

Université de Montréal

**Identification de biomarqueurs protéiques prédictifs et
diagnostiques des maladies coronariennes pour une
population de souche canadienne-française**

par

Boudreau-Béland, Jonathan

Département de Sciences biomédicales, Université de Montréal/Institut de Cardiologie de
Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Sciences biomédicales
Option Générale

03 Août 2010

© Jonathan Boudreau-Béland, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Identification de biomarqueurs protéiques prédictifs et diagnostiques des maladies
coronariennes pour une population de souche canadienne-française

Présenté par :

Jonathan Boudreau-Béland

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Bruce Allen, président-rapporteur

Pierre Théroux, directeur de recherche

Arnaud Bonnefoy, codirecteur

Guy Poirier, membre du jury

Abréviations

1D : Une dimension

2D : Deux dimensions

Apo : Apolipoprotéine

CRP : Protéine C réactive

CTL : Contrôle

ECG : Électrocardiogramme

EAB : Excision automatique des bandes

EF : Fraction éluée; qui s'est lié à la colonne

FE : Fraction d'éjection

FT : Fraction déplétée; non liée par la colonne

HDL : Lipoprotéine de haute densité

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

HUPO : HUman Proteome Organisation

iCAD : Syndrome coronarien (Angine instable)

iTRAQ : « isobaric tag for relative and absolute quantitation »

IM : Infarctus du myocarde

IMC : Indice de masse corporelle

LC : Chromatographie liquide

LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée avec une spectrométrie de masse en tandem

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LDL : Lipoprotéine de basse densité

Lp : Lipoprotéine

MC : Maladie coronarienne

MCV : Maladies cardio-vasculaires

MRM : Multiple reaction monitoring

MS : Spectrométrie de masse

m/z : Ratio de la masse sur la charge

PAS : Pression artérielle systolique

PF2D : Two dimensional Protein Fractionation

RC : Rythme cardiaque

SDS-PAGE : Électrophorèse de gel de polyacrylamide du dodécyl-sulfate de sodium

SNC : Système nerveux central

TG : Tryglycérides

Résumé

Les biomarqueurs plasmatiques constituent des outils essentiels, mais rares, utilisés pour diagnostiquer les maladies, comme les maladies cardiovasculaires (MCV), et stratifier le niveau de risque associé. L'identification de nouveaux biomarqueurs plasmatiques susceptibles d'améliorer le dépistage et le suivi des MCV représente ainsi un enjeu majeur en termes d'économie et de santé publique.

Le projet vise à identifier de nouveaux biomarqueurs plasmatiques prédictifs ou diagnostiques des MCV, à déterminer le profil protéomique plasmatique de patients atteints de MCV et à développer des méthodes innovantes d'analyse d'échantillon plasmatique.

L'étude a été effectuée sur une large banque de plasma provenant de 1006 individus de souche Canadienne-Française recrutés à différents stades de la MCV et qui ont été suivis sur une période de 5 ans. Des séries de déplétions ont été réalisées afin de déléter les 14 protéines majoritaires (colonne IgY14TM) de l'échantillon avant son analyse par trois approches effectuées en parallèle: 1) Une chromatographie liquide (LC) en 2 dimensions qui fractionne les protéines selon le point isoélectrique puis selon le degré d'hydrophobicité, via le système PF2D, suivie par une chromatographie liquide couplée avec une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). 2) Une séparation classique sur gel 1D-SDS-PAGE suivie d'une LC-MS/MS; 3) Par une déplétion plus poussée du plasma avec l'utilisation en tandem avec la colonne IgY14TM d'une colonne SupermixTM permettant de déléter également les protéines de moyenne abondance, suivie d'une séparation sur gel 1D-SDS-PAGE et d'une analyse LC-MS/MS de la portion déléterée (3a) et de la portion liée à la SupermixTM (3b).

Les résultats montrent que le système PF2D permet d'identifier plusieurs profils protéiques spécifiques au groupe MCV. Sur un total de 1156 fractions (équivalent à 1172 pics protéiques pour le groupe contrôle et 926 pics pour le groupe MCV) recueillies, 15 fractions (23 pics protéiques) présentaient des différences quantitativement significatives ($p < 0,05$) entre les 2 groupes. De plus, 6 fractions (9 pics) sont uniquement présentes dans un groupe, représentant d'autres signatures protéomiques et biomarqueurs potentiellement intéressants. Les méthodes 2, 3a et 3b ont permis l'identification de 108, 125 et 91 protéines respectivement avec des chevauchements partiels (31% entre la méthode 2 et 3a, 61% entre 2 et 3b et 19% entre 3a et 3b). Les méthodes 2 et 3 ont permis l'identification de 12 protéines qui présentaient des différences quantitatives significatives entre les 2 groupes.

L'utilisation de plusieurs approches protéomiques complémentaires nous ont d'ores et déjà permis d'identifier des candidats biomarqueurs des angines instables avec récurrence d'infarctus du myocarde (IM).

Mots-clés : Biomarqueur, protéomique, plasma, maladie coronarienne, syndrome coronarien aigu, angine, 1D-SDS-PAGE, PF2D, LC-MS/MS, déplétion.

Abstract

Coronary artery disease (CAD) is a major cause of mortality in Canada. Biomarkers are precious tools to diagnosis and risk stratification, and the identification of new candidates may substantially impact on public health and health economics. Due to its complexity, the human blood proteome remains challenging to explore. Our study aims at combining various complementary methods to determine the plasma proteome signature of patients at various stages of CAD.

The total cohort includes 1006 French-Canadian, 500 controls with a normal coronary angiography, and 506 patients with documented CAD. Two pools were reconstituted to represent the extremes of our population: 1) patients with a previous myocardial infarction (MI) and a recurrent MI over a 5 years follow-up and 2) controls without CAD and no events during follow-up matched for age and sex to the CAD pool (N=18). After a depletion of highly abundant proteins, pools were analyzed using 3 different proteomic methods: i) PF2D system followed by a liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS); ii) 1D-SDS-PAGE followed by LC-MS/MS; iii) Further depletion of proteins followed by 1D-SDS-PAGE and LC-MS/MS analysis of both flow through (3a) and retained fractions (3b).

Methods 2, 3a, and 3b allowed identification of 108, 125 and 91 proteins respectively. Overlapping proteins (31% between methods 2 and 3a, 61% between 2 and 3b and 19% between 3a and 3b) showed significant absolute and relative expressions with various methods. A total of 12 proteins were significantly ($p < 0.05$) different in amounts (number of peptides identified) between the 2 pools. Analyses with the PF2D elution spectra (method 1) displayed numerous different profiles between the two groups. Over a total of 1156 fractions (control: 1172 peaks ACS: 926 peaks) generated, 370 fractions (674 peaks)

overlapped between the two pools. 15 fractions (23 peaks) differed significantly ($p < 0,05$) in amounts while some other peaks were uniquely present in one pool, representing biomarkers of potential interest.

We conclude that plasma proteome signatures are significantly modeled by the methods serving their recognition. Cost of analyses can be reduced with the PF2D method by performing a pre-selection before MS analysis. Detection of less abundant proteins can be improved by using further depletion.

Taking profit of these finding, we are now testing in our population the hypothesis that a combination of methods will sharpen our ability to detect clinically relevant proteins tailored to various clinical situations and to disease staging.

Keywords : Biomarker, proteomics, plasma, coronary artery disease, acute coronary syndrome, angina, 1D-SDS-PAGE, PF2D, LC-MS/MS, depletion, disease staging.

Table des matières

Abréviations	i
Résumé	iii
Abstract	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Remerciements	xii
Préface	1
1. Introduction	2
La maladie coronarienne	2
Le développement de la maladie coronarienne	4
L'instabilité de la plaque : Le Syndrome coronarien aigu	7
Les facteurs de risques des MCV	8
Les outils actuels permettant de suivre le développement de la MC	10
Un biomarqueur	10
Les biomarqueurs connus du SCA	11
Le prélèvement de l'échantillon	14
Les fluides biologiques	15
Les paramètres biologiques plasmatiques	18
La protéomique	20
L'histoire de la protéomique	20
Les précautions à prendre pour l'utilisation du sang pour des analyses protéomiques	21
La variation dynamique	23
La déplétion	24
La fragmentation	28
La spectrométrie de masse	30
La protéomique quantitative	31
La sélection d'une population pour une étude de biomarqueurs	34
2. Méthodologie	36
Division des groupes et des sous-groupes	36
Préparation de l'échantillon	38
Déplétion des 14 protéines majoritaires	39
Déplétion des protéines de moyennes abondances	40
1D-SDS-PAGE et excision automatique des bandes	41
2D-LC (Système PF2D)	42
Digestion en gel	43
Analyse LC-MS/MS	44
Par test ELISA	46
Par test enzymatique	46
Par immunobarvardage de type western	47

	Les analyses statistiques	47
3.	Exposé et analyse des résultats	48
	Banque de données.....	48
	Approche en gel.....	49
	Approche PF2D.....	54
	Étape de validation.....	60
4.	Discussion générale	68
	Homogénéité et différence dans la banque de patients.....	68
	La séparation des protéines.....	69
	Le nombre de protéines identifiées.....	70
	Les candidats identifiés.....	72
	Les candidats en cours de validation.....	75
	Les avantages et désavantages de chaque approche.....	75
	Les limitations de l'étude.....	76
5.	Conclusion	81
6.	Bibliographie	i
7.	Annexe -1	v

Liste des tableaux

<i>Tableau I – Facteurs de risques modifiables et non modifiables des MCV.....</i>	<i>8</i>
<i>Tableau II – Les biomarqueurs du SCA.....</i>	<i>11</i>
<i>Tableau III – Les avantages et inconvénients des différents types de fluides.....</i>	<i>15</i>
<i>Tableau IV – Paramètres biologiques, biochimiques et thérapeutiques au moment du recrutement dans l'étude pour la banque de plasmas</i>	<i>48</i>
<i>Tableau V – Protéines différentielles identifiées</i>	<i>53</i>
<i>Tableau VI - Fractions d'intérêt identifiées par la séparation PF2D</i>	<i>57</i>
<i>Tableau VII – Liste des protéines identifiées montrant des différences intéressantes entre les deux groupes pour la fraction B5</i>	<i>60</i>

