{12}\text{C}$ ) et de l'azote ( $^{14}\text{N}$ ). En ce qui concerne les deux autres populations, elles sont alimentées avec un milieu de croissance contenant des acides aminés marqués avec des isotopes lourds stables. Ces milieux sont constitués d'acides aminés qui contiennent des formes d'isotopes stables de  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ . Les cellules qui se développent dans ces différents milieux intègrent l'arginine et la lysine lourde dans l'ensemble de leurs protéines. La figure 7 montre de manière schématisée le procédé de la méthode SILAC.

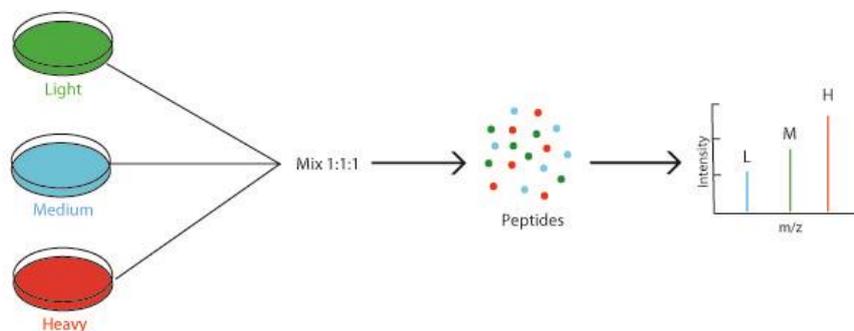


Figure 7 : Principe de la méthode SILAC schématisé.



Cette méthode est de plus en plus employée de par son faible taux de liaisons non-spécifiques et de sa tolérance envers différents tampons contenant des sels et détergents souvent utilisés lors de la préparation des échantillons. Afin d'obtenir un taux d'enrichissement allant jusqu'à 90 %, les conditions de cette méthode ont été optimisées. Pour minimiser la liaison de peptides non-phosphorylés, l'acide lactique s'est montré être une solution de resuspension très efficace. En effet, les groupements phosphates vont être facilement capturés par les charges positives présentes à la surface du  $\text{TiO}_2$  en condition acide. La figure 9 représente d'une manière schématisée la technique IMAC ainsi que la technique utilisant le dioxyde de titane.

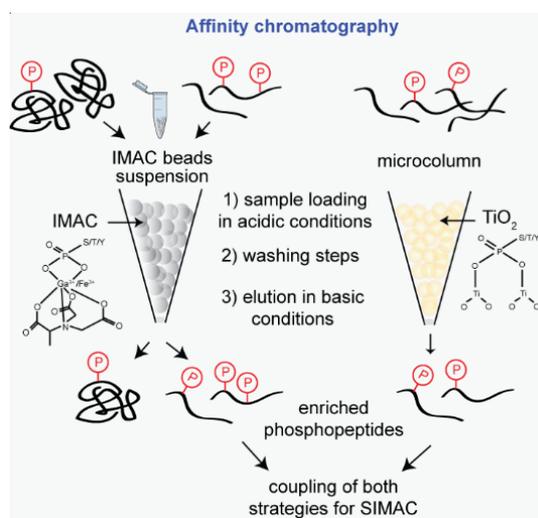


Figure 9 : Comparaison des techniques IMAC et dioxyde de titane utilisé pour l'enrichissement des phosphopeptides [29].

### 1.2.3 Séparation par échange d'ions

Afin de diminuer la complexité d'un échantillon peptidique, il est préférable de séparer les peptides en plusieurs fractions avant l'analyse LC-MS/MS. Séparer des peptides ou des protéines selon leurs charges s'avère intéressant et très efficace. Une des techniques les plus utilisées est la chromatographie d'échange cationique fort (SCX). La phase stationnaire contient des groupes chargés négativement à la surface et peut donc retenir les molécules chargées positivement. Les polymères utilisés sont attachés de manière covalente à une résine constituée de billes de cellulose ou d'agarose. La rétention des peptides sur les phases est régulée selon les différentes interactions ioniques. Il s'avère que pour purifier les phosphopeptides d'un mélange complexe, l'utilisation unique de la chromatographie d'échange d'ion n'est pas une méthode très efficace. En effet, elle est utilisée comme méthode de préfractionnement avant ou après une étape d'enrichissement. Deux différentes approches de SCX peuvent être employées : l'approche online ou offline. Lors de ce travail, la méthode offline a été utilisée. En effet, comme beaucoup d'échantillon sont analysés, il est préférable de procéder à une chromatographie SCX en parallèle pour chaque échantillon [30].

La charge d'une solution peptidique est premièrement déterminée par sa séquence. Un certain nombre de résidus (arginine, lysine et histidine) génèrent une charge positive tandis que d'autres résidus (thréonines, sérine phosphorylée) ont une charge négative. La charge de ces résidus est dépendante du pH de la solution. Dans les expériences protéomiques actuelles, l'échantillon est dans un premier temps clivé par voie enzymatique à l'aide d'une protéase qui est, le plus souvent, la trypsine.

D'une manière générale, les peptides tryptiques ont une lysine ou une arginine à leur C-terminal et un groupe amine libre à leur N-terminal. A un pH bas, la plupart des résidus acides seront neutres. La charge des peptides générés sera donc doublement positive [31]. Les peptides phosphorylés, quant à eux, auront une charge négative.

La majorité des peptides tryptiques sont chargés positivement à pH acide, c'est pourquoi la séparation se déroule à un pH de 2-3. Les peptides retenus sont élués à l'aide d'une phase mobile de force ionique croissante. Différentes phases mobile avec des concentrations de sels différentes sont donc appliquées sur la colonne. Dans un premier temps, les peptides peu chargés sont élués. Les peptides avec des charges plus élevées seront donc élués plus tard.

### 1.3 Spectrométrie de masse

La protéomique permet une meilleure compréhension des différents processus qui se passent à l'intérieur des cellules. La protéomique est divisée en deux phases. La première phase est la phase de découverte. Il s'agit d'une identification globale et à grande échelle des peptides afin de déterminer lesquels sont régulés. La deuxième phase est une phase plus ciblée. En effet, des peptides ou des modifications spécifiques sont recherchés dans les protéines. Afin d'obtenir la caractérisation structurale la plus complète des protéines modifiées, la méthode Bottom-up est utilisée. Cette dernière permet d'identifier les protéines et caractériser leurs séquences d'acides aminés en digérant les protéines avant l'analyse par spectrométrie de masse. La figure 10 est un bref aperçu de la manière de travailler en protéomique. Les protéines sont digérées en peptides et les échantillons sont séparés par chromatographie en phase liquide avant leur analyse au spectromètre de masse.

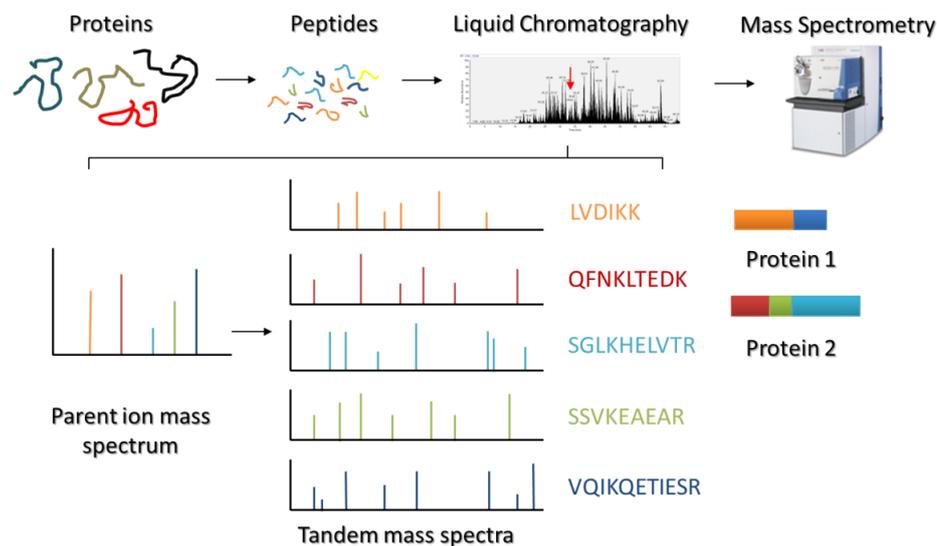


Figure 10 : Différentes étapes de la protéomique. Après une digestion trypsique, les peptides sont analysés à l'aide du LC-MS/MS. Des spectres MS/MS sont produits. Il s'agit des empreintes digitales de chaque peptide. Les différents peptides sont identifiés à l'aide d'outil bioinformatiques. Les peptides sont ensuite reconstitués et affiliés à leur protéine respective [32].

### 1.3.1 Nano LC-MS

Ayant une sensibilité et une spécificité très élevée, la nano chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem est souvent utilisée pour l'analyse protéomique. Après la séparation de l'échantillon à l'aide du nano HPLC, ce dernier est transféré dans le spectromètre de masse. La source utilisée est l'électrospray. « Electro spray ionisation » (ESI) et « matrix assisted laser desorption/ionization » (MALDI) sont les méthodes les plus couramment utilisées pour évaporer et ioniser les peptides des échantillons complexes [33]. De faibles débits et des colonnes avec de petits diamètres sont employés afin d'augmenter la sensibilité. En effet, la quantité de peptide habituellement obtenu après digestion se trouve dans des concentrations de l'ordre du  $\mu\text{M}$ . Ceci permet également, dans un même temps, d'améliorer l'efficacité de l'ionisation par la formation de plus petites gouttelettes [34]. Le processus électrospray est obtenu en appliquant une différence de potentiel élevée entre l'extrémité du système chromatographique et l'entrée de l'analyseur de masse. Ce champ électrique va entraîner la polarisation du liquide et la séparation des charges positives et négatives. Lorsque le champ électrique est suffisamment fort, la solution forme un cône dynamique, appelé cône de Taylor. Ce cône va s'étirer jusqu'à éclater en minces gouttelettes hautement chargées. Le solvant contenu dans les gouttelettes va progressivement s'évaporer. La densité de charge de la gouttelette va augmenter jusqu'à atteindre le rayon critique appelé le rayon de Rayleigh, moment où les forces de répulsion électrostatiques sont égales aux forces de tension de surface [35]. Les ions contenus dans ces microgouttelettes subissent une augmentation de la répulsion électrostatiques et sont finalement expulsés et analysés par le spectromètre de masse. Ce phénomène est décrit dans la figure 11.

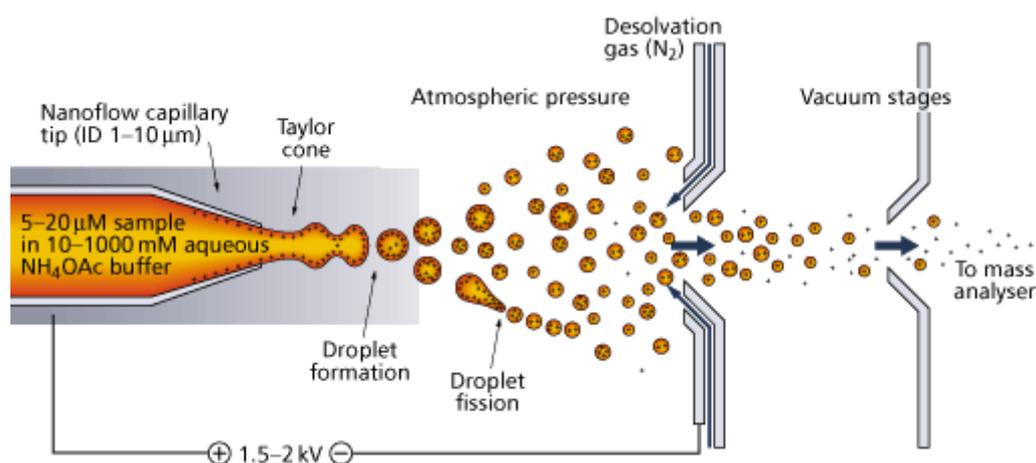


Figure 11 : Principe de l'électrospray [36].

L'appareil utilisé lors de ce travail pratique est l'Orbitrap qE HF de Thermo. L'instrument se compose de la combinaison d'un piège à ions linéaire et d'un Orbitrap qui combine de grands avantages : robustesse et sensibilité par le piège à ions et haute résolution et grande précision pour l'Orbitrap [37]. La figure 12 montre la vue d'ensemble d'un appareil Orbitrap qE HF. Les ions formés dans la source électrospray vont prendre de la vitesse et entrer dans l'analyseur Orbitrap afin d'être séparés selon le rapport masse/charge ( $m/z$ ). Les peptides à l'état gazeux entrent dans l'analyseur de masse et le faisceau d'ions est concentré à travers un ensemble d'ouvertures en acier inoxydable dans lesquelles une tension RF est appliquée. Cet ensemble d'ouvertures est appelé S-Lens et permet d'améliorer la transmission des ions par un facteur 5 à 10 par rapport à un appareil sans S-Lens.

En mode MS, les ions se déplacent à travers les cellules à haute et basse pression pour ensuite être stockés dans le C-trap avant l'injection dans l'Orbitrap. Le C-trap est un piège à ions courbé en forme de C. Il est composé d'une porte électrostatique et d'une trappe-électrode.

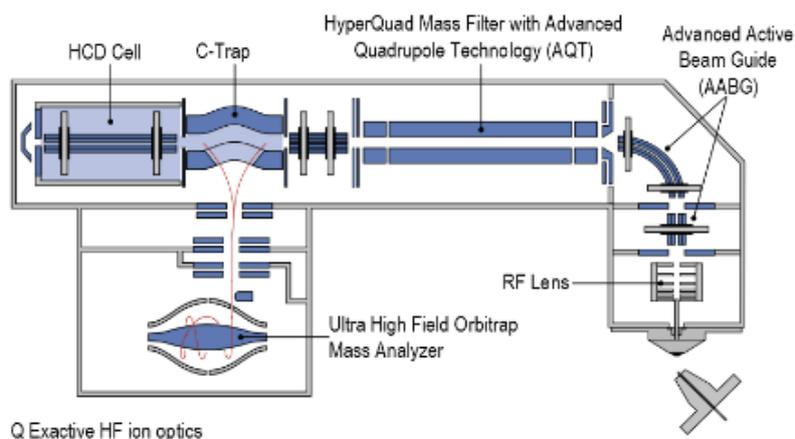


Figure 12 : Les ions entrent dans l'analyseur de masse sous forme gazeuse. Premièrement ils sont piégés dans la trappe à ions linéaire avant d'être transféré dans l'Orbitrap [37].

L'Orbitrap se compose d'une électrode creuse externe et d'une électrode centrale placée coaxialement, en forme de fuseau. Une tension alternative à la polarité opposée aux ions est portée sur l'électrode centrale. La forme particulière de ces deux électrodes permet l'application d'un champ électrostatique quadripolaire. Les ions sont injectés tangentiellement à l'électrode centrale et piégés autour d'elle par la force électrostatique qui compense les forces centrifuges [38, 39]. Dans l'Orbitrap, le mouvement des ions correspond à une trajectoire en spirale autour de l'électrode centrale. Ce dernier est décomposé en deux mouvements différents. Premièrement, le mouvement circulaire qui n'est pas exploitable. Deuxièmement, le mouvement axial, dont la fréquence est exploitée pour mesurer la masse par la transformation de Fourier puis, le spectre de fréquence est converti en spectre  $m/z$ . La fréquence axiale des ions ( $w$ ) dépend seulement du rapport masse/charge ( $m/z$ ) comme le montre l'équation 1.  $k$  est une constante déterminée par la forme de l'électrode centrale et la tension appliquée.

$$w = \left( \frac{z * k}{m} \right)^{1/2}$$

Equation 1 : Fréquence axiale des ions.

## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1 Matériels

Les tableaux suivants contiennent l'équipement du laboratoire, le matériel et les réactifs utilisés durant ce travail.

#### 2.1.1 Equipement

Tableau 2 : Equipement du laboratoire.

Speed Vac	Thermo SPD131DDA-115
Incubateur UV CO <sub>2</sub>	Panasonic UV Safe cell MCO-19AIC-PA
Multiscan spectrum plate reader	Thermo electron corp.
Microscope	LEICA DFC480
Plaque 96 puits	VWR CA62406-343
Sonicator	Fisher Sonic Dismembrator Model 100
Centrifuge	Sorvall Discovery M150SE + S45A rotor
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer R
C18 Cartridges	Waters Sep-Pak® Vac 1cc (100mg) tC18 Cartridges 008233241A
Bottle Top Filtration unit	VWR® 16111105

#### 2.1.2 Produits chimiques

Tableau 3 : Liste des produits chimiques.

Réactifs	Fournisseur	Lot
Acétonitrile (99, 9 %)	Fisher Chemical	A998-4
Acide Trifluoroacétique	Fisher Chemical	153080
Deoxycholic Acid Sodium Salt SDC	Fisher BioReagents BP349-100	152450
Acide acétique (99, 7 %)	Fisherbrand	351269-4
Réactif A	Pierce® BCA Protein Assay Thermo Scientific 23223	QI222290
Réactif B	Pierce® BCA Protein Assay Thermo Scientific 23224	QJ221546
HEPES (99, 5 %)	Sigma	H4034
Hydroxyde de sodium (50 %)	Fisher Chemical	SS254
2-Mercaptoethanol	Gibco®	1567877
Acide lactique	Fluka	69775
Dihydrogénophosphate de sodium	Sigma	55136
Acide Formique (98 %)	Merck	K41450564
Titansphere TiO <sub>2</sub>	Canadian LifeScience	ZQ5-4436
Chlorure de sodium (99,5 %)	Sigma aldrich	SLBJ2691V
DMSO	Fisher Chemical	120863

### 2.1.3 Colonnes

Tableau 4 : Différentes capillaires utilisées.

Colonne ID [ $\mu\text{m}$ ]	Fournisseur	Lot
150	Polymicro Technologies	1068150025
52	Polymicro Technologies	1068150017

Tableau 5 : Liste du matériel utilisé lors de la fabrication des colonnes.

	Fournisseur	Lot
C18 Jupiter®	Phenomenex	04A-4263
Empore™ Octadecyl C18, 47 mm Extraction Disks 2215	Supelco	73254
Hight performance extraction disk, Anion SR 47 mm	3M Empore™	720209
Polysulfoéthyl A™	PolyLC	12-130-5

### 2.1.4 Molécules biologiques

Tableau 6 : Liste des molécules biologiques.

	Fournisseur	Lot
Bovine Serum Albumin	Fraction V Omnipur	2910
$\alpha$ -Casein Dephosphorylated	Sigma	C8032
Fetal Bovine Serum dialyzed	Corning	35071104
L-Asparagine	BioShop	5C37699
L-Glutamine	Fisher BioReagents	152553
C2-ceramide	Enzo life sciences	05041528
SH-BC-893	Laboratoire Steven Hanessian UdeM	

### 2.1.5 Culture cellulaire

Tableau 7 : Substances utilisées pour la culture cellulaire.

SILAC™ RPMI 1640 medium	gicbo® 1749767
FL5.12 cells	Type d'organisme : Souris Tissues : Foie
IL-3	VWR®

## 2.2 Méthodes

### 2.2.1 Culture cellulaire

#### 2.2.1.1 Culture cellulaire

En ce qui concerne la culture des cellules de souris FL5.12, le milieu utilisé est préparé de la façon suivante : sont ajouté dans le milieu RPMI 1640, 10% de fetal bovine serum, 2 % de 2 mM L-Glutamine, 1 % de tampon HEPES 10 mM pH=7, 0,1 % d'acide aminé (léger, moyen et lourd) et 0,1 % de 55  $\mu$ M 2-mercaptoéthanol. Les cultures cellulaires sont maintenues dans un incubateur à 5 % de CO<sub>2</sub> et 37 °C.

#### 2.2.1.2 Passage des cellules

Il est important de garder les cellules à une concentration basse car elles meurent à haute concentration (> 2 million de cellules/millilitre). Les cellules sont donc diluées quotidiennement à 0,25 M/mL. En une journée, le nombre de cellules quadruple, ce qui signifie que le jour suivant, elles ont atteint une concentration d'environ 1 M/mL. Durant le week-end, les cellules sont diluées à 0,05 M/mL car elles se divisent durant deux jours. La première étape est de préparer la hotte de ventilation. Cette dernière est soigneusement nettoyée avec de l'éthanol 70 %. Les cellules sont ensuite sorties de l'incubateur (Le liquide doit être légèrement jaune et transparent). 1 mL de chaque culture est transféré dans un eppendorf de 1,5 mL. Les cellules sont ensuite comptées à l'aide d'une « Neubauer chamber ». Le nombre de cellules obtenu est multiplié par 10<sup>4</sup> afin de connaître la quantité de cellule présentent dans 1 mL de milieu. A l'aide du nombre de cellules, le facteur de dilution est connu. Le volume approprié est enlevé de la culture et le même volume du nouveau milieu est ajouté. Pour proliférer, les cellules ont besoin d'un facteur spécifique, appelé IL-3. Ce dernier est ajouté à chaque passage de cellules à une concentration de 1/1000. Pour finir, les différentes flasques sont déposées dans l'incubateur.

#### 2.2.1.3 Traitement des cellules

Au moment du traitement, les cellules sont cultivées dans des réacteurs de 500 mL. Environ 460 mL de milieu contenant une concentration de cellules d'environ 1,5 M/mL doivent être obtenu pour commencer l'expérience. Cette quantité de cellules permet d'obtenir un grand nombre de peptides. Le milieu contenant les acides aminés « léger » est un milieu de contrôle, aucune drogue sera donc mise en contact avec ces cellules. 400  $\mu$ L de DMSO sont ajoutés au milieu léger. 400  $\mu$ L de C2-ceramide 50  $\mu$ M sont ajoutés au milieu moyen. Pour finir, 400  $\mu$ L de SH-BC-893 5  $\mu$ M ainsi que 400  $\mu$ L de DMSO sont ajoutés au milieu lourd.

#### 2.2.1.4 Collecte de cellules

Les échantillons sont récoltés chaque 5 minutes durant un temps total de 60 minutes. 25 mL de milieu léger, 25 mL de milieu moyen et 25 mL de milieu lourd sont récoltés et déposés immédiatement dans 350 mL d'éthanol 40 % dans du PBS refroidi préalablement à -20 °C. L'échantillon est centrifugé à 4'150 g durant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et les cellules obtenues sont solubilisées dans 15 mL de PBS froid. L'échantillon est centrifugé à 1'500 g durant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et les cellules sont solubilisées dans 1 mL de PBS froid et transposées dans un eppendorf de 1,5 mL. L'échantillon est centrifugé à 2'000 g durant 3 minutes. Cette étape de lavage avec 1 mL de PBS est répétée 2 fois. L'échantillon peut ensuite être gardé à - 80 °C.

## 2.2.2 Extraction et purification des protéines

### 2.2.2.1 Lyse des cellules et extraction des protéines

Une fois les étapes de lavage terminées, les cellules sont solubilisées dans 1 mL de 1 % (w/v) SDC dans du 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  glacé (Lysis buffer). La suspension est transférée dans des tubes avec bouchon à visser de 1,5 mL. La solution est passée au Sonicate à la puissance de 3 durant 5-10 secondes. Cette étape permet la lyse des cellules mammifères. Immédiatement, l'échantillon est transféré dans un thermomixer à 950 rpm et incubé à 99 °C durant 5 minutes. Ensuite, l'échantillon est centrifugé à 4'000 g durant 10 minutes. Le surnageant est transféré dans un nouvel eppendorf.

### 2.2.2.2 Digestion enzymatique

Du DTT 500 mM est ajouté à l'échantillon afin d'obtenir une concentration finale de 5 mM. L'échantillon est agité à 800 rpm, 56 °C durant 30 minutes. Une fois cette étape terminée, l'échantillon est refroidi à température ambiante. Du IAA 500 mM est ajouté à l'échantillon afin d'obtenir une concentration finale de 15 mM. La solution est incubée dans le noir durant 30 minutes à température ambiante. Du DTT 500 mM est ajouté (concentration finale de 5 mM) afin d'éliminer l'excès de IAA. L'échantillon est incubé dans le noir à température ambiante durant 15 minutes. La Trypsine est ajoutée afin d'obtenir une concentration finale de 5 – 10 ng/ $\mu\text{L}$  (protéine : Trypsine ~ 50: 1). Afin de déterminer la quantité de Trypsine à ajouter, il est nécessaire de procéder à un BCA assay expliqué à la partie 2.2.2.4. La solution finale est incubée durant la nuit à 37 °C et 750 rpm.

### 2.2.2.3 Purification et concentration

Après la digestion, l'échantillon est acidifié à l'aide de TFA 30 % jusqu'à pH d'environ 2. La solution est agitée et centrifugée à 13'000 g pendant 5 minutes. Le surnageant est transféré dans un nouvel eppendorf. Le SDC resté au fond de l'eppendorf après la centrifugation est lavé à l'aide de 1 mL TFA 0,1 %. La solution est centrifugée à 13'000 g durant 5 minutes. Les surnageants sont rassemblés.

La colonne C18 est conditionnée à l'aide de 1 mL d'ACN, 1 mL de 50 % ACN – 0,5 % AcOH et 1 mL de 0,1 % TFA. Une fois cette étape terminée, l'échantillon est appliqué sur la colonne. Ce dernier est dessalé à l'aide de 1 mL de TFA 0,1 %. Les peptides sont ensuite élués à l'aide de 1 mL de 50 % ACN – 0,5 % AcOH. L'éluât est récupéré et déposé dans de l'azote liquide. L'échantillon gelé est séché au speedvac à température ambiante durant 4 à 6 heures. L'échantillon sec peut être stocké à – 20 °C durant quelques semaines.

### 2.2.2.4 BCA Assay

Lors de cet essai, une réaction colorimétrique est utilisée. Durant la réaction, un complexe se forme entre les liaisons peptidiques et l'acide bicinchoninique ce qui réduit le  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$ . Le nombre de liaisons peptidiques est proportionnel à la quantité de cuivre réduit donc aux nombres de protéines présentes dans l'échantillon [40]. De cette réaction résulte une intense couleur violette. La figure 13 représente la réaction entre le cuivre et la molécule de BCA. Cette méthode est décrite dans le protocole « Measuring Protein Concentration with BCA assay » qui se trouve à l'annexe 7.1. En ce qui concerne la préparation des standards de BSA pour la courbe de calibration, le tableau 8 récapitule toutes les préparations. Les standards peuvent être stockés à 4 °C pour une durée illimitée. Les résultats du BCA assay sont présentés à l'annexe 7.4.

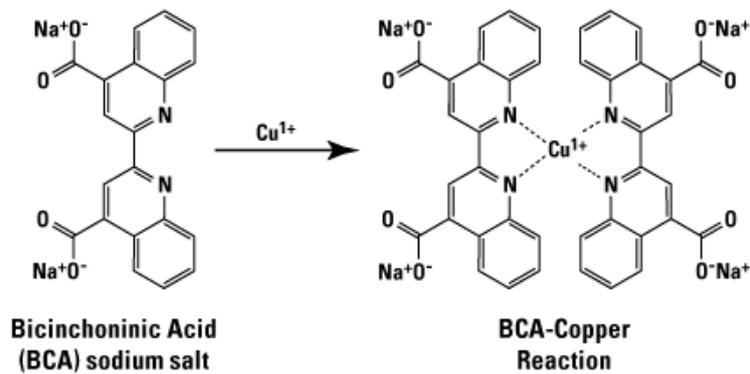


Figure 13 : La réaction du BCA avec l'ion cuivre. Deux molécules de BCA sont nécessaires pour chaque  $\text{Cu}^{1+}$  [40].

Tableau 8 : Liste des standards de BSA

Vial	Volume de dilution ( $\mu\text{L}$ )	Volume et Source de BSA ( $\mu\text{L}$ )	Concentration finale BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )
A	0	300 of stock	2000
B	125	375 of stock	1500
C	325	325 of stock	1000
D	175	175 of vial B dilution	750
E	325	325 of vial C dilution	500
F	325	325 of vial E dilution	250
G	325	325 of vial F dilution	125
H	400	100 of vial G dilution	25
I	400	0	0

### 2.2.2.5 Enrichissement des phosphopeptides

Après la digestion, des peptides phosphorylés sont présents dans de quantités très faibles par rapport aux peptides non phosphorylés. La technique de purification des peptides phosphorylés consiste à utiliser des billes de  $\text{TiO}_2$ . Le titanium dioxyde est solubilisé dans de l'ACN afin d'obtenir une concentration de 50  $\text{mg/mL}$ . Les colonnes sont préparées comme le montre la figure 14. 200  $\mu\text{L}$  de suspension de  $\text{TiO}_2$  sont utilisés pour 1  $\text{mg}$  d'échantillon de peptides.

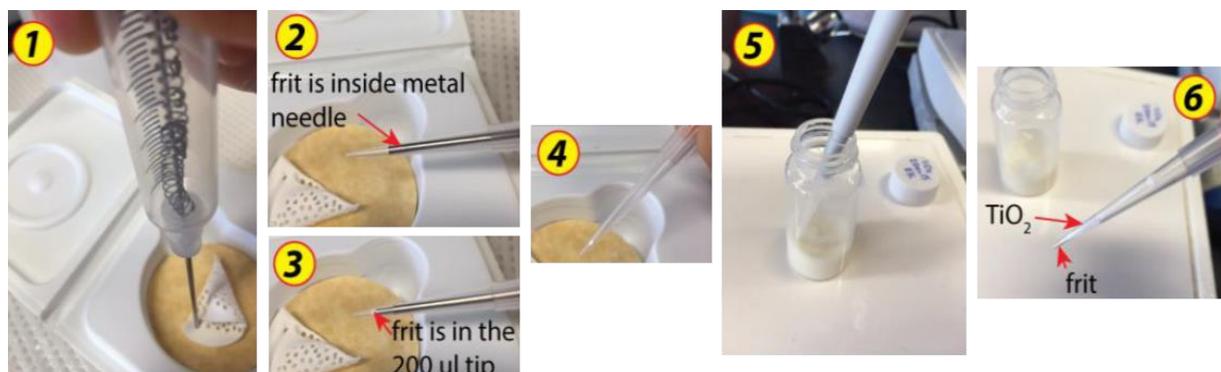


Figure 14 : Méthode pour préparer les colonnes pour l'enrichissement  $\text{TiO}_2$ . Premièrement, il est nécessaire de couper une pièce de membrane Empore™ Octadecyl C18 avec la « StageTip syringe » (1). Ensuite, insérer la seringue à l'intérieur d'un tips de 200  $\mu\text{L}$  (2) et transférer la membrane dans le tips (3) (4). Pour finir, il suffit de remplir la colonne avec la quantité voulue de suspension  $\text{TiO}_2$  (5) (6).