Liste des figures

<i>Figure 1 – Les principales causes de décès (%) au Québec en 2007</i>	2
<i>Figure 2 – Coûts directs et indirects par catégorie de diagnostics au Canada en 1998</i>	4
<i>Figure 3 – Les différents stades de la maladie coronarienne</i>	6
<i>Figure 4 – Isolement du plasma</i>	17
<i>Figure 5 – Progression du génome au protéome</i>	19
<i>Figure 6 – Ligne du temps du progrès technologique de la protéomique</i>	21
<i>Figure 7 – Stratégie de déplétion des protéines</i>	27
<i>Figure 8 – Schéma du principe général de fonctionnement d'un spectromètre de masse</i>	30
<i>Figure 9 – Ratio entre le nombre de protéines identifiées et le nombre de peptides confirmés</i>	32
<i>Figure 10 – Récapitulation des étapes essentielles de l'analyse protéomique</i>	33
<i>Figure 11 – Les groupes constituant l'étude</i>	37
<i>Figure 12 – Schéma de la stratégie d'analyse protéomique</i>	38
<i>Figure 13 – Technique d'excision automatique des bandes</i>	41
<i>Figure 14 – 1D-SDS-PAGE après IgY14TM et après SuperMixTM</i>	49
<i>Figure 15 – Diagramme de Venn du nombre total de protéines identifiées pour chaque méthode</i>	51
<i>Figure 16 – Profil UV de 2^e dimension avant (A) et après (B) nettoyage manuel</i>	56
<i>Figure 17 – Profil de la fraction d'intérêt B5 séparée par le module de 2D</i>	58
<i>Figure 18 – Profil UV montrant des différences significatives observées par le système PF2D</i>	59
<i>Figure 19 – Concentration plasmatique d'adiponectine (individus sélectionnés)</i>	61
<i>Figure 20 – Concentration de CXCL7 (individus sélectionnés)</i>	62
<i>Figure 21 – Concentration d'adiponectine (résultats partiels de la cohorte totale)</i>	63
<i>Figure 22 – Concentration du CXCL7 (résultats partiels de la cohorte totale)</i>	64
<i>Figure 23 – Dosage de l'activité enzymatique pour la mannosyl-oligosaccharide...</i>	65
<i>Figure 24 – Immunobuvardage de type Western pour le facteur H</i>	66
<i>Figure 25 – Valeurs d'intensité de gris pour le complément facteur H</i>	67
<i>Figure 26 – Concentration d'adiponectine (dimorphisme sexuel)</i>	v

*À toutes les personnes touchées directement
ou indirectement par les maladies
cardiovasculaires...*

Remerciements

Marie-France Bouchard, Anne-Marie Poitras, Susanne Bujold, Nathalie Gendron, secrétaires et infirmières : Merci pour votre aide pour le recrutement et les prélèvements sanguins des patients, pour vos réponses à toutes mes questions, ainsi que pour la gestion des commandes.

Mes collègues étudiants et les anciens collègues étudiants du laboratoire, Catherine Martel, Saïd Matar et Judith Babin, merci pour les discussions et vos commentaires qui m'ont permis de m'améliorer.

Jacinthe Rivard et Marta Ghitescu, techniciennes de laboratoire : Un merci spécial à ces deux grandes dames pour m'avoir accompagné, soutenu et beaucoup aidé dans la réalisation des différents projets dans lesquels j'ai été impliqué. Un merci spécial à Jacinthe, pour le tri des échantillons ainsi que pour sa grande générosité et à Marta pour son aide avec les validations des candidats ainsi que pour son écoute et ses précieux conseils!

Philippe Comtois, PhD : Merci pour le logiciel « maison » d'analyse de données.

Pascal Maurice, PhD : Un grand merci à ce chercheur passionné et dévoué qui a su me transmettre sa passion et ses connaissances pour que je puisse mener à bien ce projet.

Arnaud Bonnefoy, PhD et Co-directeur : Merci de m'avoir dirigé vers les voies de la réussite. Merci de m'avoir soutenu pour réaliser et finir les projets amorcés.

Dr. Pierre Thérout, MD et directeur : Merci de m'avoir accepté dans votre laboratoire et de m'avoir fait confiance tout au long de la réalisation du projet. Merci pour votre support et la transmission de votre savoir de renommée mondiale! Ça été un honneur de travailler à vos côtés!

Finalement, un merci spécial à l'équipe de la plate-forme de protéomique du Centre d'innovation de l'université McGill et de Génome Québec pour leur contribution dans le projet. Merci donc à Sylvie Laboissière, Line Roy et Marcos DiFalco et Nathalie Hamel.

Préface

Les MCV affectent un très grand nombre d'individus chaque année au Canada et à travers le monde (1,29 million en 2005 au Canada et 17,1 millions à travers le monde selon l'Organisation mondiale de la santé, OMS) faisant de cette pathologie une cause majeure d'hospitalisation et de décès. Afin de contrer ce fléau, la recherche et le développement travaillent conjointement avec la clinique à l'élaboration de meilleurs traitements. Statistiquement parlant, au cours des vingt-cinq dernières années, le taux de mortalité des MCV a diminué d'environ de moitié reflétant le progrès qui a été réalisé dans ce domaine (*fig. 1*). Malgré tout, un nombre considérable de personnes continue d'être affecté et de mourir de causes cardiovasculaires montrant la nécessité de compléter les traitements innovateurs actuels avec de nouvelles méthodes pour tenter de diminuer davantage l'incidence et les répercussions de cette pathologie. Par exemple, la détection de la pathologie plus tôt dans son développement permettrait d'implanter un traitement préventif qui pourrait favoriser les chances de renverser le développement de la pathologie et les impacts négatifs qui y sont reliés ainsi que de suivre le développement de la pathologie et ainsi de pouvoir choisir la bonne stratégie thérapeutique à utiliser pour chaque patient. Une diminution à ce niveau pourrait permettre de libérer le système de la santé d'un lourd fardeau. L'étude présentée dans ce mémoire tente d'utiliser l'historique médical des individus afin de déceler certains marqueurs biologiques diagnostiques de différents stades de MCV. C'est le processus nécessaire à la recherche et l'identification de ces biomarqueurs qui fera l'objet de ce mémoire.

1.Introduction

1.1.1. La maladie coronarienne : toujours un fardeau pour le système de la santé

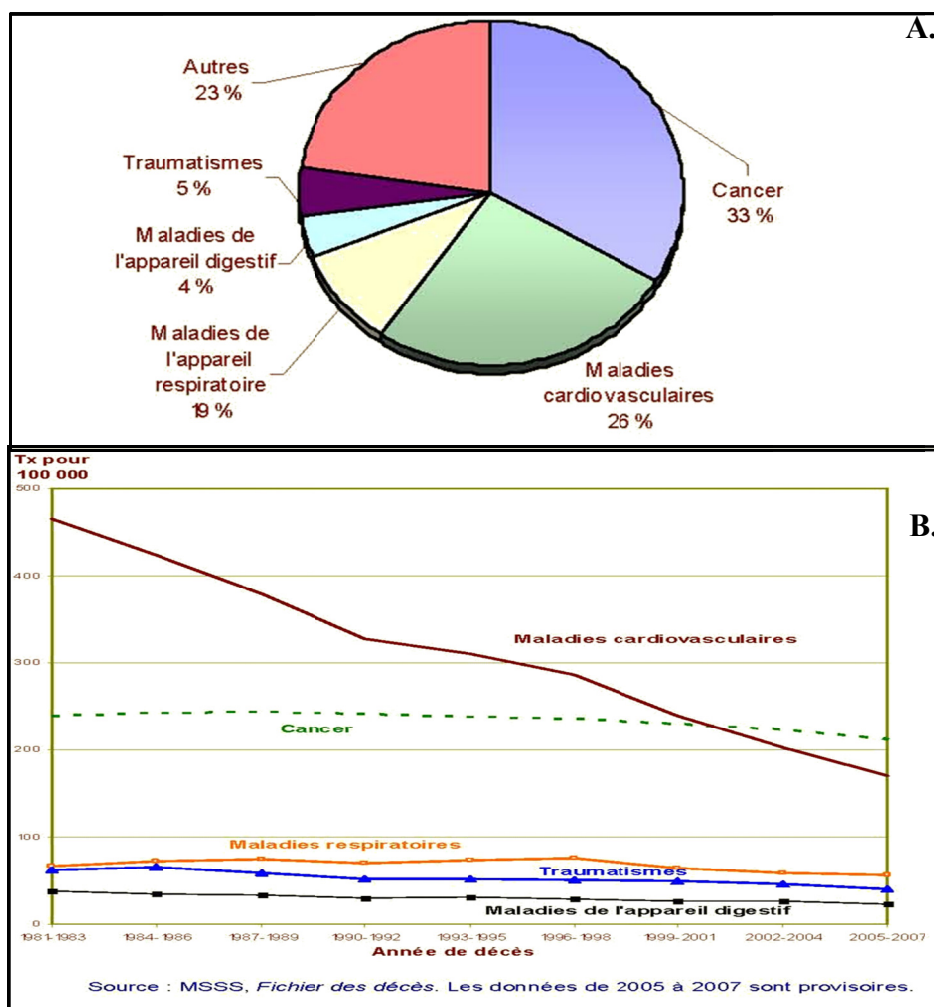


Figure 1 – Les principales causes de décès (%) au Québec en 2007

A) Représente les causes majeures de décès et montre que les MCV sont maintenant au 2^e rang, derrière le cancer comme la cause la plus meurtrière au Québec. B) Représente le taux de mortalité par 100 000 habitants pour les principales causes de décès au Québec de 1981-1983 à 2005-2007 (MSSS, Fichiers des décès). Le nombre de décès relié aux MCV est en constante diminution depuis 25 ans.

La maladie coronarienne (MC) est toujours une cause importante de mort prématurée, d'hospitalisation et de maladie invalidante au Québec, au Canada et aux États-Unis malgré une diminution constante du nombre de décès depuis 25 ans (*fig.1*). La connaissance de plusieurs facteurs de risque et son incorporation dans la culture de la population plus jeune; pas encore atteinte de MC est donc primordial afin de continuer à diminuer les répercussions des MC dans le futur. La performance des récents traitements jumelée avec la forte campagne de prévention dans le domaine vasculaire a fort probablement contribué à diminuer le nombre de décès. En effet, cette baisse du taux de décès n'est pas corrélée avec une baisse de l'incidence de MC dans la population, au contraire même, celle-ci a plutôt tendance à augmenter. En 2005, il y a eu 1,29 million de Canadiens atteints de MCV (725 000 hommes et 565 000 femmes), ce qui correspond à une hausse de 380 000 patients en comparaison avec 1994. Ainsi, il y a de plus en plus de gens touchés par les MCV, mais de moins en moins en meurent. Il existe également une différence dans l'augmentation du nombre de patients atteints quant à son statut socio-économique. Toujours en comparaison avec 1994, en 2005 il y a eu une augmentation de 27% de cas dans la classe la plus basse, de 37% dans la classe moyenne-basse de 12% dans la classe moyenne-haute et de 6% dans la classe supérieure (Flanagan, 2009). Cela suggère qu'il n'est pas donné à tous de bien se protéger contre la maladie et que des efforts doivent continuer d'être faits pour rendre les différentes options abordables pour tous. Cela montre également que malgré l'amélioration des traitements actuels, beaucoup d'individus continuent d'être affectés par la MC reflétant un besoin de compléter les nouveaux traitements innovateurs avec de nouvelles méthodes de détection de la pathologie. Une détection plus précoce pourrait permettre un meilleur contrôle du développement de la pathologie libérant le système de la santé d'un lourd fardeau. Le coût de la maladie au Canada en 1998 a été de 159,4 milliards de dollars, dont 18,5 milliards (11,6% du coût total de la maladie) attribués aux MCV, représentant la catégorie la plus onéreuse pour le système de la santé au Canada (*fig.2*).

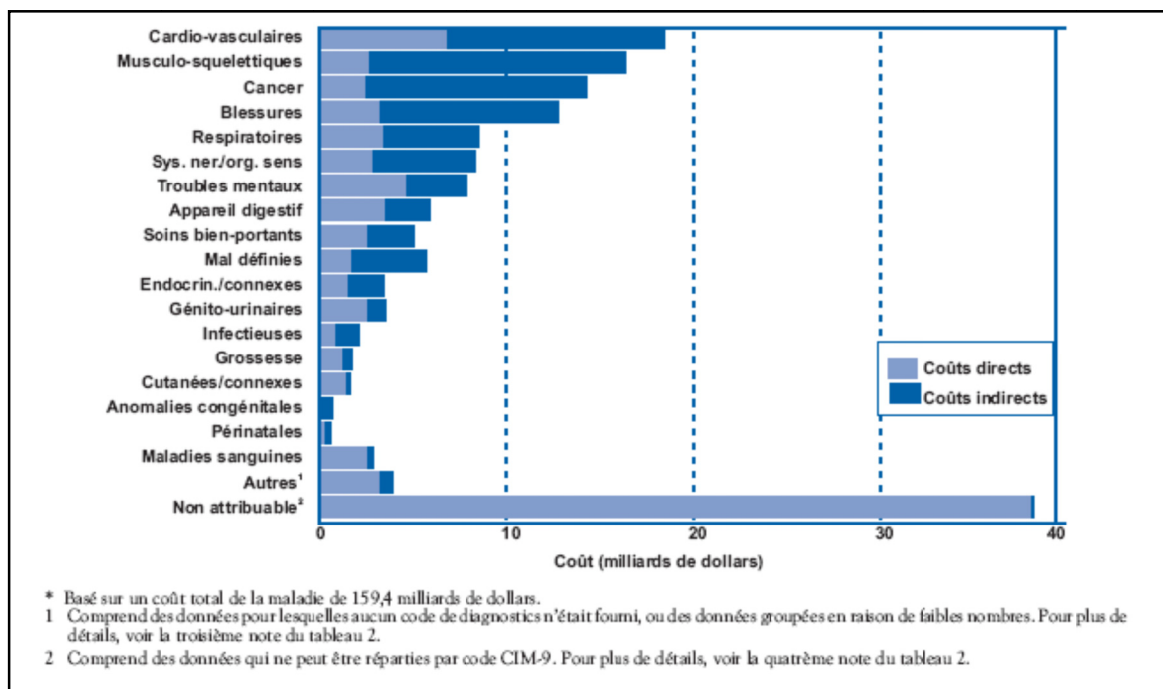


Figure 2 – Coûts directs et indirects par catégorie de diagnostics au Canada en 1998

La figure montre le coût qui est directement relié à la catégorie et les coûts indirects, c'est-à-dire qui en découlent (FEMC, 1998).

1.1.2. Le développement de la MC

La MC est initiée par des lésions au niveau des parois des vaisseaux qui nourrissent le cœur. Ces lésions déclenchent un processus de remodelage et d'athérosclérose qui entraîne l'épaississement de la paroi du vaisseau et une diminution du flux sanguin vers le cœur. Ainsi, la MC est avant tout une maladie de l'endothélium. Cet endothélium vasculaire est sujet à être endommagé via un nombre important de possibilités, comme les forces hémodynamiques, le stress oxydatif et les modifications se produisant au niveau de certaines protéines.

Cette dysfonction endothéliale est tout d'abord marquée par une augmentation de l'expression à leur surface de molécules d'adhésion vasculaire (VCAM-1), de molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM-1), ainsi que de molécules de type sélectines qui participent au recrutement de monocytes et de neutrophiles. Suit ensuite l'implication des chemokines comme les protéines monocytes chemoattractantes (MCP-1) qui permettent la transmigration des cellules inflammatoires dans l'espace sous-endothélial. Communément à cette transmigration, il y a le facteur stimulant de colonie de macrophages (MCSF) qui contribue à différencier les monocytes en macrophages. Ces derniers captent les lipoprotéines à faible densité (LDLs) et se transforment alors en cellules spumeuses. L'accumulation de ces cellules spumeuses est un élément clé dans le développement de l'athérosclérose. Il s'ensuit un processus d'amplification, car les monocytes sécrètent des cytokines, comme l'interleukin-1 (IL-1) et l'interleukin-6 (IL-6), ce qui attire davantage de cellules inflammatoires et résulte en une augmentation de la capture de LDLs dans l'espace sous-endothélial. Ces dernières cytokines stimulent également la prolifération de cellules musculaires lisses et le développement d'une couche fibreuse de collagène qui vient recouvrir et ainsi stabiliser la plaque. Par contre, d'autres molécules, comme l'interféron gamma ($\text{INF-}\gamma$) sécrété par les cellules T activées ou les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sécrétées par les macrophages activés vont dégrader le collagène fragilisant la couche fibreuse et la rendant plus susceptible de se rompre. (Zakynthinos, 2009). C'est ce processus de formation de la plaque (athérosclérose) qui définit les différents stades de la maladie coronarienne (*fig.3*). L'athérosclérose peut être asymptomatique durant une longue période, mais la maladie peut progresser selon différentes manifestations cliniques; soit des symptômes stables ou instables, comme le syndrome coronarien aigu (SCA).

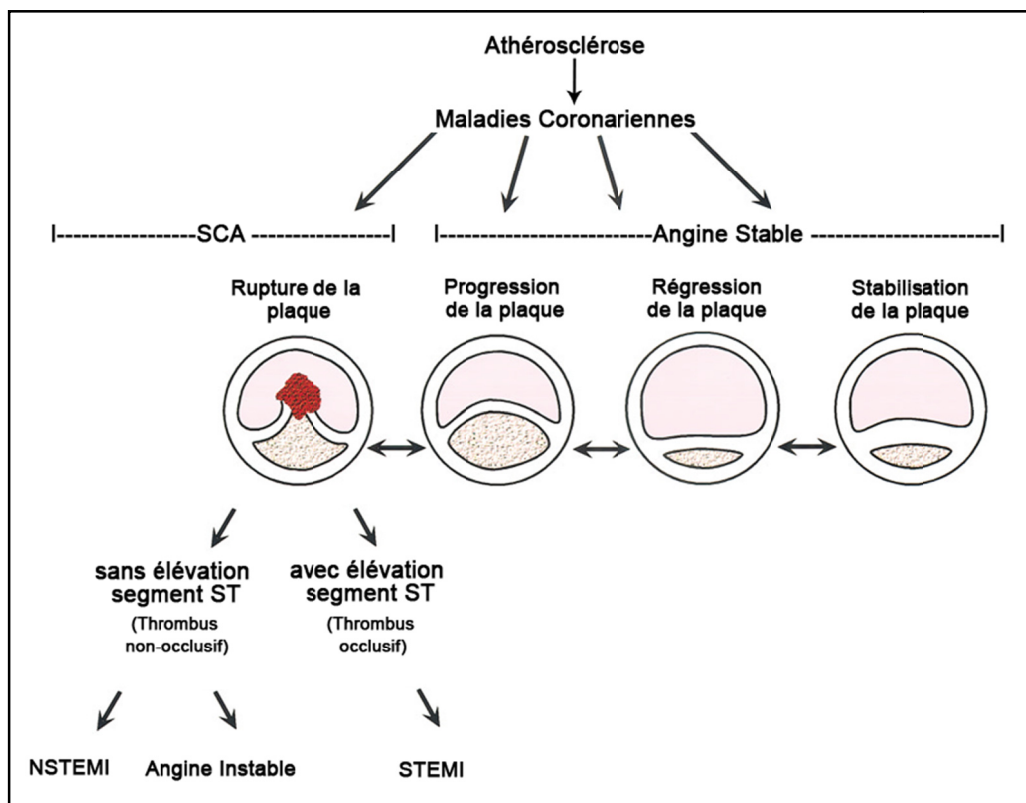


Figure 3 – Les différents stades de la maladie coronarienne
(Modifiée de Granada, 2004)

Avec le temps et des conditions favorables au développement de la plaque, celle-ci va s'épaissir et devenir de plus en plus dure. Le développement de cette plaque se fait souvent de façon asymptomatique, mais crée éventuellement un obstacle de plus en plus important au flux sanguin; ce qui favorise davantage son développement. L'obstruction (ou la sténose) de plus en plus importante peut alors se manifester par de l'angine de poitrine et des douleurs à l'effort.