La colonne est intégrée à un eppendorf de 2 mL par un trou fait dans la partie supérieure comme le montre la figure 15. Une fois la colonne préparée et avant d'y charger l'échantillon, il est nécessaire de la conditionner. Pour ce faire, ajouter 100  $\mu$ L de tampon LAQ (Acide lactique 250 mM saturé en glutamine dans 70 % ACN, 3 % TFA). L'échantillon préalablement séché au speedvac est solubilisé dans 150  $\mu$ L de tampon LAQ et centrifugé durant 3 minutes à 2'000 g. L'échantillon peut ensuite être chargé sur la colonne et centrifugé durant 10 minutes à 2'000 g. Le liquide passé à travers la colonne (flow through) est récupéré et appliqué encore une fois sur la colonne afin d'obtenir deux passages par échantillons sur les billes de  $\text{TiO}_2$ . La colonne est lavée avec, dans l'ordre, 4 portions de 150  $\mu$ L de tampon LAQ, 100  $\mu$ L de washing buffer (70 % ACN, 3 % TFA) et 50  $\mu$ L de 1 % FA. Il est important de vider le flow through entre chaque lavage afin que le liquide ne touche pas la colonne. Centrifuger entre chaque étape 10 minutes à 2000 g. Les peptides peuvent ensuite être élués à l'aide de deux portions de 50  $\mu$ L de tampon phosphate 500 mM à pH 7. C'est à ce moment-là que les phosphopeptides sont retenus sur la membrane hydrophobique. Les traces de sels sont éliminées à l'aide de 50  $\mu$ L de 1 % FA. Finalement, les phosphopeptides sont élués avec deux portions de 50  $\mu$ L de 50 % ACN- 1 % FA. Tous les échantillons sont trempés dans de l'azote liquide quelques secondes et séchés au speedvac.

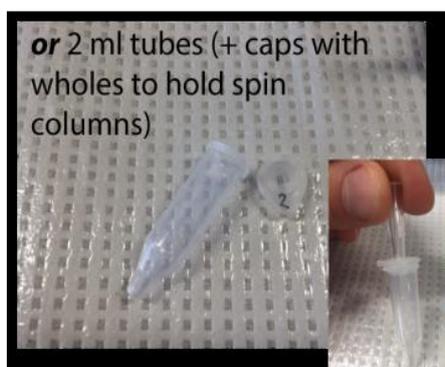


Figure 15 : Tubes de 2 mL avec un trou dans la partie supérieure afin d'y mettre la colonne. Le tube permet de récupérer le flow through.

## 2.3 Méthodes analytiques

### 2.3.1 Chromatographie d'échange d'ion

La séparation des protéines digérées peut être réalisée à l'aide de la chromatographie d'échange d'ions. La colonne est réalisée de la même manière que décrite dans la partie 2.2.2.5 pour l'enrichissement des phosphopeptides. Une pièce de membrane Anion SR est ajoutée à la colonne. Cette dernière est ensuite remplie avec 18-22 g d'une suspension de Polysulfoethyl A dans du méthanol. Une fois la colonne placée dans un eppendorf de 2 mL, le tout est centrifugé durant 1 minute à 13'000 g afin d'éliminer le méthanol. La colonne est ensuite équilibrée avec, dans l'ordre, 100  $\mu$ L de 50 % ACN- 0,5 % FA, 100  $\mu$ L de tampon SCX B (NaCl 1M dans du tampon SCX A) et 2 portions de 100  $\mu$ L de tampon SCX A (10 % ACN – 0,2 % FA). Entre chaque étape, la colonne est centrifugée durant 3 minutes à 5'000 g. L'échantillon de peptide peut être chargé sur la colonne et centrifugé durant 15 minutes à 5'000 g. Le flow through est récupéré (FT). L'étape de lavage se fait à l'aide de 50  $\mu$ L de tampon SCX A, le liquide qui a passé à travers la colonne est récupéré et combiné au FT. Lors de cette étape, centrifuger à 6'000 g durant 5 minutes. Les peptides sont ensuite élués avec 100  $\mu$ L de chaque différente solution de chlorure de sodium (30-50-80-120 et 500 mM).

Entre chaque étape, centrifuger à 6'500 g durant 5 minutes. Chaque échantillon va donc être fractionné en 5 différentes parties comme le montre la figure 16. Les échantillons sont ensuite purifiés comme décrit dans la partie 2.2.2.3, trempés quelques secondes dans de l'azote liquide et séchés au speedvac.

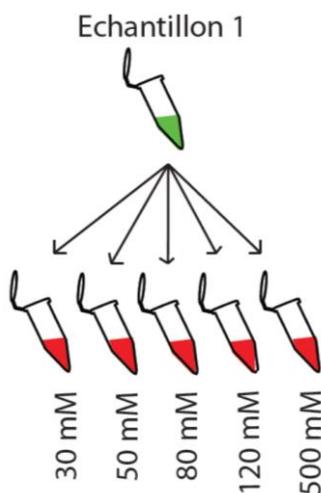


Figure 16 : Schéma d'un fractionnement pour un échantillon.

## 2.3.2 Chromatographie liquide

### 2.3.2.1 Préparation d'échantillon

En général, 1 µg de peptides préalablement séchés sont dissous dans du 4 % FA et injectés.

### 2.3.2.2 Colonne

Les colonnes capillaires utilisées pour la chromatographie liquide sont préparées au laboratoire sous azote. La colonne contient une phase stationnaire Jupiter® 3 µm C18 300 Å. Le protocole de fabrication d'une colonne se trouve à l'annexe 7.2.

### 2.3.2.3 Système de séparation LC

Les peptides sont élués avec un gradient de 5 à 70 % d'acétonitrile. Le deuxième éluent est composé d'eau avec 0,2 % d'acide formique. Le volume d'injection est de 18 µL. Le débit de l'HPLC est 0,6 µL/min. Le tableau 9 représente le gradient standard utilisé pour une séparation de 150 minutes.

Tableau 9 : Gradient standard utilisé avec la méthode à 150 minutes.

Temps de rétention [min]	Acétonitrile [%]	0, 2 % acide formique dans l'eau [%]
<b>0</b>	5	95
<b>136</b>	30	70
<b>136,5</b>	70	30
<b>140</b>	70	30
<b>140,5</b>	5	95
<b>150</b>	5	95

Le tableau 10 représente le gradient standard utilisé pour l'analyse du Promix décrite à la partie 2.3.3.1.

Tableau 10 : Gradient standard utilisé pour le Promix.

Temps de rétention [min]	Acétonitrile [%]	0, 2 % acide formique dans l'eau [%]
0	5	95
60	30	70
60,5	80	20
64	80	20
64,5	5	95
70	5	95

### 2.3.3 Spectrométrie de masse

#### 2.3.3.1 Solution test: Promix

Afin de tester et contrôler le LC-ESI-MS, une solution nommée Promix est utilisée. Promix est une solution complexe de 8 protéines ayant subi une digestion trypsique. Le mode opératoire se trouve à l'annexe 7.3. L'analyse LC-MS de Promix est utilisée comme test de contrôle afin de déterminer si les performances de l'appareil sont acceptables. Cela inclut l'intensité du signal, le contrôle des ions spécifiques précurseurs ainsi que leur temps de rétention et la comparaison avec le Promix utilisé lors de précédentes analyses [32]. En protéomique, la quantité d'échantillon à analyser est généralement faible. Le Promix est extrêmement utile afin d'éviter la perte d'échantillon en raison de problèmes d'instruments et également pour travailler dans conditions d'analyses optimales.

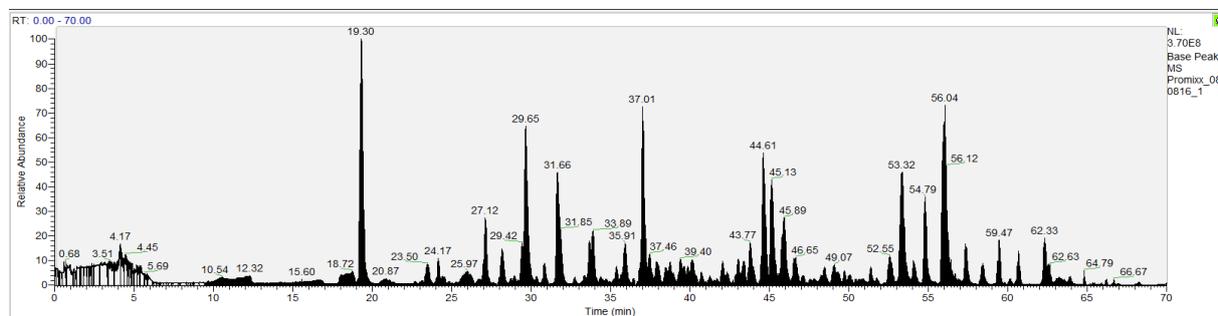


Figure 17 : Total ion chromatogramme (TIC) d'un Promix.

### 2.3.4 Software

Les données brutes sont obtenues à l'aide du logiciel Xcalibur. En ce qui concerne la recherche de bases de données et le traitement de données, différents programmes sont utilisés. Ces derniers sont récapitulés dans le tableau 11.

Tableau 11: Liste des différents programmes utilisé pour le traitement de données.

Nom	Logos	Programme	Utilisation
Xcalibur		Thermo (version 2.2, 2011.08.11)	Contrôle de l'instrument et analyses de données
Uniprot		<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>	Base de données de séquences de protéines
MaxQuant		Version 1.5.3.8	Traitement des données du spectromètre de masse
R		Rx64 version 3.2.3	Traitement de données et d'analyses statistiques
String		Version 10.0	Réseau de protéines

## 3. Résultats et Discussion

### 3.1 Système de contrôle

Au total, quelques 75 échantillons ont été analysés avec une méthode de 170 minutes ce qui donne environ 9 jours d'analyses au LC-MS/MS. Il est primordial de déterminer si l'appareil est resté stable durant toute la durée des analyses afin de pouvoir comparer les échantillons passés au jour 1 avec ceux du jour 9 de manière correcte. Pour ce faire, une solution Promix a été passée au début, entre chaque série de 15 échantillons et à la fin de l'analyse. Le but étant de comparer l'aspect, le temps de rétention et l'intensité des pics de chaque Promix pour confirmer que l'analyse ait été constante durant 9 jours. La figure 18 représente les différents chromatogrammes des 6 Promix. Les pics les plus intenses présents dans le chromatogramme du Promix 1 sont retrouvés facilement et avec des temps de rétention similaires dans les autres chromatogrammes. Une différence est observable concernant l'intensité. Cette différence est surtout marquée entre le chromatogramme du Promix 2 et les autres. Comme il est difficile d'émettre une hypothèse sur l'aspect visuel des chromatogrammes, l'intensité a été comparée et discutée plus bas.

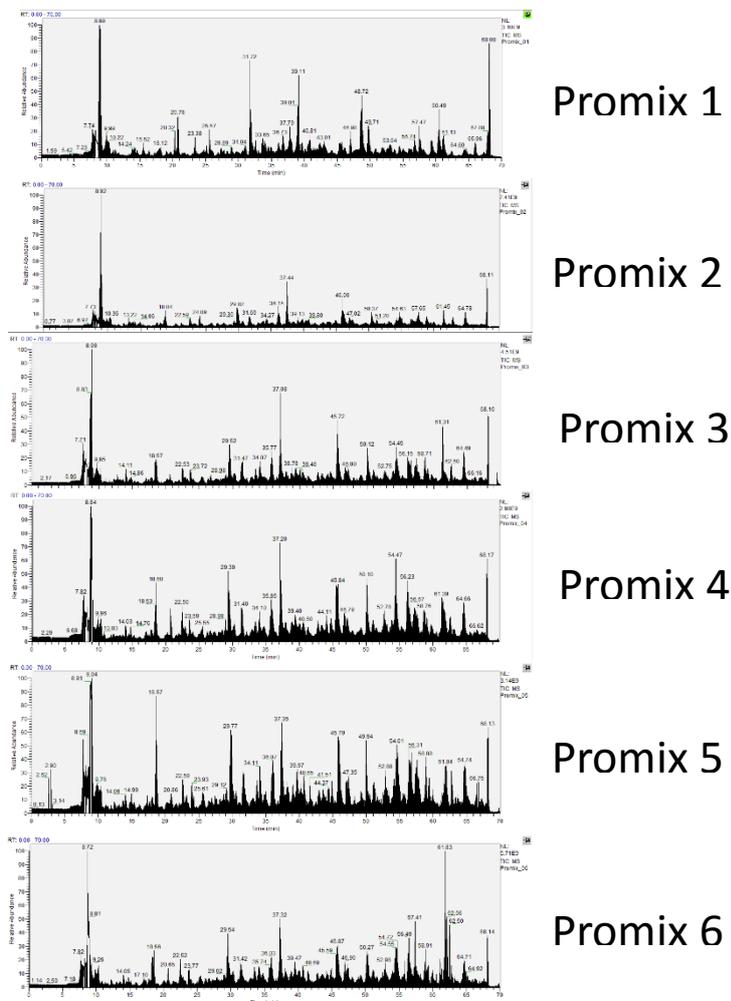


Figure 18 : Spectre LC des 6 Promix généré durant tout le long de l'analyse.

La largeur des pics de chaque Promix a été comparée. La figure 19 représente le résultat obtenu. Comme observé, la médiane, qui donne un renseignement sur le milieu de la série, est constante entre chaque analyse de Promix et se trouve à environ 0,5 minutes. La médiane est la ligne noire présente dans les différentes boîtes à moustaches. Ceci montre que la largeur des pics reste constante tout au long de l'analyse.

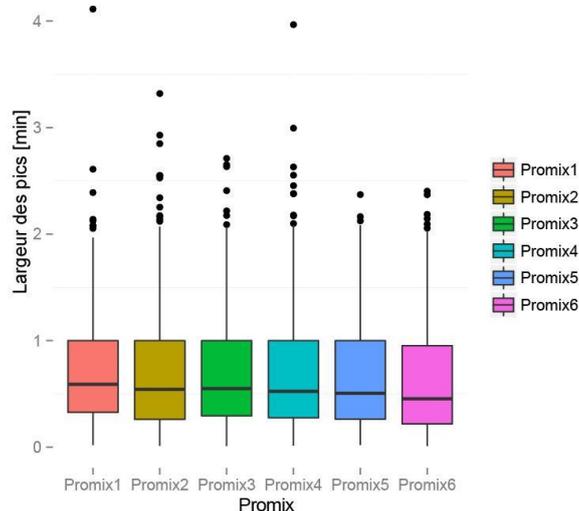


Figure 19 : Comparaison de la largeur des pics dans les différents Promix.

Un autre aspect intéressant est de comparer la précision en masse. Elle est exprimée en ppm (partie par million) et est importante pour déterminer et identifier les molécules. La bonne résolution est un critère important pour avoir une bonne précision. Le graphique présent à la figure 20 représente les boîtes à moustaches des différents Promix par rapport à leur erreur sur la masse. Comme observé, la médiane est constante entre chaque boîte à moustaches. Ceci prouve que l'appareil est resté stable durant la totalité du temps d'analyse.

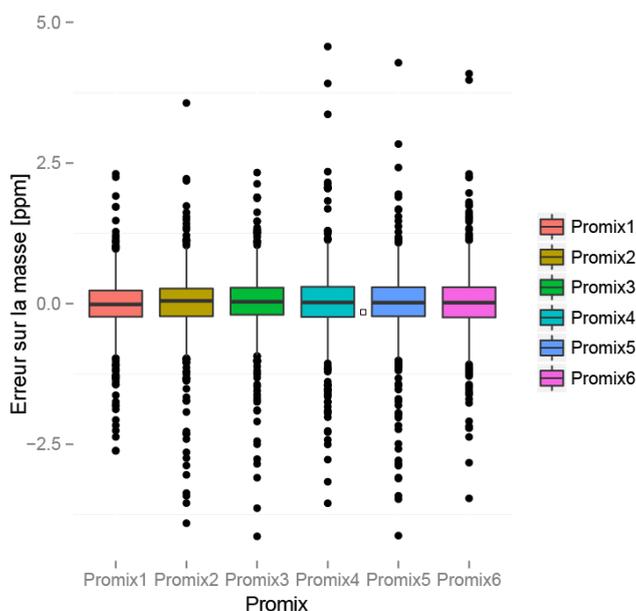


Figure 20 : Comparaison de l'erreur sur la masse des différents Promix.

Pour finir, l'intensité des différents pics sur chaque chromatogramme a été étudiée. Pour ce faire, chaque Promix a été comparé avec le Promix 1 (ratio intensité Promix/intensité Promix 1). Un histogramme a ensuite été créé afin de comparer les différents Promix entre eux. La figure 21 montre le résultat obtenu. L'intensité des trois premiers chromatogrammes (Promix 2, 3 et 4) est relativement similaire. En effet, la pointe de l'histogramme se rapproche de 0. En ce qui concerne l'intensité des deux derniers Promix (Promix 5 et 6), elle est plus élevée. Comme observé sur le graphique ci-dessous, la pointe des courbes grises et jaunes sont décalées vers la droite. Une autre observation est que l'intensité globale a diminué pratiquement d'un facteur deux entre le Promix 1 et 6. Ceci peut être dû à la solution de Promix qui est restée la même durant toute l'analyse.

L'intensité est le paramètre comparé qui varie le plus mais n'est pas primordiale à l'analyse des résultats. En effet, si un peptide est identifié dans plusieurs échantillons différents, c'est surtout grâce à son temps de rétention et sa masse qui sont similaires. Après avoir comparé les différents chromatogrammes des Promix, il est donc possible de dire que l'analyse était stable du début à la fin.

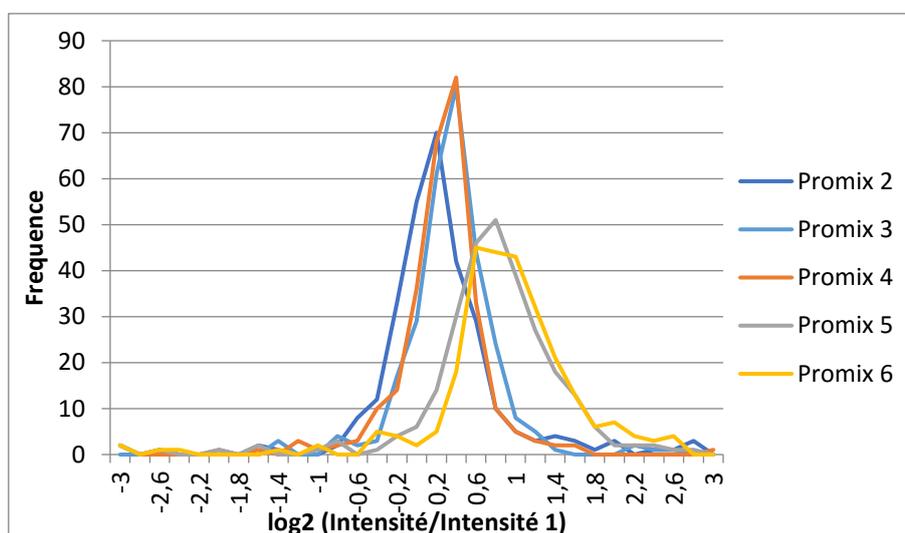


Figure 21 : Histogramme de comparaison de l'intensité des pics des 5 chromatogrammes des promix.

### 3.2 Statistiques

Lors de l'analyse, 441'270 spectres MS/MS ont été générés. Sur ces spectres, 163'270 ont pu être identifiés. A l'aide de MaxQuant, un logiciel qui traduit les spectres à l'aide d'une base de donnée, il a été possible d'identifier 13'616 peptides qui viennent de quelques 2'656 protéines. Ces données ont été générées avec un FDR < 1% (False discovery rate). Le FDR signifie la proportion attendue d'erreur de type I (rejeter l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie) parmi les hypothèses rejetées. La figure 22 montre de manière schématique la quantité de peptides non phosphorylés (0p), une fois phosphorylé (1p), deux fois phosphorylés (2p) et plus de deux fois phosphorylés (> 2p) présents sur la quantité totale de peptides uniques obtenus.

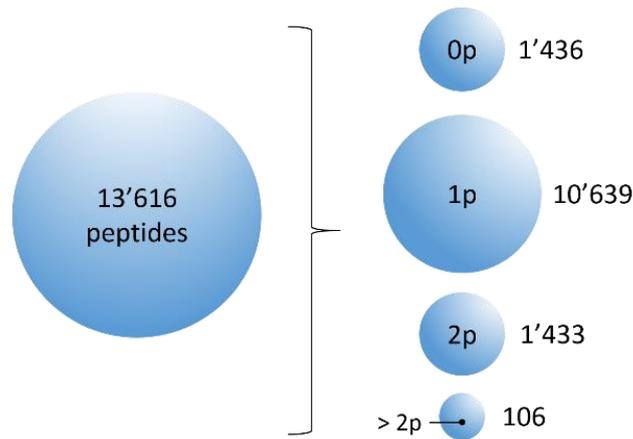


Figure 22 : Nombre de peptides non-phosphorylé, phosphorylé une fois, deux fois ou plus de deux fois présents dans la quantité totale de peptides uniques obtenus.

Un intervalle de confiance de 0,75 a été appliqué sur la totalité des peptides. En effet, il est important de choisir un intervalle de confiance élevé afin de garder seulement les résultats qui s'approchent le plus de la valeur réelle. Comme le montre la figure 23, 9'038 peptides ayant des sites de phosphorylation (1p, 2p et > 2p) sont retenus, ayant un intervalle de confiance plus élevée que 0,75. A partir de ces peptides, il est possible de déterminer sur quel acide aminé se trouve le site de phosphorylation. La littérature dit que dans une cellule eucaryote il y a en proportion une tyrosine phosphorylée pour 10 thréonines phosphorylées et 100 résidus de sérine phosphorylées [41]. Les résultats montrent qu'il y a effectivement, plus de site de phosphorylation présents sur des sérines (pS), 81 % que sur des thréonines (pT), 19 % ou encore des tyrosines (pY) avec seulement 0,4 %.

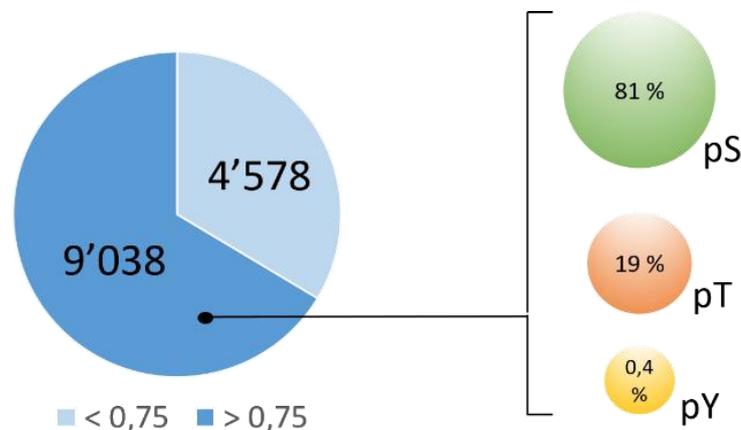


Figure 23: Proportions de peptides obtenus avec un intervalle de confiance de 0,75 et pourcentages de sites de phosphorylations présent sur les acides aminés sérines, thréonines et tyrosines.

Il est intéressant de savoir le nombre de peptides présents dans chaque fraction de temps. La figure 24 représente ce nombre de peptides. Les couleurs correspondent aux nombres de sites de phosphorylation présents sur les différents peptides. Comme vu précédemment, il y a une plus grande quantité de peptides phosphorylé une fois (vert). La ligne noire au niveau des 4'000 correspond à la moyenne sur tous les points de temps. Comme le T0 est le premier échantillon analysé, il a été pris deux fois afin d'avoir un échantillon test pour être certain que l'analyse se déroule correctement. Le T0 correspond au temps avant le traitement des cellules avec les différentes drogues. Comme le montre la figure 24, il y a une différence entre le nombre de peptides obtenus entre les répliques 1 et 2.

Tout au long de la procédure, une multitude d'étapes s'enchaîne (lyse, digestion, purification, enrichissement, fractionnement,...) ce qui amène forcément à des pertes d'échantillons. Travailler avec des substances biologiques n'est pas simple et les résultats ne peuvent jamais être garantis à 100 %. Ceci peut donc expliquer la différence entre ces deux répliques. De plus, la stabilité de l'électro spray peut également jouer un rôle dans cette différence. Il est toujours difficile de garder le spray très stable.

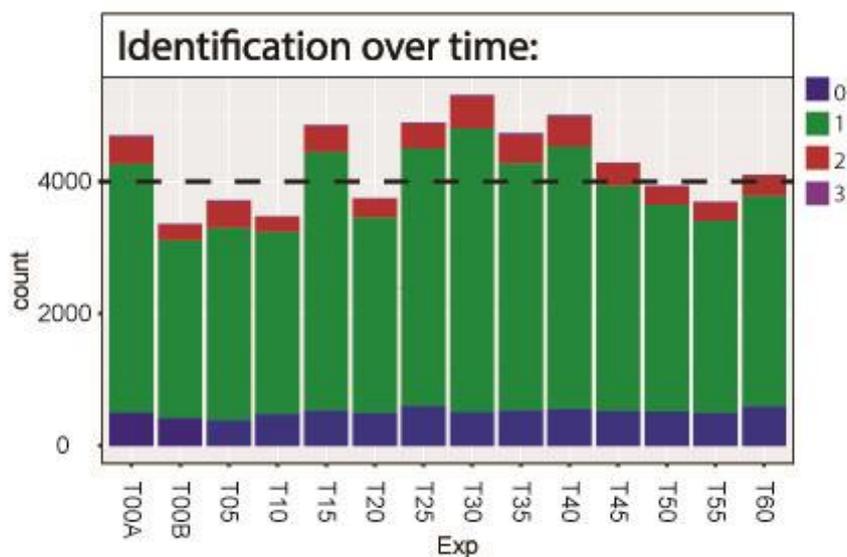


Figure 24 : Nombre de peptides obtenus pour chaque fraction de temps. Les couleurs indiquent le nombre de site de phosphorylation présent sur les différents peptides.

En ce qui concerne les peptides non-phosphorylé (bleu), le graphique de la figure 24 montre que leur nombre est constant dans chaque fraction de temps. Avec ce graphique, il est difficile de déjà constater une différence par rapport à la cinétique. Le nombre de peptides phosphorylé n'influence donc pas de manière significative la cinétique.

Une autre chose intéressante est de déterminer si la digestion avec la trypsine a bien fonctionné. Comme le montre le tableau 12, un grand pourcentage de peptides n'a pas correctement été coupé. En effet, 52 % des peptides ont encore une lysine ou une arginine dont la trypsine n'a pas coupé spécifiquement au C-terminus. 19 % ont quant à eux deux lysines ou arginines dans leur séquence. La trypsine clive, en effet, le C-terminus des résidus arginine et lysine mais pas lorsque ces résidus sont directement suivis par un résidu proline. De plus, la vraie spécificité d'une protéase est susceptible d'être influencée par d'autres résidus se trouvant à proximité mais également par la structure tertiaire de la protéine et les conditions expérimentales [42]. Ceci pourrait expliquer ce pourcentage élevé. La cinétique n'est pas influencée par le fait que les peptides ne sont pas correctement coupés, le logiciel aura juste plus de difficulté à en déterminer la séquence.

Tableau 12 : Nombres de peptides non-coupés.

	[%]
<b>Miscleaved peptides 1</b>	52
<b>Miscleaved peptides 2</b>	19

Concernant l'enrichissement des phosphopeptides, un taux de phosphorylation de 89 % est obtenu. Le résultat de 89 % indique que l'enrichissement à bien fonctionné.

La dernière étape est le fractionnement par chromatographie ionique (SCX) des échantillons. Cette étape permet de diminuer la complexité de l'échantillon avant l'analyse LC-MS/MS. De plus, dans le cas de cette expérience, la méthode SILAC est utilisée ce qui correspond à trois fois plus de pics sur le spectre. Il est donc important de procéder à un fractionnement de l'échantillon. Afin de déterminer si le fractionnement était correctement réalisé, plusieurs aspects peuvent être discutés. Tout d'abord, il est intéressant de savoir si un peptide est présent dans une seule fraction ou s'il est retrouvé dans plusieurs fractions. La figure 25 montre la fréquence d'apparition des peptides. Comme il y a 6 fractions (FT, 1, 2, 3, 4 et 5) un peptide peut donc être présent dans les 6 fractions ce qui montrerait que le fractionnement n'est pas optimal. Comme observé sur la figure 25, un grand nombre de peptides apparaissent uniquement dans une fraction. Ceci montre que le fractionnement à bien fonctionné. Le nombre de peptides par fréquence diminue de manière exponentielle ce qui prouve une nouvelle fois que le fractionnement était une réussite.

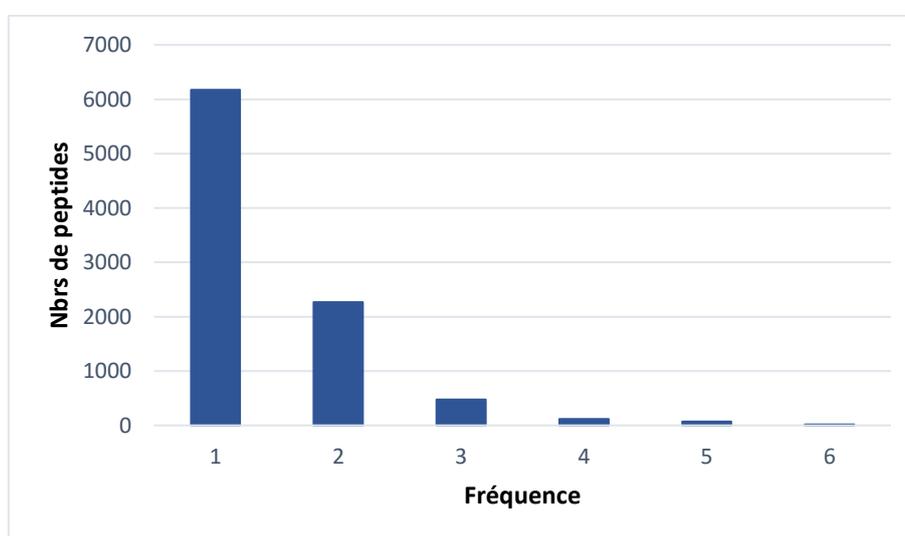


Figure 185 : Graphique représentant la fréquence d'apparition des peptides dans les différentes fractions du fractionnement SCX.

Deuxièmement, il est intéressant de voir comment sont répartis dans les différentes fractions les peptides selon leur nombre de sites de phosphorylation. Le graphique présent à la figure 26 montre le résultat obtenu. La fraction avec le numéro 0 correspond au FT, il est donc tout à fait normal d'y trouver une faible quantité de peptides. En effet, tous les peptides doivent normalement être retenus sur la colonne. La fraction 1 correspond à une élution avec une concentration de NaCl de 30 mM. Les peptides présents dans la fraction 2 sont eux, élués avec une solution de NaCl 50 mM, de même avec la fraction 3 (80 mM), la fraction 4 (120 mM) et la fraction 5 (500 mM).