1.1.3. L'instabilité de la plaque : Le Syndrome Coronarien Aigu

Lorsque la plaque est plutôt mince et constituée d'une majorité de lipides, de macrophages, de facteur tissulaire, de métalloprotéinases et d'un faible niveau de muscle lisse; elle se trouve alors dans un état favorable à sa rupture que nous nommons la plaque instable (Théroux, 2003). Cette plaque instable fait partie de la famille du syndrome coronarien aigu (SCA) qui est caractérisé par une diminution de l'apport en oxygène dû à un caillot occlusif qui se forme rapidement suite à l'apparition d'éléments thrombogènes (collagène matriciel, facteur tissulaire) au niveau de la plaque rompue. Le SCA est constitué de l'angine instable et de l'infarctus du myocarde avec (STEMI) et sans (NSTEMI) élévation du segment ST à l'électrocardiogramme. L'angine instable ressemble généralement plus aux NSTEMI. Les deux sont caractérisés par une obstruction partielle du vaisseau par la présence d'un caillot sur la plaque rompue et une embolisation distale. On les distingue généralement par des changements persistants à l'ECG et l'augmentation de certains biomarqueurs décrits plus loin. Des douleurs thoraciques répétitives d'une durée de moins de 20 minutes sont généralement associées à l'angine instable alors que celles d'une durée de 20 à 30 minutes sont plutôt associées à des NSTEMI. Par conséquent, la nécrose myocardique n'est pas détectée dans les angines instables. Les STEMI sont associés avec une douleur prolongée et une occlusion thrombotique totale qui est caractérisée par un sus-décalage du segment ST à l'ECG et une augmentation de certains biomarqueurs décrits aux sections 1.1.5 et 1.2.2. Des dommages sous-endocardiques sont premièrement induits et peuvent gagner progressivement toute l'épaisseur du myocarde pour devenir sous-épicaux induisant l'apparition de l'onde Q à l'ECG. (Ross, 1999 & McDonnell, 2009).

Il faut noter que la ligne est parfois très mince entre les différentes manifestations de la maladie coronarienne et que des individus peuvent rapidement basculer d'un état à l'autre de la pathologie selon une multitude de facteurs.

1.1.4. Les facteurs de risque des MCV

Tableau I – Facteurs de risques modifiables et non modifiables des MCV

Facteurs de risque modifiables	Facteurs de risque non modifiables
Pression artérielle élevée	Âge
Taux de cholestérol élevés	Genre
Tabac	Hérédité
Inactivité physique	Origine ethnique
Obésité	
Diabète	
Mauvaise Alimentation	
Statut socioéconomique	
Dépression	
Anxiété / stress	

Source : OMS

De nombreuses études ont identifié les principaux facteurs de risque associés à la MC. Un facteur de risque est considéré majeur, s'il répond aux trois critères suivants : i) une forte prévalence dans plusieurs populations, ii) un impact significatif indépendant sur le risque de MC et iii) le contrôle ou la correction de ce dernier diminue le risque global. Il existe deux grandes classes de facteurs de risque, premièrement, il y a ceux qui ne peuvent être modifiés comme l'âge, le sexe masculin et l'hérédité. L'âge est un facteur important, en effet, la très grande majorité des gens qui meurent de maladies coronaires sont âgés de plus de 65 ans. À un âge avancé, les femmes qui subissent des attaques sont plus susceptibles d'en mourir que les hommes. Toutefois, les hommes ont un risque plus élevé d'attaque plus tôt dans leur vie. De plus, les enfants de parents qui ont eu des pathologies cardiovasculaires ont une probabilité plus grande d'en développer à leur tour.

En second, il y a les facteurs de risque évitables ou qui peuvent être changés comme le tabagisme, le taux de cholestérol dans le sang, la pression artérielle élevée, l'inactivité physique, l'obésité ou le surplus de poids et finalement le diabète. Selon un rapport publié par la fondation des maladies du cœur du Canada, en mai 2003, environ 80% de la population présenterait au moins un facteur de risque évitable des maladies cardiovasculaires.

Le tabagisme est la principale cause de décès évitables au Canada et fait augmenter l'incidence de développer plusieurs formes de maladies cardiovasculaires. Les fumeurs ont un risque deux à quatre fois plus élevé de développer des pathologies coronariennes que les non-fumeurs. Il y a également d'autres éléments comme le stress et la consommation abusive d'alcool qui peuvent contribuer à augmenter le niveau de risque en affectant les autres facteurs de risque. L'absence d'activité physique d'intensité modérée pendant au moins 30 minutes par jour est un autre facteur qui augmente le risque cardiovasculaire global. L'activité physique a un pouvoir protecteur sur le système cardiovasculaire, car elle permet de réduire le poids, les taux de cholestérol et de lipides sanguins, la tension artérielle et le diabète. (Source: AHA, Risk Factors and Coronary Heart Disease).

Comme le montre bien la littérature, il existe un rôle très important de l'inflammation dans la maladie coronarienne. Les éléments qui mènent à la réponse inflammatoire au niveau des cellules vasculaires jouent un rôle pivot dans le développement de la pathologie à différents stades de l'athérosclérose, incluant la formation et la progression de la plaque, son instabilité et sa rupture (Zakynthinos, 2009).

1.1.5. Les outils actuels permettant de suivre le développement de la MC

Il existe certains signes physiologiques qui indiquent la présence de MC, par exemple, des douleurs thoraciques, des taux de Troponine T, de Troponine I, de protéine C-Réactive, d'Amyloïde A et de fibrinogène élevé, de même que d'autres signes pathologiques prédisposants, comme un changement dans le segment ST à l'électrocardiogramme, une dysfonction du ventricule gauche, des épisodes d'ischémie silencieuse et des infarctus du myocarde à répétition (Théroux, 2003). Comme nous pouvons le constater, aujourd'hui, plusieurs options sont maintenant offertes afin de détecter les pathologies ou d'en suivre leur expansion. Parmi les approches actuellement en vogue, il y a la découverte de nouveaux biomarqueurs qui suscite de plus en plus d'intérêt.



1.2.1. Définition d'un biomarqueur

Par définition, un biomarqueur est une caractéristique mesurable liée à un processus normal ou non. Il peut être utilisé pour le dépistage, le diagnostic, le calcul d'une réponse à un traitement ou le calcul de la toxicité d'un produit. Un biomarqueur est souvent une protéine que nous pouvons doser dans le sang ou dans les urines (source : Wikipédia). De nos jours, les biomarqueurs sont des molécules couramment utilisées en clinique. Plusieurs d'entre eux sont dosés de façon routinière afin d'aider les cliniciens à poser leur diagnostic et définir le meilleur traitement.

1.2.2. Les biomarqueurs connus du SCA

Tableau II – Les biomarqueurs du SCA

Biomarqueur	Diagnostic
Créatine Kinase	Détection des cellules cardiaques nécrosées
Myoglobine	Détection précoce de l'IM
Troponines cardiaques	Détection sensible et spécifique d'un problème d'ordre cardiaque
Protéine C-Réactive	Détection de la présence d'inflammation / fragilisation de la plaque
Peptides natriurétiques de type-B	Détection du SCA

La créatine kinase est associée aux myofibrilles dans l'espace intermembranaire des mitochondries et dans la fraction cytosolique. L'ATP est transportée en dehors de la mitochondrie par des translocases et est utilisée afin de phosphoryler la créatine dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. La phosphocréatine résultante diffuse jusqu'aux myofibrilles où elle régénère l'ATP à partir de l'ADP (Newsholme, 1978). La créatine kinase est une molécule qui sert de standard pour la détection de cellules cardiaques nécrosées. Les patients étaient considérés comme ayant un infarctus du myocarde sans élévation du segment ST lorsque la créatine kinase dépassait de deux fois la limite supérieure normale. La sensibilité de cette technique est par contre faible pour détecter des signes précoces et la détection se fait tard dans le développement de la pathologie (Théroux, 2003). Il faut noter toutefois qu'il existe de nombreuses fausses augmentations liées par exemple à une myolyse, comme par exemple, un effort musculaire ou de la fièvre, ainsi petit à petit elle perd de la popularité auprès des cliniciens. Donc, la

créatinine kinase participe toujours au diagnostic, mais il est bon de tenir compte de l'ensemble des autres facteurs également.

Parmi les autres facteurs, il y a la myoglobine qui semble être la meilleure solution disponible de routine présentement pour la détection précoce de l'IM aigu. Cette dernière est le transporteur intracellulaire principal de l'oxygène dans les tissus musculaires. Elle est également impliquée dans la dégradation du NO. La myoglobine ne se retrouve généralement pas dans le sang lorsqu'elle est relâchée à partir d'un tissu musculaire endommagé (Naka, 2005). Après l'apparition de la douleur, la myoglobine augmente en concentration dans les deux heures et atteint son pic maximal dans les quatre à six heures suivantes. Ce biomarqueur présente une bonne sensibilité pour la détection de l'IM, mais une très faible spécificité dû au fait que des niveaux élevés de myoglobine peuvent aussi être associés à des situations non cardiaques, comme l'insuffisance rénale. Sa spécificité est également affectée par la faible demi-vie de la myoglobine (Théroux, 2003).