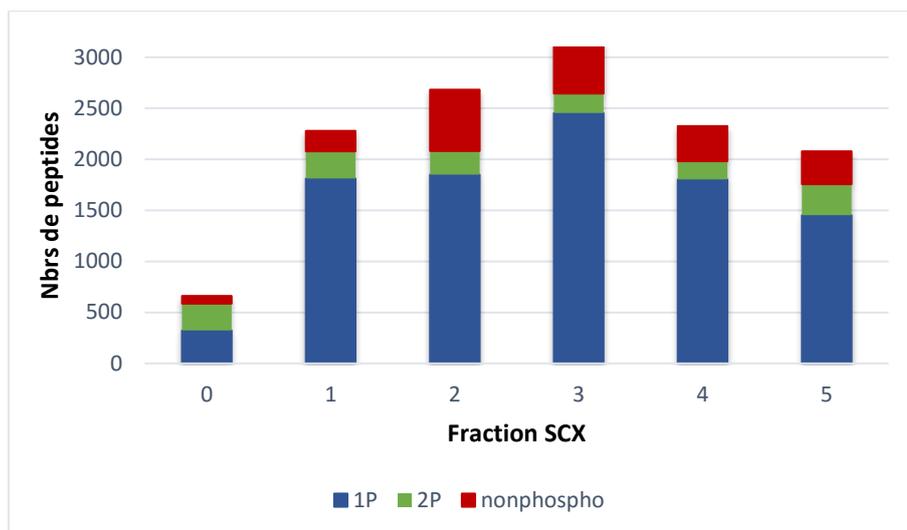


Figure 26 : Répartition des peptides dans les diverses fractions selon leur nombre de site de phosphorylation (1p, 2p et 0p).

Finalement, il est très intéressant de voir la répartition des peptides selon leurs différentes charges. Pour calculer la charge d'un peptide, il suffit d'appliquer la formule suivante :

$$\text{Charge} = 1 + 1 * (\# \text{Lys, Arg et His}) - 1 * (\# \text{PhosphoGroups}) - 1 * (\# \text{N terminus acétylation})$$

Ce qui est attendu c'est que les peptides chargés positivement sortent en dernier. En effet, il s'agit ici d'une chromatographie d'échange cationique fort, la phase stationnaire est donc chargée négativement. Les cations (charge positive) vont donc rester plus longtemps sur la colonne et être élués avec une concentration de sel plus élevée. Comme le montre le graphique de la figure 27, les peptides chargés négativement (-1) et non chargés (0) sont retrouvés seulement dans la fraction 0 (FT) et la fraction 1. Ce résultat est logique, la phase stationnaire étant chargée négativement, les peptides négatifs n'y restent pas accrochés. Le même phénomène est visible avec les peptides fortement chargé (+3 et +4) qui sont élués principalement dans les deux dernières fractions. Concernant les peptides chargés une fois (+1) ils sont élués dans les fractions 1 et 2. Pour finir, les peptides chargés deux fois positivement (+2) sont les peptides les plus abondants et se retrouvent principalement dans les fractions 2, 3 et 4. La fraction 3 contient le plus de peptides. Cette observation est également visible sur la figure 5. En conclusion, le fractionnement à l'aide de la chromatographie d'échange cationique fort à bien marché, le résultat obtenu correspond au résultat attendu.

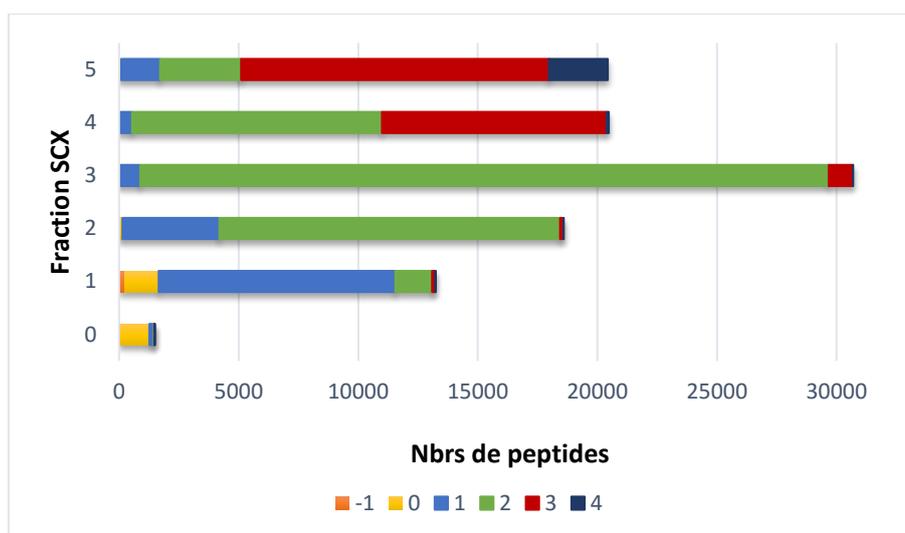


Figure 27 : Répartition des peptides dans les diverses fractions selon leur charge.

### 3.3 Cinétique

La figure 28 représente le changement global de la phosphorylation dans le temps. Sur l'axe des « y » se trouve le IQR, l'écart interquartile. Cet écart est la mesure de la dispersion qui s'obtient en faisant la différence entre le 3<sup>ème</sup> et le 1<sup>er</sup> quartile. Plus précisément, le 1<sup>er</sup> quartile, Q1, est la plus petite valeur de la série telle qu'au moins 25 % des données soient inférieures ou égales à Q1. De même pour le 3<sup>ème</sup> quartile, Q3, qui est la plus petite valeur de la série telle qu'au moins 75 % des données soient inférieures ou égales à Q3. En résumé, plus l'IQR est grand, plus les données sont dispersées autour de la médiane et plus l'IQR est petit, plus les données sont proches de la médiane.

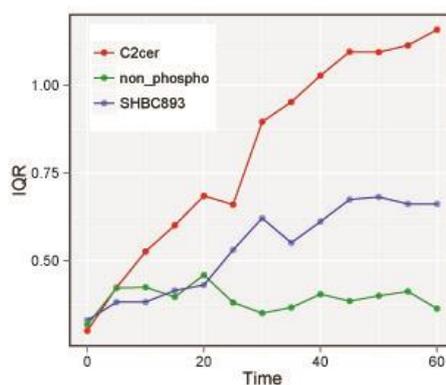


Figure 19 : Changement global de la phosphorylation dans le temps.

La courbe verte correspond aux peptides non-phosphorylés, lesquels ne changent pas d'abondance suite au traitement. Cette courbe reste constante et à un IQR très petit ce qui est logique vu qu'aucun changement de phosphorylation n'est visible, la valeur est donc proche de la médiane. En ce qui concerne les deux traitements, la courbe correspondant à la C2-ceramide montre que cette dernière a une grande influence sur la phosphorylation. En effet, comme observé sur le graphique, la C2-ceramide influence presque deux fois plus la phosphorylation que le composé SH-BC-893. Il est donc possible de conclure que le composé SH-BC-893 a un impact global plus ciblé sur la phosphorylation que la C2-ceramide.

### 3.4 Sites de phosphorylation dynamiques

Les outils informatiques servent au traitement des données. Les données brutes obtenues à l'aide du MS/MS sont analysées à l'aide du logiciel MaxQuant. Ce dernier permet, à l'aide d'une base de données Uniprot, d'identifier les protéines correspondantes aux différents peptides obtenus. De plus, MaxQuant permet d'identifier les différents profils cinétiques observés sur les sites de phosphorylation. La figure 29 montre de manière schématisée les différentes étapes de l'analyse des données. L'analyse cinétique a été faite sur 14 points de temps. Pour qu'un profil cinétique soit comptabilisé, il faut mesurer les variations d'abondance pour au moins 8 des 14 points échantillonnés. Ceci correspond à la première étape observée sur la figure 29. 3'628 profils cinétiques ont été trouvés lors de cette étape. La deuxième étape consiste à trouver une fonction polynomiale appropriée afin de représenter les changements cinétiques. Pour ce faire, les profils cinétiques réels sont étudiés. Les mêmes valeurs, mais prises dans un ordre aléatoire sont également étudiées. Cette étape permet de définir un  $R^2$  le plus grand possible avec un FDR de 1 %. En effet, si la valeur aléatoire donne un  $R^2$  supérieur à celui des valeurs vraies, le modèle ne sera pas sélectionné. Une fois les profils déterminés, les données peuvent être analysées avec le logiciel GO (DAVID), NetworkKIN, IPA, etc...

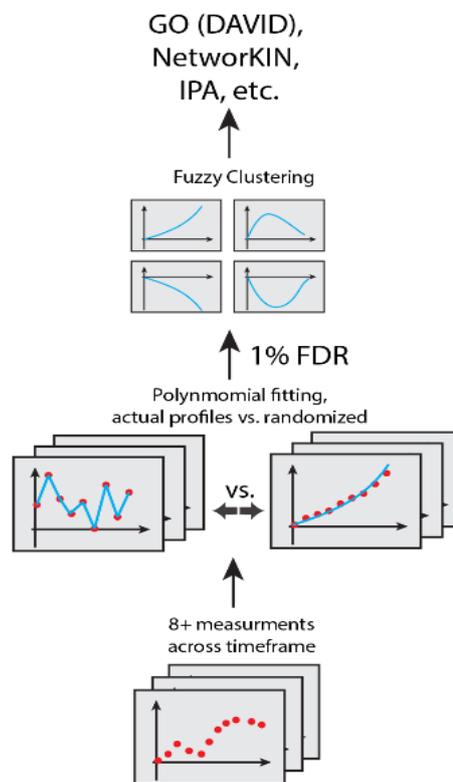


Figure 20 : Différentes étapes pour procéder à l'analyse des données.

Les profils dynamiques des différents sites de phosphorylation sont déterminés. La figure 30 représente les 7 différents polynômes trouvés permettant l'analyse des données. Les données en rouges représentent les RSQ ( $R^2$ ) pour les valeurs réelles, celles en bleues les RSQ pour les valeurs aléatoires. Il est important de choisir une cinétique avec des  $R^2$  le plus différents possibles entre les valeurs vraies et aléatoires. Il faut également que le  $R^2$  soit le plus grand possible. Le graphique représentant le polynôme numéro 7 à un  $R^2$  très bon mais les données aléatoire chevauchent sur toute la longueur les données réelles ce qui n'est pas optimal. Il faut donc trouver un compromis entre les deux paramètres.

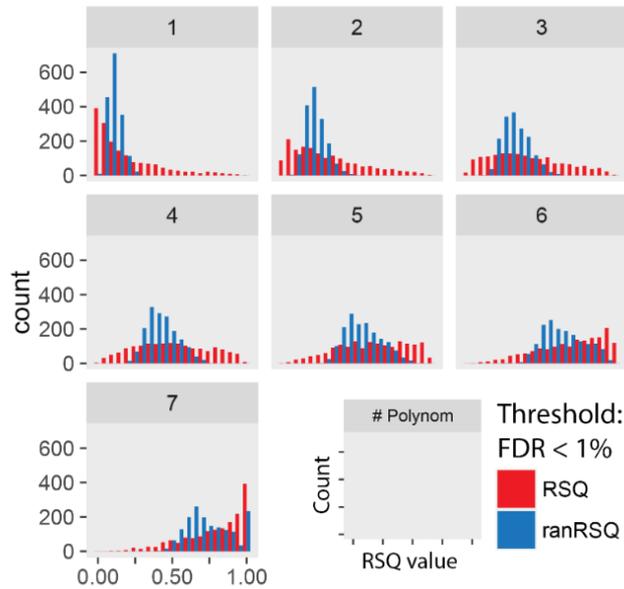


Figure 21 : Interprétation graphique des différents  $R^2$  de 7 polynômes différents pour, en rouge les valeurs réelles et en bleu, les valeurs aléatoires.

Une fois le bon polynôme déterminé, les différents profils cinétiques peuvent être construits. La figure 31 représente les trois différents profils trouvés pour la SH-BC-893 et pour la C2-ceramide. Les chiffres sur les graphiques indiquent le nombre de profils correspondant à chaque regroupement. Comme observé, les deux drogues présentent des profils similaires. En effet, les deux molécules ont des fonctions identiques sur beaucoup de points. Ce qui est intéressant, c'est les différences présentes entre les deux traitements. En effet, une des différences est le fait que la SH-BC-893 permet la vacuolation tandis que la C2-ceramide ne le permet pas. C'est pourquoi les différences concernant les cinétiques sont plus précisément étudiées. L'axe des y représente le  $\log_2$  du FC (Fold change), qui correspond au ratio drogue/contrôle.

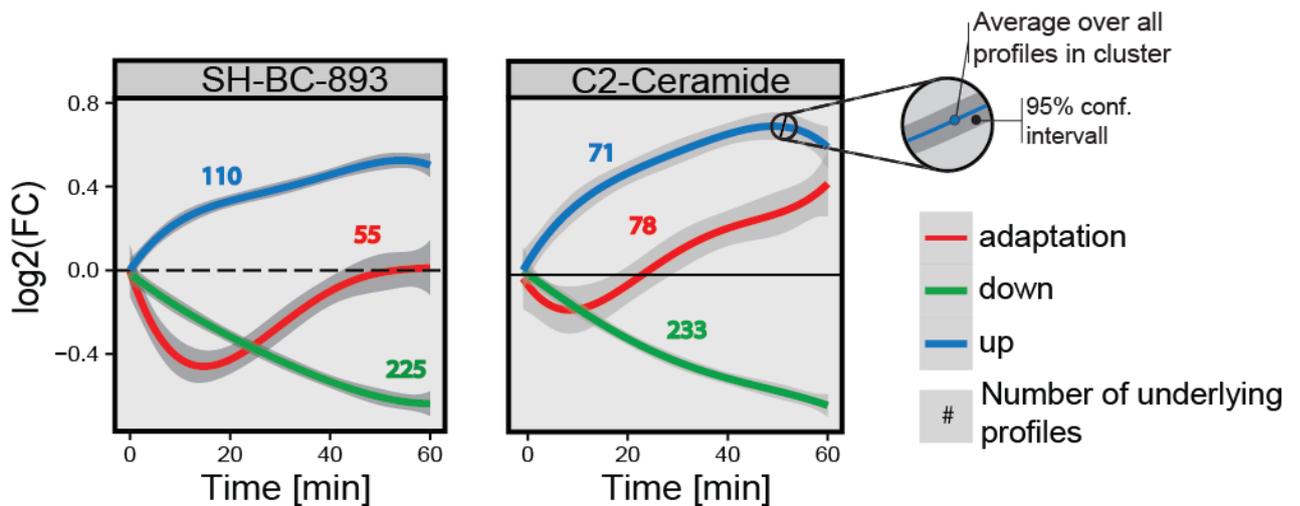


Figure 22 : Différents profils cinétique de phosphorylation pour les deux traitements étudiés.

### 3.5 SH-BC-893 vs C2-ceramide

Un des objectifs de ce travail est de comparer les deux traitements entre eux. La figure 32 montre la corrélation entre les deux drogues utilisées, soit la SH-BC-893 et la C2-ceramide. Les deux traitements ont une bonne corrélation ce qui suggère une grande similitude dans leur mécanisme d'action. Les sites de phosphorylation qui se comportent différemment sont susceptibles d'être impliqués dans le mécanisme de la vacuolation. Le 0,7 correspond à la pente de la droite.

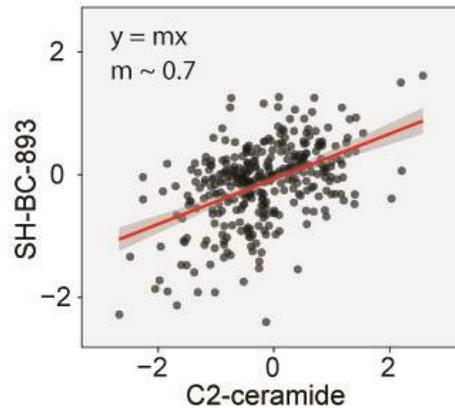


Figure 23 : Corrélation entre la C2-ceramide et la SH-BC-893.

La figure 33 montre la comparaison des cinétiques des deux différents traitements utilisés durant l'analyse. Comme observé sur la figure 33, les deux drogues ont des comportements similaires. Cette figure rappelle la figure 31, en effet, il s'agit juste d'une représentation différente. Il est plus facile ici de voir les similitudes de cinétiques entre les différentes drogues.