Une autre alternative, les troponines cardiaques qui sont des protéines structurales qui modulent l'interaction entre l'actine et la myosine dans les muscles squelettiques et cardiaques. Les troponines I et T ont des isoformes qui sont exclusivement présentes dans le muscle cardiaque et elles ne se retrouvent généralement pas dans le sang d'une personne saine. Elles s'avèrent élevées dans le tiers des patients avec un SCA sans élévation du segment ST persistante. De plus, elles restent élevées pour une durée de 10 à 14 jours après l'évènement cardiaque. Ainsi, l'élévation des troponines constitue un biomarqueur qui est à la fois plus sensible et spécifique aux problèmes cardiaques que ces prédécesseurs bien que cette augmentation des troponines cardiaques puisse également représenter un problème non ischémique, comme la défaillance cardiaque congestive, une myocardite, l'utilisation d'agents de chimiothérapie neurotoxiques ou un embolisme pulmonaire. (Théroux, 2003).

La molécule inflammatoire la plus étudiée comme biomarqueur de maladie coronarienne, à ce jour, est la protéine C-réactive (CRP). Cette protéine augmente en réponse à une blessure, une infection ou suite à une stimulation inflammatoire. Elle constitue donc un bon marqueur de l'inflammation systémique (Zakynthinos, 2009).

Certains suggèrent même que la CRP pourrait jouer un rôle dans la fragilisation de la plaque et dans la pathogenèse de l'angine instable (Ishikawa, 2003).

Le peptide natriurétique de type-B est synthétisé et relâché par les ventricules en réponse à une surcharge. Il a été montré qu'il était surexprimé lors du syndrome coronarien aigu (Théroux, 2003).

Malgré leur aide précieuse au diagnostic des MC, ces biomarqueurs ont une sensibilité et une spécificité limitée et sont associés à un état relativement avancé de la pathologie. Ainsi, la recherche de nouveaux candidats plus performants s'avère une étape essentielle afin de pouvoir offrir de meilleurs outils aux cliniciens et ainsi diminuer les répercussions de la maladie. Une détection précoce de l'apparition de la maladie permettra la mise en place d'un traitement préventif permettant de diminuer les conséquences morbides, de même que les coûts reliés aux interventions associées. La recherche de nouveaux candidats biomarqueurs est donc un domaine en ébullition aujourd'hui, vu les énormes impacts qu'une telle molécule peut avoir sur plusieurs domaines de la santé. Ainsi, pour assurer le succès d'un nouveau biomarqueur utilisé en clinique, ce dernier se doit d'avoir une très grande sensibilité (capacité de détecter positivement un patient qui est réellement positif pour la pathologie), de même qu'une grande spécificité (capacité du biomarqueur à être négatif pour les patients qui n'ont pas la pathologie) et finalement d'être suffisamment robuste et analysable dans plusieurs centres (Simpson, 2009).

1.2.3. Le prélèvement de l'échantillon

La recherche de nouveaux candidats peut se faire sur deux types d'échantillons, les fluides biologiques tels le sang, la salive et l'urine ou les cellules prélevées par ponction tissulaire (biopsie).

La biopsie est le prélèvement d'une petite quantité de tissu effectué à l'aide d'une aiguille ou d'un bistouri. Les biopsies fournissent des informations précieuses sur l'état d'un organe (bonne sélectivité), mais elles sont invasives. La ponction de cellules cardiaques, par exemple, s'avère être une intervention parfois douloureuse et pouvant avoir des effets secondaires néfastes pour le patient.

En contrepartie, les fluides biologiques constituent des éléments des plus attractifs pour une recherche de biomarqueurs puisqu'ils se retrouvent en contact avec la majorité des cellules et organes du corps humain. Ainsi, la perfusion du sang à travers ces organes ou tissus « malades » peut résulter en l'ajout ou la suppression de protéines ou en la modification des protéines existantes selon les conditions physiologiques ou pathologiques spécifiques à une pathologie donnée. Ceci constitue une source potentiellement importante d'information sur tout ce qui se passe dans le corps humain. Les fluides biologiques offrent également la possibilité de faire plus aisément un suivi longitudinal et ainsi de pouvoir diagnostiquer la pathologie dans des individus asymptomatiques ou dans les premiers stades du développement de cette dernière. De plus, ils constituent des échantillons qui sont simples et peu invasifs à prélever chez pratiquement tous les individus. L'urine, la salive, le liquide céphalo-rachidien et le sang sont les principaux fluides biologiques accessibles. Leurs différences de composition sont importantes à considérer lors d'une étude de biomarqueurs afin de choisir l'échantillon qui sera le plus favorable à la détection de candidats pertinents (tableau III).

1.2.4. Les fluides biologiques

Tableau III – Les avantages et inconvénients liés à l'utilisation des différents fluides biologiques

Fluide	Avantage	Inconvénient
Urine	Détection de produits toxiques	Détection de petites molécules rapidement éliminées
Salive	Riche composition en protéines	Contact moins important avec l'ensemble des organes
LCR	Variation dynamique plus faible	Accessibilité à l'échantillon
Sérum	Disponibilité de l'échantillon	Dégradation ex vivo
Plasma	Stabilité ex vivo	Sécrétion des plaquettes

L'urine est un liquide biologique composé des déchets de l'organisme. Elle est produite par les reins suite à la filtration du sang. Son composant principal est bien évidemment l'eau, mais le principal déchet qui la compose est l'urée. La créatinine est un autre déchet qui se retrouve en quantité importante dans l'urine. Le dosage de la créatinine, à la fois dans le sang et dans l'urine, permet aux cliniciens d'évaluer la fonction rénale d'un individu (source : Wikipédia). Puisque l'urine contient principalement des produits qui seront éliminés rapidement par le système, il constitue un échantillon plus riche pour la détection de certains produits toxiques dosés en toxicologie. Il s'avère moins intéressant pour la détection de molécules qui pourraient prévenir à long terme la venue d'évènements cardiovasculaires.

Quant à la salive, c'est un liquide biologique qui est sécrété par les glandes salivaires, à l'intérieur de la bouche. Elle est composée à 99% d'eau et est moins concentrée en ions (hypotonique) comparativement au plasma sanguin, mais elle peut devenir isotonique ou même hypertonique dans certaines conditions. Compte tenu de sa riche composition, la salive pourrait un jour remplacer les prises de sang. Une étape clé allant dans cette direction a été le décryptage du protéome salivaire (source : Wikipédia).

Le liquide céphalo-rachidien (LCR) est produit dans le système nerveux central (SNC) par deux mécanismes, la sécrétion constante des constituants par les plexus choroïdes et le drainage du liquide interstitiel du parenchyme cérébral vers les structures ventriculaires et sous-arachnoïdiennes. La composition du LCR varie légèrement selon le site de prélèvement (ventriculaire ou lombaire). Le LCR assure la protection mécanique du SNC contre les traumatismes et il assure également une fonction métabolique en transportant plusieurs constituants et métabolites assurant l'homéostasie cellulaire du SNC. Le taux de protéines y est de 20 à 40 mg pour 100 mL, soit environ 100 fois plus faible que dans le sang. Ainsi, les protéines majoritaires représentent seulement 80% de la masse globale protéique, ce qui représente un avantage afin d'atteindre les protéines de faibles abondances plus aisément. Recueillir le LCR représente toutefois un geste invasif et constitue une limite quant à l'accessibilité à ce fluide (Gabelle, 2008).

Le sang est quant à lui un liquide biologique où des cellules vivantes, leucocytes, plaquettes et érythrocytes (les éléments figurés), sont en suspension dans une solution aqueuse de composition complexe appelée plasma. Le sang assure plusieurs fonctions essentielles à la vie comme le transport de substances (gazeuses et nutritives), la régulation de certaines caractéristiques physiques du milieu interne, la répartition de la chaleur et la protection de l'organisme. Au niveau de sa fonction de transporteur, le sang apporte l'oxygène et les divers nutriments nécessaires à la survie des cellules en périphérie, il s'occupe également d'acheminer les déchets aux sites d'élimination (poumons et reins) et

d'acheminer les hormones nécessaires au bon fonctionnement des organes cibles. Quant à sa fonction de régulateur, le sang s'occupe de maintenir la température corporelle appropriée et de maintenir un pH physiologique dans les tissus. Quant à son côté protecteur, il sert à prévenir l'hémorragie par la formation de caillot lors de la rupture d'un vaisseau sanguin et sert à prévenir l'infection en transportant des anticorps, des leucocytes ainsi que les protéines du complément. Le sang s'avère être un échantillon intéressant à étudier pour une étude de biomarqueurs des MCV, car le sang a plus de chance d'être en contact direct avec l'organe ou le tissu impliqué dans la pathologie (Simpson, 2009).

Après centrifugation du sang, les éléments figurés se déposent au fond du tube, alors que la partie moins dense qui flotte à la surface est le plasma (fig.4) (MARIEB, 1999). Le plasma est un liquide, constitué principalement d'eau, de couleur jaunâtre et d'une texture visqueuse. Il est composé de divers électrolytes, de substances azotées non protéiques, de nutriments et d'un amalgame de protéines (voir la section 1.3.3 pour plus de détails sur l'utilisation du sang pour des analyses protéomiques).

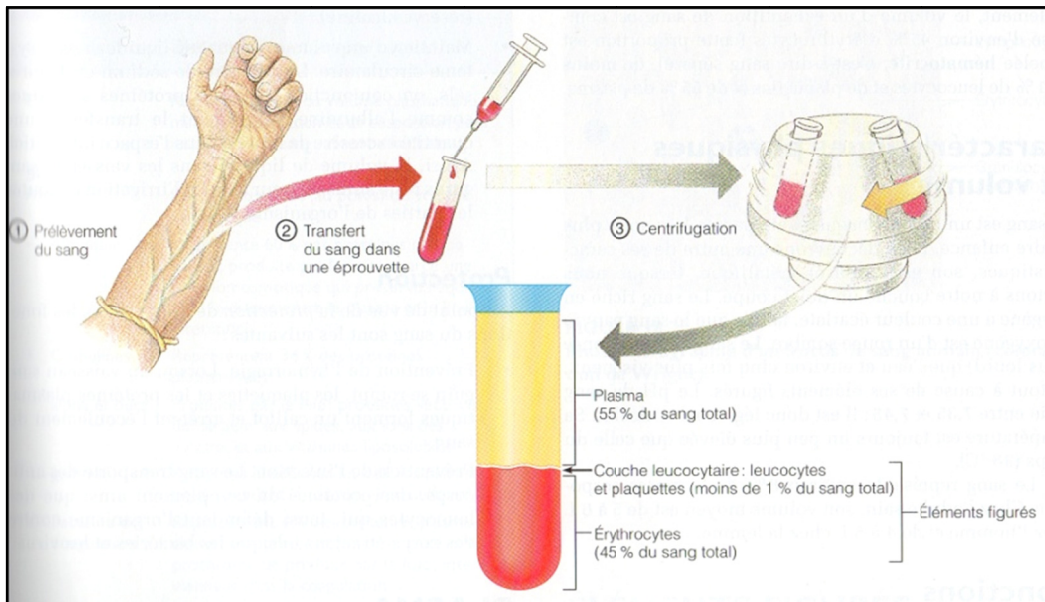


Figure 4 – Isolement du plasma (MARIEB, 1999)

1.2.5. Les paramètres biologiques plasmatiques

Le plasma comporte une multitude de paramètres biologiques qui ont une importance clé dans plusieurs situations cliniques. Parmi ces paramètres, un certain nombre sont considérés comme des facteurs de risque bien connus de la maladie cardiovasculaire et définissent le syndrome métabolique. Il existe, dans la littérature, une certaine controverse au niveau de sa définition et de son utilité, mais plusieurs s'entendent pour dire que ces symptômes particuliers sont interreliés entre eux et permettent de définir un sous-groupe de patients qui ont un risque élevé de développer la maladie coronarienne. Selon le National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III), il y a présence du syndrome métabolique si au moins trois des cinq critères suivants sont rencontrés : un tour de taille supérieure à 40 pouces pour les hommes et 35 pouces pour les femmes, une pression artérielle supérieure à 130/85 mmHg, un niveau de triglycérides (TG) supérieur à 150 mg/dl, un niveau de lipoprotéines de haute densité (HDL) inférieur à 40 mg/dl pour les hommes et 50 mg/dl pour les femmes et un niveau de glucose sanguin supérieur à 100 mg/dl. Cette définition est celle qui est la plus acceptée, car elle intègre bien les paramètres d'hyperglycémie et de la résistance à l'insuline, d'obésité viscérale, de dyslipidémie et d'hypertension. Son application est assez simple, car toutes les mesures requises (en clinique et en laboratoire) sont disponibles et utilisées de façon routinière. Malgré tout, il faut faire attention avec l'interprétation que nous en faisons, car son application et sa pertinence ne font pas l'unanimité. Une de ces raisons est peut-être le fait que la définition du syndrome métabolique ne tient pas du tout compte de l'histoire familiale de l'individu, de son âge, de son sexe, des niveaux de lipoprotéines de faible densité (LDL) et de cholestérols totaux et finalement des habitudes de tabagisme; des facteurs de risque tous bien importants dans la maladie coronarienne. Conséquemment, cela en fait un outil un peu moins performant que le risque de Framingham (qui inclut dans son calcul afin de déterminer le risque cardiovasculaire à court terme (10 ans): l'âge, les niveaux de cholestérol totaux, les niveaux de HDL, la pression artérielle systolique (PAS), le traitement pour l'hypertension et le tabagisme (NCEP ATP III)) pour prédire le niveau de risque coronarien. Il sert par contre davantage à définir un sous-groupe d'individus qui

partage une même pathophysiologie et son étude peut mener à une meilleure compréhension de l'interaction des divers paramètres dans l'établissement de la pathologie (Huang, 2009).

Afin de comprendre les mécanismes d'action des pathologies, de pouvoir les détecter de manière précoce, avec une sensibilité et une spécificité élevée, nous devons avoir un regard complet sur l'ensemble des paramètres en jeu. Il existe une science qui s'est développée par la poussée technologique dans les dernières années qui tente d'avoir ce regard global. La science des « OMIQUES » qui regroupe la protéomique, la métabolomique, la génomique et la transcriptomique utilise une approche que l'on nomme « shot gun » (fig.5). Elle se différencie des approches plus couramment utilisées par sa façon d'identifier tous les agents impliqués et de jeter un regard par après sur ce qui semble intéressant à étudier plus en profondeur pour une pathologie donnée comparativement aux méthodes plus classiques de recherche qui ciblent l'ensemble d'une étude autour d'un agent bien précis (Cristea, 2004).

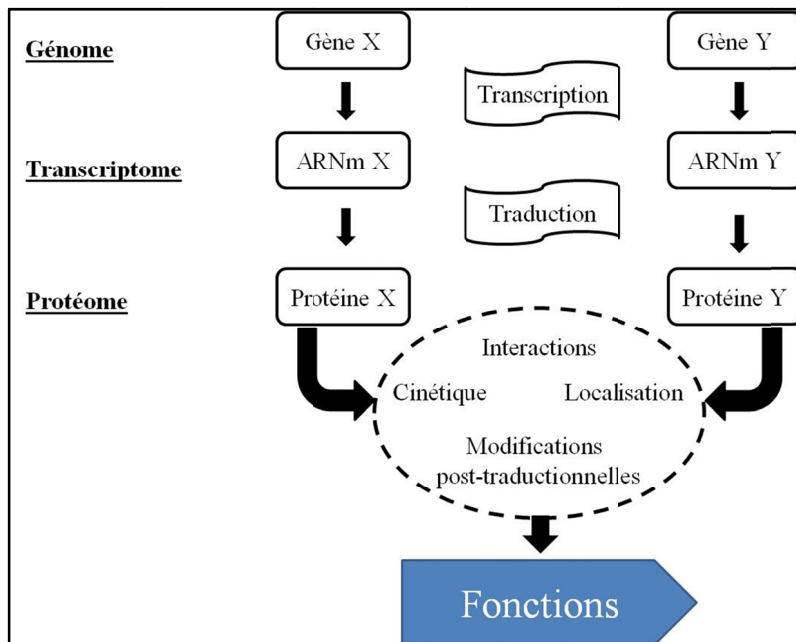


Figure 5 – Progression du génome au protéome

1.3.1. La protéomique

La protéomique est une technique qui s'est développée suite au séquençage du génome humain en 2003 et qui tire avantage de cette poussée technologique. Le protéome est l'ensemble des protéines constituant les cellules et tissus d'un organisme vivant. Il s'apparente au génome qui, quant à lui, représente l'ensemble des gènes contenant les caractéristiques héréditaires d'un individu, mais la correspondance entre le protéome et le génome est complexe. En effet, ce ne sont pas tous les gènes qui sont transcrits dans toutes les cellules et ce ne sont pas tous les transcrits qui sont traduits en protéines. Ainsi, l'étude du protéome est plutôt complémentaire à celle du génome. La protéomique est l'étude différentielle du protéome d'un échantillon biologique associé à une pathologie ou en réponse à un facteur de régulation. Une approche protéomique est donc plus directement reliée avec les fonctions biologiques puisque les protéines constituent le produit final des gènes et des transcriptomes. Ainsi, le développement de la protéomique clinique peut contribuer à l'avènement d'une médecine plus personnalisée.

1.3.2. L'histoire de la protéomique

Comme le montre la figure 6, la protéomique a fait ses débuts en 1975 lorsque Patrick O'Farrell a mis au point une méthode de séparation des protéines : L'électrophorèse en gel de polyacrylamide à deux dimensions (O'Farrell, 1975). Dans les décennies qui suivirent, le séquençage complet du génome humain a permis de faire un lien entre les protéines, c'est-à-dire le phénotype, et les gènes, c'est-à-dire le génotype. Ceci a permis de changer la façon d'étudier les protéines en regardant l'ensemble des protéines qui composent l'organisme au lieu de se concentrer sur une seule. Le développement de la bio-informatique a ensuite permis l'incorporation des algorithmes nécessaires afin de traiter les données recueillies, de

même que le développement du secteur des technologies a amené la création de nouveaux appareils plus fiables et plus performants. Et pour finir la création d'une nouvelle science qui étudie les gènes afin de comprendre les mécanismes pathologiques et pour un futur actuel et non très lointain de guérir les maladies par une thérapie génique (Patterson, 2003).