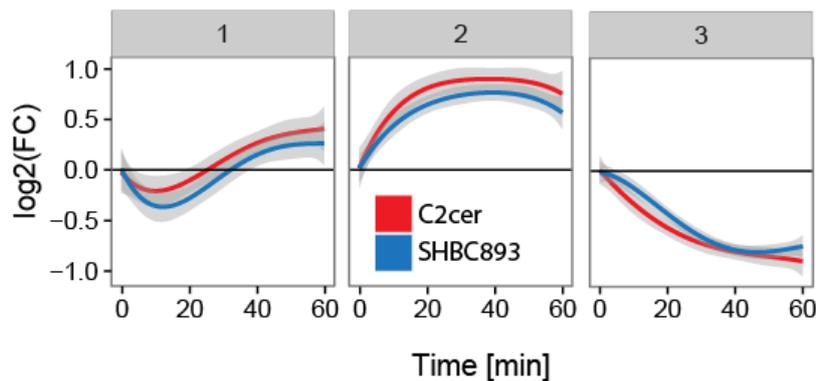


Figure 33 : Comparaison des cinétiques de la C2-ceramide et de la SH-BC-893.

Il est intéressant de comparer les différents sites de phosphorylation trouvés sur les protéines traitées avec la C2-ceramide et la SH-BC-893. Un diagramme de Venn illustre cette comparaison (figure 34). Sur la partie de gauche il est possible d'observer un important recouvrement entre les sites de phosphorylation de la SH-BC-893 et de la C2-ceramide. Ce résultat prouve encore une fois que les deux différents traitements se comportent de manière très similaire. Ensuite, sur les 240 sites de phosphorylation en commun, un classement a été fait en séparant les profils qui réagissent de manière bidirectionnelle de ceux qui le font de manière unidirectionnelle.

Ce qui est intéressant c'est les 51 profils qui réagissent de manière bidirectionnelle. Afin de s'intéresser au mécanisme de vacuolation, il est nécessaire de chercher les sites de phosphorylation qui réagissent de manière différente vu qu'un des traitements permet la vacuolation et le second ne la permet pas. Une autre partie intéressante est l'analyse des 290 sites de phosphorylation déterminés lors du traitement avec la SH-BC-893. En effet, un des objectifs est également de comprendre quel est le mécanisme de réaction du SH-BC-893. Chaque protéine ayant des sites de phosphorylation qui évolue avec le temps sont donc étudiées séparément afin de déterminer lesquelles jouent un rôle dans le mécanisme de vacuolation. Pour que la recherche soit plus simple, il existe des logiciels bio-informatiques tels que le programme STRING ou GO David.

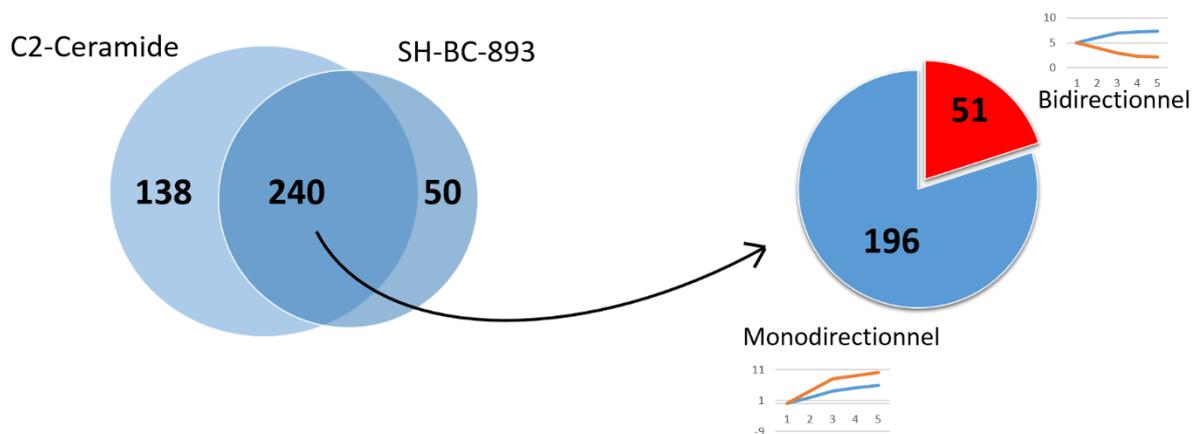


Figure 34 : Diagramme de Venn concernant la C2-ceramide et la SH-BC-893. Nombre de sites de phosphorylation ayant des réactions bidirectionnel et monodirectionnel.

Les sites de phosphorylation qui sont intéressants sont les 51 qui ont des comportements bidirectionnels mais aussi les 50 uniques au SH-BC-893. En effet, seul la SH-BC-893 permet la vacuolation. Une protéine intéressante présentant un comportement bidirectionnel est la Slc9a3r1. Le S285 signifie que le site de phosphorylation se trouve sur la sérine en position 285 de la protéine. Les transporteurs SLC (solute carrier) font partie d'une famille de plus de 300 protéines liées à la membrane cellulaire. Ces protéines facilitent le transport d'une large gamme de substrats à travers les membranes biologiques. Elles jouent un rôle important dans les processus d'absorption cellulaire de substances nutritives [43]. La figure 35 représente le profil cinétique dans le temps de la protéine Slc9a3r1 en réponse aux deux traitements.

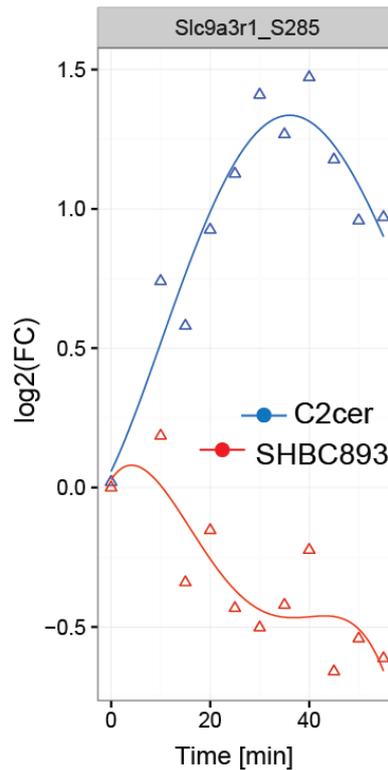


Figure 35 : Comportement bidirectionnel de la phosphorylation en réaction aux différents traitements.

Le programme STRING a également été utilisé afin de déterminer le réseau de protéines. Lors de la recherche sur STRING, il est possible de trouver les protéines jouant un rôle dans un processus biologique choisi. Les processus de formation de vésicules et de transport ont donc été choisis. Les protéines de couleur rouge sur la figure 36 jouent un rôle dans le mécanisme de transport. Une protéine s'avère très intéressante. Il s'agit de la protéine Fam21. En effet, elle joue un rôle dans la fusion des lysosomes et la formation des vésicules [44]. Fam21 est la plus grande sous-unité du complexe WASH (Wiskott-Aldrich syndrome protein and scar homolog). Comme le montre la figure 36, Fam21 est liée à WASH.

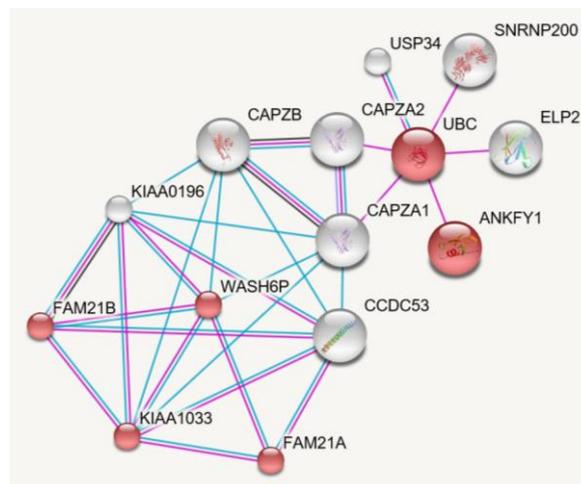


Figure 36 : Réseau de protéines déterminé par le programme STRING [45].

En regardant plus précisément le profil cinétique dans le temps de Fam21 (Figure 37), la phosphorylation se comporte de manière opposée selon le traitement utilisé. Le S533 signifie que le site de phosphorylation se situe sur la sérine en position 533. L'axe des x du graphique représente le temps en minutes.

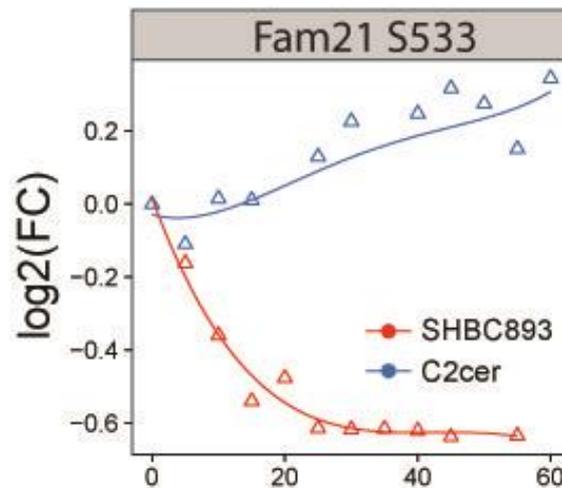


Figure 37 : Comportement bidirectionnel de la phosphorylation en réaction aux différents traitements.

WASH est un important régulateur du transport des vésicules. En générant de l'actine à la surface des vésicules intracellulaires, WASH est capable de réguler directement le tri des endosomes et leurs maturations mais également la formation spatiale et temporelle des réseaux d'actine [46]. Sans actine, les lysosomes ne vont jamais recycler la v-ATPase (vacuole type adénosine triphosphate). La v-ATPase est la pompe à proton chargée d'établir et de maintenir un pH acide à l'intérieur des lysosomes. La sous-unité Fam21 a comme rôle de recycler WASH des endosomes. La figure 38 représente un schéma du rôle de WASH. La partie A de la figure 38 montre qu'après la formation des phagosomes et autophagosomes, la v-ATPase et les hydrolases sont rejetées. Ces dernières vont acidifier et digérer les protéines cargo (protéines qui vont être transportées dans les vésicules). Le complexe WASH intervient en générant de l'actine et va recycler la v-ATPase. Après neutralisation, la protéine Fam21 va permettre de recycler WASH et éliminer la couche d'actine avant l'exocytose. Durant cette étape, les hydrolases vont également être recyclées. La partie B de la figure 38 montre le même processus mais en absence de WASH. La v-ATPase ne va pas être recyclée et les lysosomes vont rester acides [47]. La protéine Fam21 joue donc un rôle dans le processus de fusion lysosomales et de formation de vésicules.

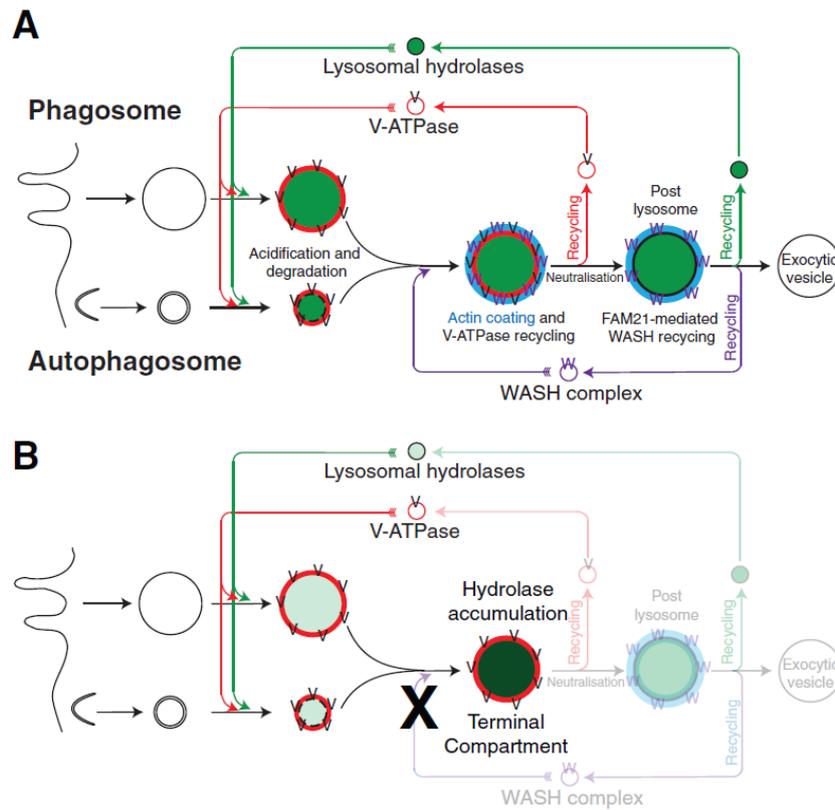


Figure 38 : Schéma représentant le rôle du complexe WASH et de la protéine Fam21 dans la formation de vacuole [47].

En étudiant les protéines ayant un changement significatif avec le traitement SH-BC-893, quelques-unes se sont révélées intéressantes. En effet, elles pourraient permettre de comprendre mieux le mode de fonctionnement du SH-BC-893. Une d'entre elle est la protéine Pak2. Cette dernière, dont la cinétique est représentée à la figure 39, régule l'organisation des filaments d'actine. Elle joue également un rôle dans la régulation du cytosquelette, sur la mobilité cellulaire, dans la progression du cycle cellulaire et aussi dans le mécanisme d'apoptose ou de prolifération [48].

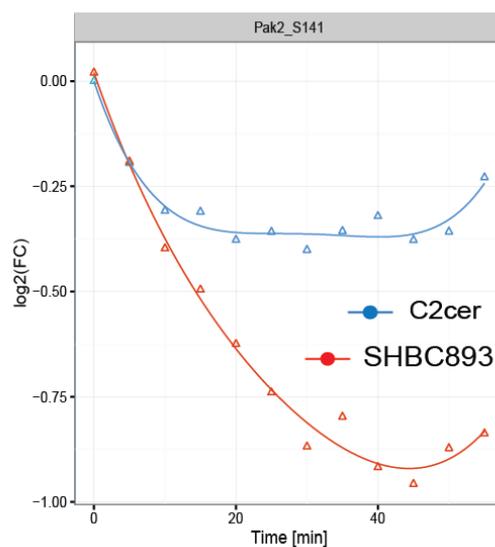


Figure 39 : Comportement cinétique de la protéine Pak2.

## 4. Perspectives

En ce qui concerne la suite, il sera intéressant d'identifier des protéines répondant aux différents traitements. Cette information est très utile dans la découverte de médicaments ainsi que dans la compréhension des mécanismes de réponse au niveau de la protéine. Il est possible d'identifier les protéines répondant à un stimulus particulier et de déterminer celles dont l'expression change le plus. Cette expérience peut être réalisée sur les cellules FL5.12 après incubation avec la C2-ceramide et le SH-BC-893. Il serait intéressant de déterminer le profil d'expression des protéines entre 0 et 4h après traitement. Les échantillons seront digérés par la Trypsine et les peptides obtenus seront purifiés avant d'être analysés directement avec le spectromètre de masse [49].

Une seconde expérience intéressante à réaliser est de déterminer les interactions protéines-ligand à l'aide de la méthode DARTS (*Drug Affinity Responsive Target Stability*). Cette méthode permet de savoir quelle unité de PP2A réagit avec les différents traitements. De plus, elle permet d'identifier d'éventuels effets secondaires liés aux différentes drogues. Un grand nombre de méthodes ont été développées afin d'étudier les interactions protéines-ligand. La chromatographie d'affinité est la technique la plus largement utilisée [50]. Cette dernière comporte des limitations comme le fait de dériver chaque molécule. En effet, beaucoup de composés ne peuvent être modifiés sans perdre leur liaison spécifique ou leur affinité. De plus, les méthodes génétique/génomique sont limitées à une classe particulière de composés dont il n'est pas toujours possible d'identifier la cible directe [51]. La méthode DARTS a été développée afin de contrer ces limitations. L'idée est que la drogue étudiée va interagir de manière spécifique avec certaines protéines de la cellule. Ces interactions permettent la formation de liaisons entre la drogue et la protéine ce qui rend cette dernière résistante aux protéases [52]. DARTS a l'avantage de ne pas nécessiter de modification de la structure chimique de la drogue et n'influence pas le mécanisme d'action de celle-ci [53]. La figure 40 montre d'une manière schématisée la différence entre la chromatographie d'affinité et la méthode DARTS.