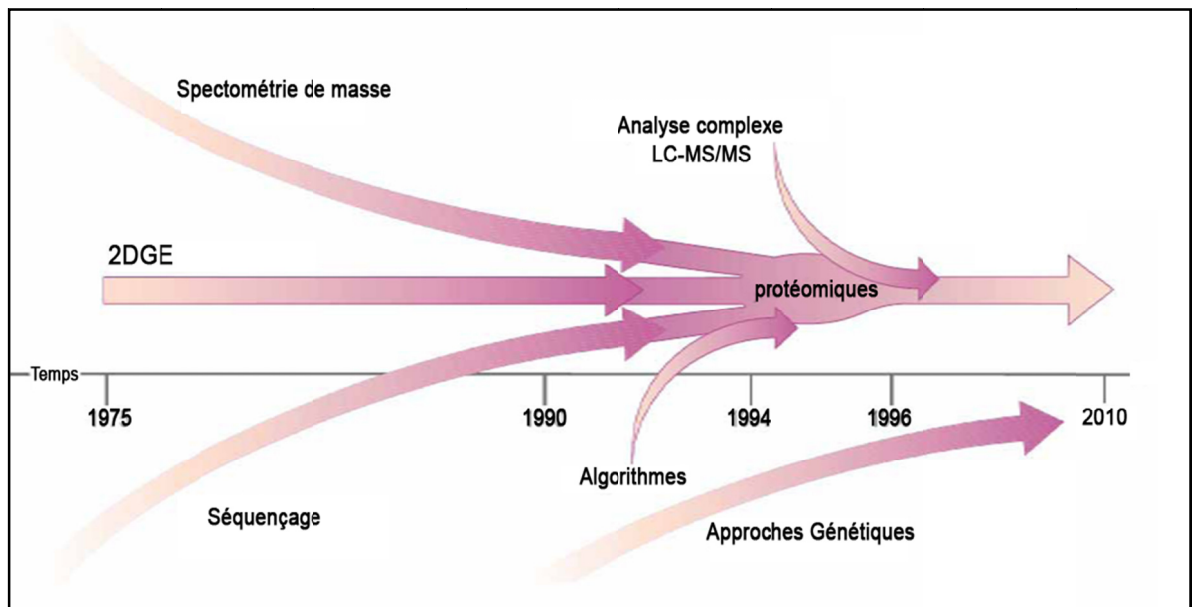


Figure 6 – Ligne du temps du progrès technologique de la protéomique (modifiée de Patterson, 2003)

1.3.3. Les précautions à prendre pour l'utilisation du sang comme échantillon pour des analyses protéomiques

La collection de l'échantillon selon des mesures rigoureuses est très importante pour diminuer la variabilité due aux erreurs de procédures. Le prélèvement sanguin doit se faire en portant une attention particulière aux critères suivants. La bonne quantité de sang doit être prélevée afin d'assurer une dilution correcte avec les additifs présents dans le tube. Le

site de prélèvement doit être bien nettoyé avec de l'alcool et le temps nécessaire à son évaporation doit être alloué afin de s'assurer qu'il n'y est pas d'interférence avec le prélèvement (hémolyse et augmentation de certains analytes). La position du patient (couché, debout ou assise) est également importante lors du prélèvement, car l'hématocrite sera affecté et ainsi cela peut changer la concentration de certains analytes. Un garrot doit être appliqué pour débiter le prélèvement, mais il doit être ensuite retiré pour permettre un écoulement sanguin adéquat. Une prolongation de l'occlusion de plus de 1 min peut affecter la composition sanguine. Idéalement les prélèvements doivent se faire entre 7 et 9 heures du matin pour éviter les fluctuations considérables de l'alimentation et des rythmes circadiens.

Le sérum est l'échantillon le plus fréquemment utilisé pour mener des analyses, par contre, il est associé avec une activation de la cascade de la coagulation sanguine et du système du complément. L'isolement du sérum prend également plus de temps que de récupérer le plasma car il est nécessaire d'attendre la formation du caillot, lequel peut également lier certaines protéines diminuant ainsi la concentration protéique. Tous les facteurs précédents ont pour effet d'influencer la composition de l'échantillon. Ainsi, pour des études de protéomiques, le plasma offre le net avantage d'une dégradation *ex vivo* moins importante et d'une identification en spectrométrie de masse d'un nombre plus élevé de peptides comparativement au sérum (Tammen, 2008). Ceci explique pourquoi l'analyse du plasma sera favorisée dans cette étude.

Le plasma devrait toutefois être déplété de ses plaquettes afin d'éviter qu'après activation, elles ne sécrètent d'autres protéines. Pour éviter une contamination de l'échantillon plasmatique par la sécrétion des plaquettes, il est suggéré de filtrer le plasma au travers d'une membrane 0,2 μ , de procéder à une double centrifugation et/ou d'ajouter des inhibiteurs de l'activation plaquettaire, comme une solution de citrate, théophylline, adénosine et dipyridamole (CTAD). L'échantillon devrait être ensuite aliquoté et gardé à -80°C ou préférentiellement dans l'azote liquide en évitant le plus possible les cycles de

décongélation/recongélation. Toujours pour diminuer la possibilité de dégradation de l'échantillon, il serait souhaitable d'ajouter des inhibiteurs de protéases, mais comme ces derniers peuvent interférer avec la spectrométrie de masse, ce n'est pas automatiquement recommandé. L'ajout d'inhibiteurs de protéases est même déconseillé dans le cas de molécules qui nécessitent de grandes quantités d'inhibiteurs, comme l'aprotinine, qui interfèrent avec l'analyse MS (Omenn, 2005).

L'utilisation de l'EDTA comme anticoagulant lors du prélèvement est un avantage pour mener des études de protéomiques, car il est un meilleur chélateur de calcium et un meilleur inhibiteur de l'activation des plaquettes. L'utilisation du citrate, bien qu'elle montre des valeurs inférieures mesurées d'environ 15%, ne semble pas perturber la détection des protéines. Les résultats obtenus lorsque nous comparons l'utilisation de l'EDTA ou du citrate sont similaires et consistants (Omenn, 2005).

1.3.4. Variation dynamique

La quantité totale de protéines plasmatiques représente environ 70g/L de plasma, dont plus de la moitié (40g/L) est de l'albumine. Ceci constitue un obstacle pour les analyses de protéomiques puisque les protéines d'un même échantillon sont présentes à des concentrations qui peuvent différer d'un facteur de 10^{12} entre les protéines de faible et de forte abondance, montrant la grande variation dynamique du plasma (*fig. 7*). La présence de protéines majoritaires peut avoir pour effet de masquer la détection des protéines de faible abondance. Ainsi, cela rend très complexe l'étude de la totalité des protéines par méthode protéomique. Il s'avère ainsi nécessaire d'adopter des stratégies pour diminuer les répercussions de cette grande variation dynamique (Sarkar, 2007 & Lathrop, 2003).

1.3.5. La déplétion

L'approche la plus couramment utilisée pour diminuer la variation dynamique d'un échantillon est d'effectuer une déplétion des protéines majoritaires. L'idée globale de la déplétion est de séparer l'échantillon des protéines qui n'apportent aucune information supplémentaire, complémentaire ou pertinente pour l'étude en cours. Comme mentionné dans la section précédente, il a été montré que les protéines majoritaires exerçaient un effet masquant sur les protéines de faible abondance. Puisque ces protéines majoritaires sont souvent très bien caractérisées, il est moins pertinent de les analyser dans le cadre d'une recherche de nouveaux biomarqueurs. En revanche, le fait de les retirer de l'échantillon va diminuer la variation dynamique de l'échantillon et va favoriser l'identification de candidats moins bien caractérisés. Cependant, la déplétion de ces protéines majoritaires peut également co-dépléter des partenaires d'interactions, c'est-à-dire, des protéines de faible abondance liées à des protéines majoritaires. Par exemple, l'albumine est une protéine éponge qui agit comme transporteur pour plusieurs autres protéines. Ainsi, quelques études de protéomiques récentes suggèrent qu'il peut y avoir des protéines de faible abondance intéressantes qui soient retirées lors des étapes de déplétions, soit par des liaisons non spécifiques ou par le fait qu'elles soient transportées par des protéines majoritaires (Schuchard, 2005 & Omenn 2005). Il a d'ailleurs été montré qu'un total de 210 protéines et peptides peuvent être identifiés dans la fraction contenant l'albumine après le processus de déplétion (Zhou, 2004).

Les techniques classiquement utilisées sont la déplétion de l'albumine seule qui représente la protéine la plus abondante dans le plasma ou bien de combiner la déplétion de l'albumine avec les immunoglobulines, ce qui représente une déplétion de plus de 80% de la masse totale des protéines du plasma (Fountoulakis, 2004). La technique classique pour séparer un échantillon de l'albumine est l'utilisation d'un colorant hydrophobe, le Cibacron blue. Ce colorant a une affinité très grande pour l'albumine et

représente une technique efficace à un très faible coût. Pour séparer l'échantillon des différentes formes d'immunoglobulines, une technique utilisant les protéines A/G est utilisée.

La recherche et développement a permis de produire des colonnes d'anticorps pouvant lier l'albumine et les immunoglobulines offrant une alternative, certainement plus coûteuses que les techniques de déplétion classiques avec le Cibacron blue/Protein A ou G, mais dont des études comparatives ont toutefois montré qu'elles étaient plus spécifiques et reproductibles (Zhou, 2004 & Schuchard, 2005). La déplétion de ces protéines les plus abondantes constitue maintenant un prérequis à toute étude de biomarqueurs (Fountoulakis, 2004).

Il existe depuis peu des colonnes d'anticorps qui utilisent une approche immunologique afin de déléter un échantillon de plusieurs protéines de forte abondance. Il y a des colonnes dirigées vers les 6 (IgY6) ou les 12 (IgY12) protéines les plus abondantes. Elles sont constituées d'une matrice où des anticorps aviaires y sont déposés. Des anticorps IgY aviaires sont utilisés afin de permettre une séparation hautement spécifique d'un mélange de protéines (Source : Seppro Depletion Products, Sigma Aldrich). L'utilisation de ce type de colonne permet de déléter un échantillon des protéines ciblées avec une efficacité de 85% (IgY6) et 90% (IgY12). Ces déléptions permettent une amélioration de la visualisation, de la détection et de l'identification des protéines de plus faible abondance comparativement aux techniques précédentes.

Dans cette même lignée des technologies plus récentes et plus poussées utilisant toujours une approche immunologique, il y a la colonne Seppro IgY14 (Sigma Aldrich) qui offre la possibilité de séparer les 14 protéines les plus abondantes du reste de l'échantillon. Des anticorps polyclonaux aviaires (IgY) sont utilisés afin d'offrir une spécificité supérieure durant le processus de déplétion. Parmi les protéines délétees par la colonne IgY14, il y a l'albumine, les IgG, l'alpha1-antitrypsine, les IgA, les IgM, la transferrine,

l'haptoglobuline, l'alpha2-macroglobuline, le fibrinogène, le complément C3, l'alpha1-acide glycoprotéine (Orosomucoïd), le HDL (Apo-I et Apo-II) et finalement le LDL (majoritairement l'Apo B) (ou voir *fig.7* pour une représentation plus schématique). La déplétion de ces 14 protéines représente, en une seule étape, une déplétion d'environ 95% de la masse totale des protéines du plasma ou du sérum. Ceci améliore la résolution et diminue la variation dynamique pour les étapes d'électrophorèse à une dimension (1D-SDS-PAGE), à deux dimensions (2D-SDS-PAGE), de même que pour la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS).