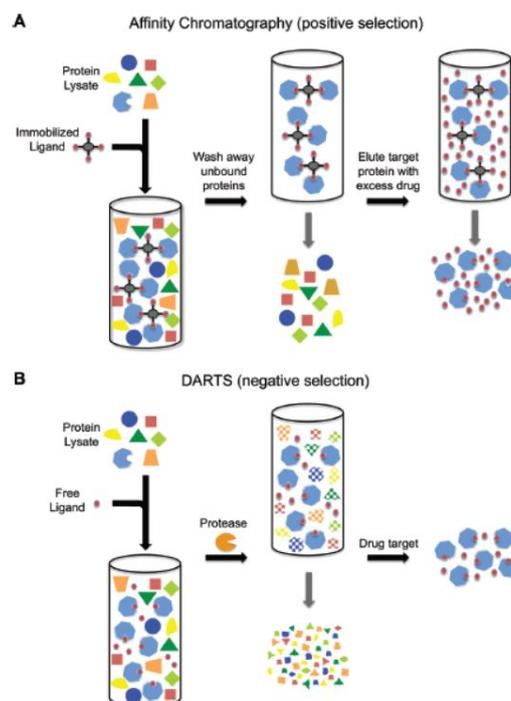


Figure 40 : Comparaison entre la chromatographie d'affinité et la méthode DARTS [52].

En ce qui concerne la chromatographie d'affinité, le lysat est incubé avec un ligand qui va concentrer les protéines cibles en les immobilisant. Les protéines non immobilisées vont être éluées à l'aide de plusieurs lavements. Pour finir, les protéines cibles vont être récupérées à l'aide d'un excès de drogue. C'est une méthode dite de sélection positive car la colonne utilisée se concentre sur les protéines cibles et n'interagit pas avec les autres protéines. La technique DARTS, quant à elle, est basée sur une sélection dite négative. En effet, la protéase ne s'attaque pas au complexe drogue-protéine mais uniquement aux protéines non ciblées par la drogue. Le lysat est donc incubé avec la drogue pour ensuite être traité avec une protéase. Les protéines non intéressantes sont digérées par l'enzyme et éluées [53]. Pour finir les protéines non digérées sont récupérées et chargées sur un gel SDS-PAGE.

## 5. Conclusion

---

Afin de comprendre le mécanisme par lequel l'activation de PP2A permet d'augmenter l'endocytose et réguler l'activité d'autres substrats, la cinétique de phosphorylation des protéines a été étudiée. Deux traitements différents, soit la C2-ceramide et la SH-BC-893 ont été admis à des cellules hématopoïétiques de souris. Le suivi d'analyse a permis de vérifier que l'enrichissement des phosphopeptides et le fractionnement par chromatographie d'échange cationique fort ont été une réussite. L'analyse des données MS/MS a permis d'identifier 50 sites de phosphorylation unique à la SH-BC-893. Les sites de phosphorylation en commun entre les deux drogues ont également été analysés et 51 ont été trouvés comme ayant un comportement bidirectionnel. La recherche s'est portée sur les sites concernant la SH-BC-893 car cette molécule permet la vacuolation tandis que la C2-ceramide ne le permet pas. Il s'est avéré que la protéine Fam21, régulatrice de la formation des vacuoles et de la fusion des lysosomes, réagissait avec un comportement bidirectionnel. Cette protéine fait partie du complexe WASH qui est un important régulateur du transport vésiculaire. Identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans le transport des nutriments permet d'élucider un aspect mal connu du métabolisme avec des implications importantes pour la progression et le traitement du cancer. Cette analyse sert à comprendre comment les cellules sont affamées en étudiant les protéines ou les groupes de protéines qui présentent un changement de phosphorylation durant l'analyse cinétique. Une étape supplémentaire serait de déterminer la spécificité du traitement utilisé.

## 6. Bibliographies

---

- [1] Statistiques cancer au Canada <https://www.irc.ca/a-propos/liric-en-bref/> (07.07.2016)
- [2] Statistiques cancer en Suisse  
<http://www.bfs.admin.ch/bfs/portal/fr/index/themen/14/02/05/dos/01.html> (07.09.2016)
- [3] Elizabeth M. Selwan, Brendan T. Finicle, Seong M. Kim and Aimee L. Edinger, Attacking the supply wagons to starve cancer cells to death, FEBS Letters, 2016
- [4] Jingren Deng and Iulia M. Lazar, Proteolytic Digestion and TiO<sub>2</sub> Phosphopeptide Enrichment Microreactor for Fast MS Identification of Proteins, Department of Biological Sciences, Virginia USA
- [5] Mathieu Courcelles, Identification de nouveaux substrats des kinases Erkl1/2 par une approche bio-informatique, pharmacologique et phosphoprotéomique, Université de Montréal (2011)
- [6] Phosphorylation <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/phosphorylation.html> (30.06.2016)
- [7] Karen Leoy, Patricia de Cremoux, Anomalies moléculaires des cancers : Ciblage thérapeutique, John Libbey Eurotext, France (2013), 7-8
- [8] Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieg, Scott, Zipursky, Darnell, Biologie moléculaire de la cellule, De Boeck, Belgique (2005, 3<sup>e</sup> ed.), 85-87
- [9] Ang\_eliq N Godet, Julien Guernon, Amandine Galioot, Pierre-Barth\_el\_emy, Falanga, Jean-Herv\_e Colle, Xavier Cayla, Alphonse Garcia, La famille des protéines phosphatases PP2A. Une cible stratégique pour les virus et pour la transformation tumorale, médecine/sciences, 2011
- [10] Maria Ciccone, George A.Calin and Danilo Perrotti, From de Biology of PP2A to the PADs for Therapy of Hematologic Malignancies, Frontiers in Oncology, 2015
- [11] PP2A [http://www.nature.com/nature/journal/v445/n7123/fig\\_tab/nature05351\\_F1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v445/n7123/fig_tab/nature05351_F1.html) (9.09.2016)
- [12] Perrotti D, Neviani P, Protein phosphatase 2A (PP2A), a drugable tumor suppressor in Ph1 (+) leukemias, Cancer and Metastasis Reviews (2008), pp 159-168
- [13] Sphingolipides <http://www.erudit.org/revue/MS/2006/v22/n4/012814ar.html> (07.09.2016)
- [14] Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell, Biologie moléculaire de la cellule, Deboeck, 3<sup>e</sup> édition, Paris (2004), 745
- [15] Michael S. Perryman, Jérémie Tessier, Timothy Wiher, Heather O'Donoghue, Alison N. McCracken, Seong M. Kim, Dean G. Nguyen, Grigor S. Simitian, Matheus Viana, Susanne Rafelski, Aimee L. Edinger, Stephen Hanessian, Effects of stereochemistry, saturation, and hydrocarbon chain length on the ability of synthetic constrained azacyclic sphingolipids to trigger nutrient transporter down-regulation, vacuolation, and cell death, Elsevier, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2016
- [16] ACS Medicinal Chemistry Letters, 2013 octobre 10, 4(10)

- [17] Bin Chen, Saurabh G. Roy, Ryan J. McMonigle, Andrew Keebaugh, Alison N. McCracken, Elizabeth Selwan, Rebecca Fransson, Daniel Fallegger, Andrea Huwiler, Michael T. Kleinman, Aimee L. Edinger and Stephen Hanessian, Azacyclic FTY720 Analogues That Limit Nutrient Transporter Expression but Lack S1P Receptor Activity and Negative Chronotropic Effects Offer a Novel and Effective Strategy to Kill Cancer Cells *in Vivo*, ACS chemical biology, 2015
- [18] Ong, S. E., Foster, L. J. and Mann, M. Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics, Methods (2003), 124-130
- [19] Emadali Anouk, Gallagher-Gambarelli Maighread, Quantitative proteomics by SILAC: practicalities and perspectives for an evolving approach, MS.Médecine science, EDK France (2009)
- [20] Gronborg et al., Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach, Mol Cell Proteomics (2006), 157-171
- [21] Lamoureux F, étude protéomique des modifications phénotypiques des cellules rénales exposées aux immunosuppresseurs inhibiteurs de la calcineurine, Université de Limoges (2011)
- [22] Ong SE, Mann M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC), Nat Protoc (2006), 2650-2660
- [23] Sibylle Pfammatter, Sabrina Yakubov, Absolute SILAC for Accurate Quantitation of Proteins in Complex Mixtures Down to the Attomole Level, Université de Montréal, 2015
- [24] Méthode SILAC <http://www.m2p-egpr.ups-tlse.fr/Documents%20archives/Proteomique/3-Avanceesproteomiques2005-2006.pdf> (10.09.2016)
- [25] Méthode SILAC <http://masse-spec.fr/proteomique> (10.09.2016)
- [26] Enrichissement TiO<sub>2</sub> [http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/tio2\\_magnetic\\_beads.pdf](http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/tio2_magnetic_beads.pdf) (25.06.2016)
- [27] Laurent Miguet, Nouvelles methodologies dans l'analyse protéomique par spectrométrie de masse, Université Louis Pasteur, Strasbourg (2006)
- [28] Ficarro, S. B., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., Burke, D. J., Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*, Nature Biotechnol., 20, 301-305 (2002)
- [29] Gaëlle Bridon, Etude de la voie de signalisation de l'insuline chez la drosophile par une approche phosphoprotéomique, Université de Montréal, 2012, 37
- [30] SCX <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212968513000068> (23.08.2016)
- [31] Chan KC, Issaq HJ, Fractionation of peptides by strong cation-exchange liquid chromatography, Proteomics for Biomarker Discovery, 2013, 311-315
- [32] Sibylle Pfammatter, Identification of SUMOylation Sites using High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility (FAIMS) coupled to a Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer, HES-so, 2014
- [33] Aebersold R., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics, Nature, 422, 198-207 (2003)
- [34] Fröhlich T, Arnold G. A newcomer's guide to nano-liquid-chromatography of peptides. Methods Mol Biol, 564 (2009)
- [35] Aebersold R., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Natur Vol 422 (13 march 2003), p.198-207
- [36] Electrospray, <http://www.keywordpictures.com/keyword/electrospray/> (7.09.2016)

- [37] Thermo Fisher Scientific Inc. Product Specifications Orbitrap Elite - High-Field Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer. 2011 PS30229\_E 05/11G
- [38] Principe d'un Orbitrape <https://www.smbp.espci.fr/Qexactive.html> (24.08.2016)
- [39] Principe d'un Orbitrape <http://masse-spec.fr/orbitrap-principe-utilisations> (24.08.2016)
- [40] BCA reaction, <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html>. (15.09.2016)
- [41] Boris Macek, Ivan Mijakovic, Jesper V. Olsen, Florian Gnäd, Chanchal Kumar, Peter R. Jensen and Matthias Mann, The Serine/ Threonine/ Tyrosine Phosphoproteome of the Model Bacterium *Bacillus subtilis*, *Molecular and Cellular Proteomics*, 2007
- [42] Jennifer A. Siepen, Emma-Jayne Keevil, David Knight and Simon J. Hubbard, Prediction of Missed Cleavage Sites in Tryptic Peptides Aids Protein Identification in Proteomics, *J Proteome Res*, 2009
- [43] Lawrence Lin, Sook Wah Yee, Richard B. Kim and Kathleen M. Giacomini, SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities, *Nature Reviews Drug Discovery*, 543-560 (2015)
- [44] Laura Park, Peter A. Thomason, Tobias Zech, Jason S. King, Douwe M. Veltman, Michael Carnell, Seiji Ura, Laura M. Machesky, Robert H. Insall, Cyclical Action of the WASH Complex: FAM21 and Capping Protein Drive WASH Recycling, Not Initial Recruitment, *Developmental Cell*, Volume 24, 2013, 169-181
- [45] Analyse STING <http://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=VZZzyN4TO1Vo> (27.09.2016)
- [46] Da Jia, Timothy S. Gomez, Daniel D. Billadeau, and Michael K. Rosen, Multiple repeat elements within the FAM21 tail link the WASH actin regulatory complex to the retromer, *Molecular Biology of the Cell*, 2012
- [47] Jason S. King, Aurélie Gueho, Monica Hagedorn, Navin Gopaldass, Florence Leuba, Thierry Soldati, and Robert H. Insall, WASH is required for lysosomal recycling and efficient autophagic and phagocytic digestion, *Molecular Biology of the Cell*, 2013
- [48] Pak2 <http://www.uniprot.org/uniprot/Q13177>(13.10.2016)
- [49] Peter Kubiniok, Protein Expression analysis – a simple workflow for mammalian cells, *Protocole*, 2016
- [50] Lomenick B, Olsen RW, Huang J. Identification of direct protein targets of small molecules. *ACS Chem Biol*. 2011; 6:34–46
- [51] Futamura Y, Muroi M, Osada H. Target identification of small molecules based on chemical biology approaches. *Mol Biosyst*. 2013; 9:897–914
- [52] Identification of Direct Protein Targets of Small Molecules, Brett Lomenick, Richard W. Olsen and Jing Huang, *ACS chemical biology*, vol.6 no.1, 2010
- [53] Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) for Small Molecule Target Identification, Melody Y. Pai, Brett Lomenick, Heejun Hwang, Robert Schiestl, William McBride, Joseph A. Loo and Jing Huang, *Methodes Mol Biol*, 2015

## 7. Annexes

---

### 7.1 Protocole BCA assay

#### Measuring Protein Concentration with BCA Assay

##### **Introduction**

Measuring protein concentration is one of the often underestimated but in fact **crucial part** of almost any proteomics experiment. Knowing precise protein amount allows you to document and later reproduce your results. This protocol is to be used with BCA protein assay in a 96 well plate format. It includes 6 different dilutions for each sample (up to 7 samples could be measured on the same plate) plus BSA calibration curve consisting of 9 different concentrations.

Before going further I highly recommend to read general information on protein assays that could be downloaded from here: <http://www.piercenet.com/objects/view.cfm?type=page&ID=81B61C87-90A3-49FA-AD95-4598B4E365AE>. You also have to read BCA assay manual (<http://piercenet.com/instructions/2161296.pdf>). Both files available as a PDF in the same folder with this protocol.

##### **Materials and equipment**

- protein samples (e.g cell lysates), has to be clarified by centrifugation and do not contain substances incompatible with BCA assay (like reducing reagents, e.g. DTT)
- BCA protein assay kit (Pierce, cat #23227) including:
  - o Reagent A;
  - o Reagent C;
  - o BSA standards @ 2 mg/mL;
- 300 ul clear bottom 96 well plates (like Falcon cat #1172) with adhesive covers (like Progene cat #24-PCR-SP-S);
- plastic bath (Falcon cat #5501100);
- multichannel pipettes are preferable (5-100 ul and another one up to 200 ul);
- plate reader that is able to measure absorbance @ 562 nm;

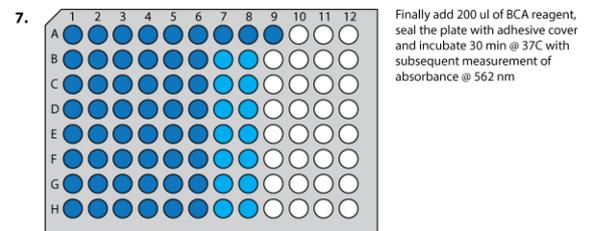
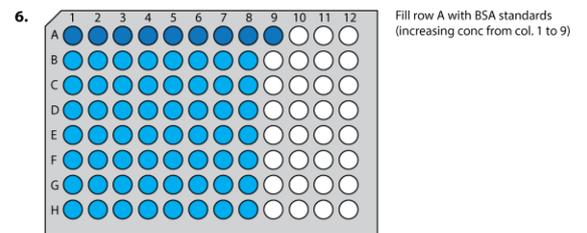
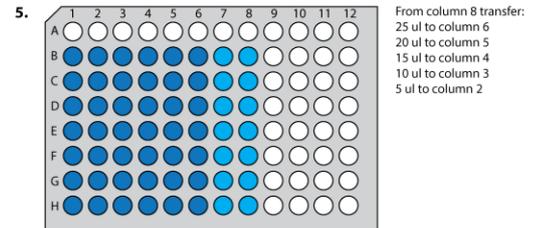
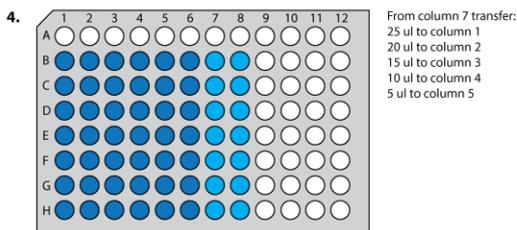
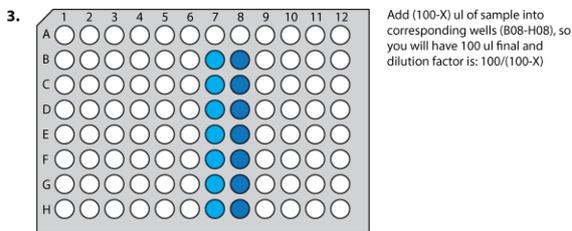
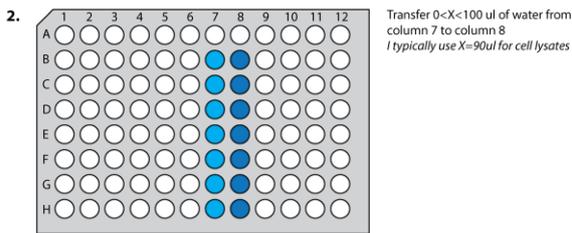
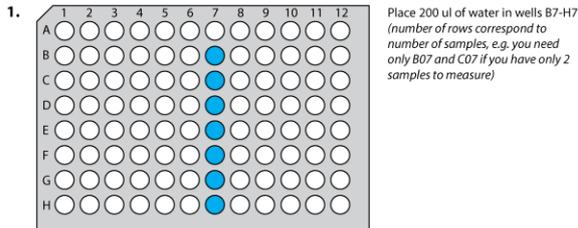
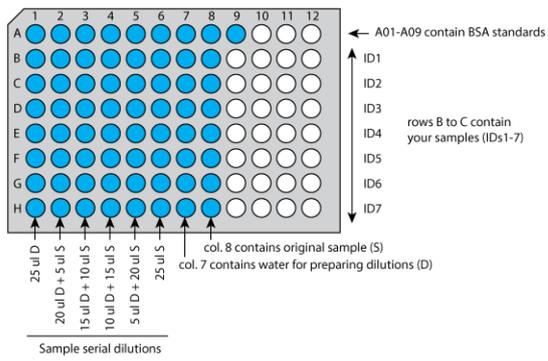
##### **Preparation of BSA standards for calibration curve**

- is described in BCA assay manual, briefly you will make 9 BSA concentrations ranging from 0 to 2 mg/mL. These standards could be stored @ 4C indefinitely long (typically I place them in 96 well plate for convenience).

##### **Protein assay (colorimetric reaction with BCA in a plate format)**

- you can measure up to 7 different samples by using one 96 well plate;
- prepare BCA reagent by mixing  $(2 \times S + 3)$  mL of BCA reagent A and  $(2 \times S + 3) / 50$  mL BCA reagent C;
- follow the graphical protocol below (it is faster and more precise to use multichannel pipette);

**Final Plate Layout**



## 7.2 Colonne capillaire

### Introduction

This protocol uses a nitrogen tank and an empty HPLC column as a reservoir.

### Protocol

#### Preparation of the precolumn

- Cut a 3-cm piece of TFE tubing (0.3 mm ID × 1.58 mm OD Sigma cat#58702).
- Cut a 5-cm piece of 50 µm ID (50 µm ID 375 µm OD Molex TSP050375).
- Place a piece of SDB membrane at the end of the piece of teflon tubing and push it inside with the piece of capillary until it is at 2-cm of the TFE tubing inlet.
- Put a piece of 150 µm ID capillary (150 µm ID 375 µm OD Molex TSP150375) at the other end of the Teflon tubing. Just slightly push it inside the Teflon tubing (3mm).
- Connect the other end of the 150 µm id capillary to the empty HPLC column with a ferrule.
- Add stationary phase (tip of a spatula) to 1 mL of ACN in an eppendorf tube. Mix thoroughly.
- Put the slurry packing in the empty HPLC column and connect it to the N<sub>2</sub> tank.
- Increase the pressure to 50-100 psi and pack the TFE tubing over 5mm. Close the N<sub>2</sub> tank and let the setup go back to ambient pressure.
- Take the HPLC column off the tank. Remove the TFE tubing from the piece of 150 µm-id capillary.
- Place a piece of SDB membrane at the free end of the piece of teflon tubing and push it inside with the piece of capillary until it reaches the stationary phase.
- The precolumn is ready to use.

#### Column packing

- Cut a 2-cm piece of TFE tubing (0.3 mm ID × 1.58 mm OD Sigma cat#58702).
- Cut a 5-cm piece of 50 µm ID (50 µm ID 375 µm OD Molex TSP050375).
- Place a piece of SDB membrane at the end of the piece of teflon tubing and push it inside with the piece of capillary until it is at 1-cm of the TFE tubing inlet.
- Put a piece of 17-cm of 150 µm ID capillary (150 µm ID 375 µm OD Molex TSP150375) at the other end of the Teflon tubing. Just push it inside the Teflon tubing until it reaches the membrane.
- Connect the other end of the 150-µm id capillary to the HPLC column.
- Put the remaining slurry packing used for the precolumn in the empty HPLC column and connect it to the N<sub>2</sub> tank.
- Increase the pressure to 100 psi. The column will start to pack. Raise the pressure slowly during the column packing (until 1000 psi) until 15 cm are packed.
- Close the N<sub>2</sub> tank and let the setup go back to ambient pressure.
- Take the column off the HPLC. You can connect the column with a piece of Teflon tubing with a piece of membrane in it to any piece of capillary connected to a load/inject valve

### 7.3 Promix

- 50 mM Ammoniumbicarbonat ex BioBasic VWR #CA99501 (395.5mg/100 mL Millipore water store at 4°C)
- Weight in a tube 1mg protein and dissolve in 1mL 50mM Ammoniumbicarbonat

mg/mL			Intensity 100ng digested
1.03	Alcohol Dehydrogenase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sigma A7011, LOT# 041M7354V	4.2E 8
1.30	Bovine Serum Albumin	BioShop ALB00150, LOT# 3927998	7.2 E8
1.18	Carbonic Anhydrase from bovine erythrocytes	Sigma C3934, LOT# 081M1626V	5.2 E7
0.99	Cytochrome c from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sigma C2436, LOT# 037K7008V	1.0 E9
1.02	Enolase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sigma E6126, LOT  097K7690V	3.6 E8
1.15	Hemoglobin human	Sigma H7379, LOT# SLBC0633V	1.3 E8
1.24	Phosphorylase b from rabbit muscle	Sigma P6635, LOT# 110M7675V	7.4 E8
1.06	Transferrin human	Sigma T3309, LOT  0L194488	3.7 E8

- Add 30 ul TCEP sol ex Thermo 77720 (LOT # 0L194488). Incubate for 30min at 37°C, 450 rpm
- Add 100ul of 5mg/mL Chloroacetamide solution [6.87mg 2-Chloroacetamide ex Sigma C0267/1.4 mL 50mM Ammoniumbicarbonat]. Incubate for 30min at 37°C, 450 rpm
- Add 20ug Trypsin (modified Trypsin ex Promega V511A LOT # 97191) dissolved in 100 ul 50mM Ammoniumbicarbonat. Incubate over night at 37°C, 450 rpm
- For 100ng peptide: 100 times dilution of the peptide solution with 0.2% Formic acid:
- 5ul peptide solution + 495ul 0.2% FA (pH ~ 3). 1000ng/ul → 10ng/ul; Injection Volume: 10 ul

Digested peptide solution		
175 ul	Alcohol Dehydrogenase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	In a 50mL Volumen flask and fill up with 0.2% FA to the mark.
105 ul	Bovine Serum Albumin	
850 ul	Carbonic Anhydrase from bovine erythrocytes	
75 ul	Cytochrome c from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
210 ul	Enolase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
575 ul	Hemoglobin human	
95 ul	Phosphorylase b from rabbit muscle	
205 ul	Transferrin human	

- 500 ul aliquots, dried with the speed vac.

## 7.4 Résultats du BCA assay

Tableau 13 : Résultats des 7 premiers échantillons pour le BCA assay.

Sample ID	Abs, norm	Protein, ug	Conc, ug/ul	AvrConc, ug/ul	STDEV, %
<b>1</b>	0,0427	0,820		<b>1,64</b>	<b>7,48</b>
	0,0887	1,818	1,82		
	0,1169	2,397	1,60		
	0,1533	3,115	1,56		
	0,1963	3,924	1,57		
<b>2</b>	0,1228	2,516		<b>2,47</b>	<b>7,51</b>
	0,1438	2,931			
	0,2021	4,031	2,69		
	0,2407	4,724	2,36		
	0,3101	5,922	2,37		
<b>3</b>	0,0596	1,194		<b>2,15</b>	<b>3,95</b>
	0,11	2,258	2,26		
	0,1579	3,203	2,14		
	0,206	4,102	2,05		
	0,2795	5,401	2,16		
<b>4</b>	0,0799	1,632		<b>2,79</b>	<b>5,29</b>
	0,148	3,013	3,01		
	0,2051	4,085	2,72		
	0,2807	5,421	2,71		
	0,3622	6,795	2,72		
<b>5</b>	0,0464	0,902	1,80	<b>1,77</b>	<b>2,72</b>
	0,0863	1,767	1,77		
	0,1254	2,568	1,71		
	0,1705	3,443	1,72		
	0,2308	4,549	1,82		
<b>6</b>	0,1002	2,057	4,11	<b>3,51</b>	<b>10,88</b>
	0,1823	3,665	3,66		
	0,2526	4,934	3,29		
	0,3359	6,357	3,18		
	0,4528	8,294	3,32		
<b>7</b>	0,0991	2,034	4,07	<b>3,65</b>	<b>10,61</b>
	0,2042	4,069	4,07		
	0,2575	5,019	3,35		
	0,3547	6,670	3,34		
	0,4669	8,528	3,41		

Tableau 14 : Résultats pour les échantillons 8 à 14 du BCA assay.

Sample ID	Abs, norm	Protein, ug	Conc, ug/ul	AvrConc, ug/ul	STDEV, %
<b>8</b>	0,0757	1,470			
	0,1491	2,835	2,84		
	0,2043	3,816	2,54	<b>2,68</b>	<b>4,75</b>
	0,285	5,228	2,61		
	0,373	6,798	2,72		
<b>9</b>	0,1062	2,049			
	0,2015	3,767			
	0,3001	5,493	3,66	<b>3,47</b>	<b>4,86</b>
	0,3661	6,672	3,34		
	0,466	8,557	3,42		
<b>10</b>	0,1313	2,512			
	0,2359	4,369	4,37		
	0,3436	6,266	4,18	<b>4,03</b>	<b>7,21</b>
	0,4122	7,524	3,76		
	0,5152	9,547	3,82		
<b>11</b>	0,0957	1,851			
	0,1889	3,545	3,54		
	0,2474	4,570	3,05	<b>3,29</b>	<b>6,18</b>
	0,3602	6,565	3,28		
	0,45	8,245	3,30		
<b>12</b>	0,0386	0,736	1,47		
	0,0674	1,309	1,31		
	0,0807	1,566	1,04	<b>1,77</b>	<b>74,35</b>
	0,097	1,876	0,94		
	0,5487	10,250	4,10		
<b>13</b>	0,1047	2,021	4,04		
	0,1753	3,304	3,30		
	0,2319	4,299	2,87	<b>3,23</b>	<b>14,92</b>
	0,3191	5,829	2,91		
	0,4164	7,603	3,04		
<b>14</b>	0,1038	2,004	4,01		
	0,197	3,688	3,69		
	0,2805	5,149	3,43	<b>3,47</b>	<b>11,37</b>
	0,328	5,987	2,99		
	0,4411	8,073	3,23		

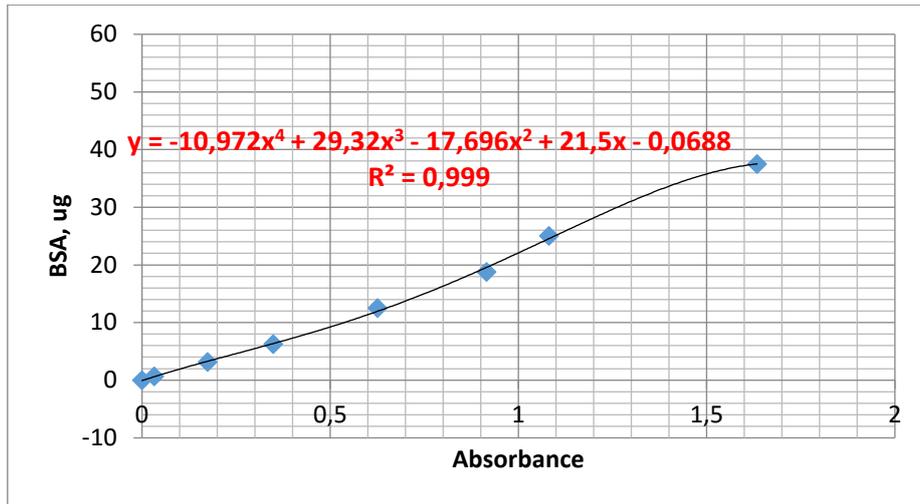


Figure 41 : Courbe de calibration I.

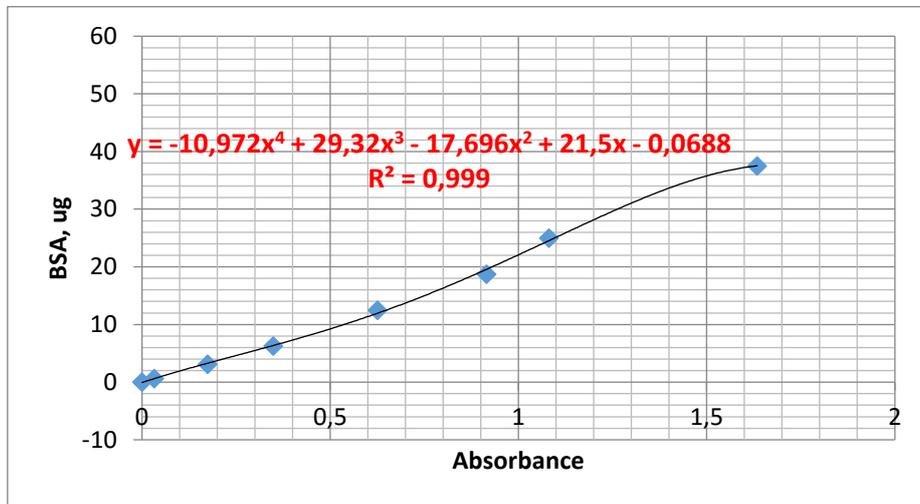


Figure 42 : Courbe de calibration II.