Plus récemment, la compagnie Sigma a également mis au point une nouvelle approche de déplétion permettant de déléter les 20 protéines les plus abondantes. Ceci constitue une déplétion de 98 à 99% de la masse totale protéique d'un échantillon plasmatique. L'approche utilise une colonne d'affinité à très grande capacité de liaison, la ProteoPrep 20. Cette technologie constitue l'outil le plus performant à ce jour pour déléter un échantillon plasmatique ou de sérum. L'approche a démontré qu'elle permet une meilleure visualisation des protéines de très faible abondance et conséquemment permet leur identification en MS (Schuchard, 2005).

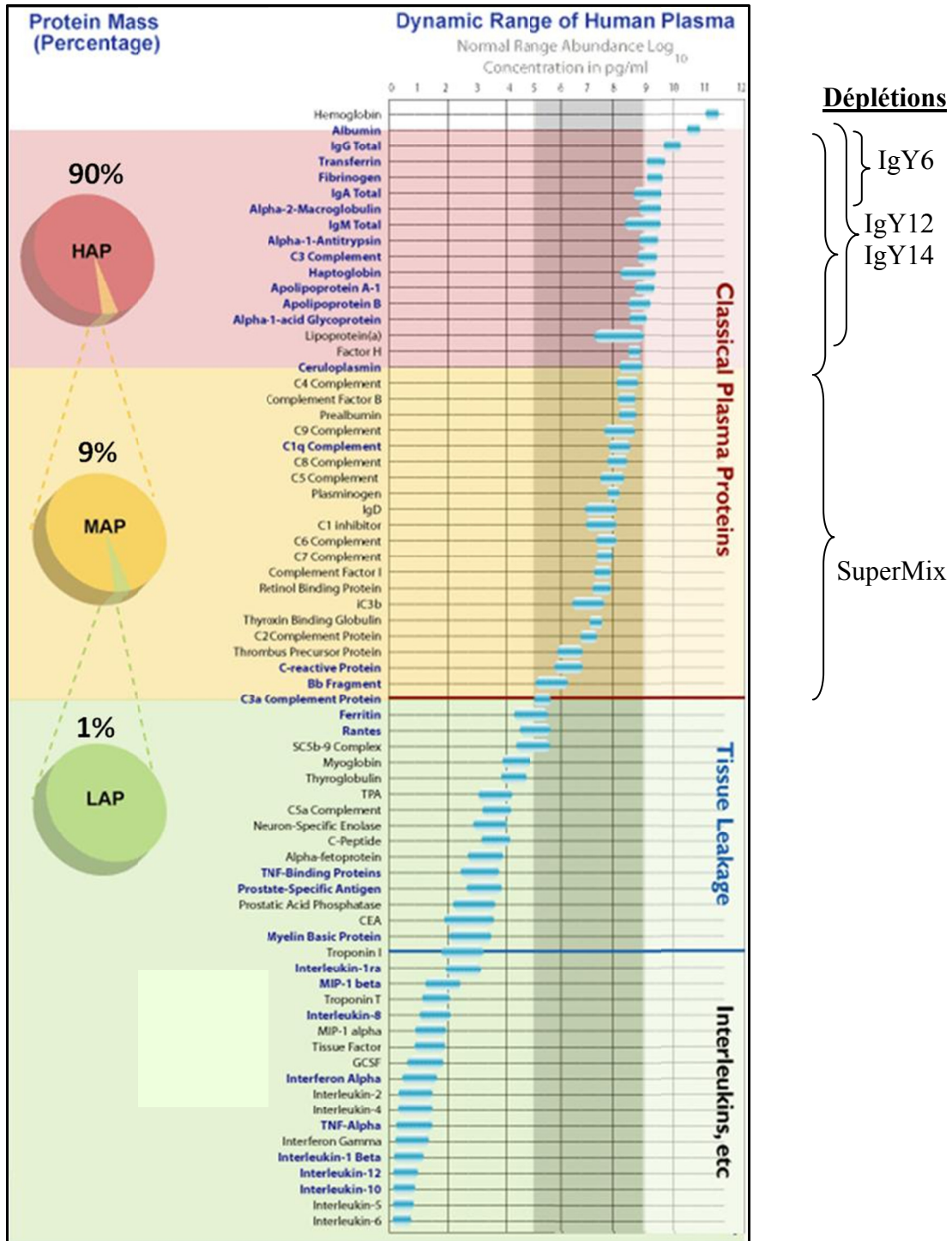


Figure 7 – Stratégie de déplétion des protéines (Genway)

HAP : Protéines de forte abondance MAP : Protéines de moyenne abondance
LAP : Protéines de faible abondance

Il existe également, une colonne Seppro Supermix (Sigma Aldrich) qui pousse plus profondément dans la déplétion afin de dépléter un échantillon des protéines de moyenne abondance lorsqu'elle est utilisée en tandem avec la colonne IgY14. La colonne Supermix a été développée en immunisant des poulets avec la portion déplétée (« flow-through, FT ») de la colonne IgY14. Cette approche montre une détection améliorée des protéines de faible abondance, de même qu'une détection sur un intervalle plus large en termes de concentration de protéines pouvant atteindre un facteur de 10^{10} . Les déplétions sont parfois insuffisantes pour détecter des protéines plasmatiques à de très faibles concentrations, mais cette sensibilité est souvent nécessaire pour découvrir des biomarqueurs spécifiques de pathologies (Qian, 2008). Il s'avère donc important d'utiliser également une approche de fragmentation pour décomplexifier l'échantillon.

1.3.6. La fragmentation

Cette étape consiste à séparer les protéines selon certaines de leurs propriétés biochimiques dans le but de diminuer la complexité de l'échantillon avant l'analyse de spectrométrie de masse. Il existe une multitude d'approches afin de réaliser cette séparation des protéines et elles peuvent être rassemblées sous deux grandes catégories, la séparation par gel et la séparation par chromatographie liquide.

Bien que la plupart des techniques de protéomique soient assez récentes et utilisent par conséquent fréquemment de nouvelles technologies, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) demeure une méthode largement utilisée. La technique générale du gel PAGE consiste à séparer les protéines selon leur vitesse de migration dans un champ électrique. Les protéines migrent, selon leur charge et leur masse, à travers une matrice très réticulée qui baigne dans un tampon légèrement alcalin afin que les protéines y soient présentes sous forme d'anions et qu'elles migrent vers l'anode. En instaurant un gradient de pH au sein du gel, chaque protéine va migrer jusqu'à l'endroit dans le gel où elle

atteindra son point isoélectrique, c'est-à-dire, l'endroit où sa charge sera nulle. Le traitement préliminaire des protéines par le SDS sert à séparer les protéines uniquement selon leur masse (séparation SDS-PAGE). En chauffant l'échantillon en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol, cela rompt les liaisons disulfures et dénature les protéines, ce qui permet la séparation des éléments constitutifs de la protéine. Le principe directeur est que la longue chaîne hydrocarbonée de l'anion dodécylsulfate vient s'accoler aux chaînes hydrophobes des résidus de la chaîne peptidique dans une proportion d'une molécule de SDS pour environ deux résidus. Le rapport de la charge à la masse devient donc à peu près équivalent pour toutes les protéines dont la vitesse de migration à travers le gel dépendra de la taille/masse uniquement.

Beaucoup d'efforts sont mis en place pour améliorer la vitesse d'analyse, le pouvoir de séparation des protéines pour des études plus approfondies et la possibilité d'analyser des échantillons de plus en plus complexes (LaCourse, 2002). Ainsi, le développement des techniques de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a permis le développement de nouvelles méthodes de séparation des protéines en phase liquide qui se substituent, petit à petit, aux techniques de fractionnement par gel. Le système de double chromatographie PF2D (Two Dimensional Protein Fractionation), développé par Beckman Coulter, permet de séparer un échantillon selon le point isoélectrique en première dimension et selon le degré d'hydrophobicité en seconde dimension. Il résulte en un pouvoir de séparation beaucoup plus résolutive que la séparation en gel en ayant la possibilité de séparer de manière automatisée un échantillon en plusieurs fractions (jusqu'à un total de 1225 fractions). Ce fractionnement poussé des protéines facilite la détection, par le spectromètre de masse, de peptides de très faible abondance.

1.3.7. La spectrométrie de masse

Cette technique est basée sur la mesure de la masse des protéines et des peptides déterminés par leur ratio de leur masse sur leur charge (m/z). Ceci est déterminé par

l'ionisation d'un échantillon qui génère des espèces chargées qui dépendamment de la valeur du ratio m/z va atteindre le détecteur à un temps spécifique (*Time of Flight* ou ToF) ou en trappant les ions dans un champ électrique et en les filtrant ensuite selon leur taille (la plus petite en premier) de manière séquentielle, tout en mesurant le temps que les ions mettent à arriver au détecteur (*fig.8*). Pour générer des peptides qui sont suffisamment petits pour être ionisés, une digestion de l'échantillon avec de la trypsine s'avère nécessaire avant l'analyse en spectrométrie de masse. La trypsine coupe les protéines à des endroits bien précis dans la séquence d'acides aminés permettant après l'analyse de rechercher ces valeurs dans des bases de données afin de générer une empreinte peptidique (peptide mass fingerprint). Les résultats peuvent être améliorés par l'utilisation de l'analyse MS/MS qui consiste à induire, aux fragments qui ont été filtrés selon leur ratio m/z , une collision des fragments avec un gaz inerte, comme l'argon ou l'azote. Ceci cause la fragmentation du peptide d'une manière très prédictible et le temps que les fragments qui possèdent une valeur m/z atteignent le détecteur permet l'identification de peptides et d'une séquence protéique qui permet l'identification de la protéine (Simpson, 2009).

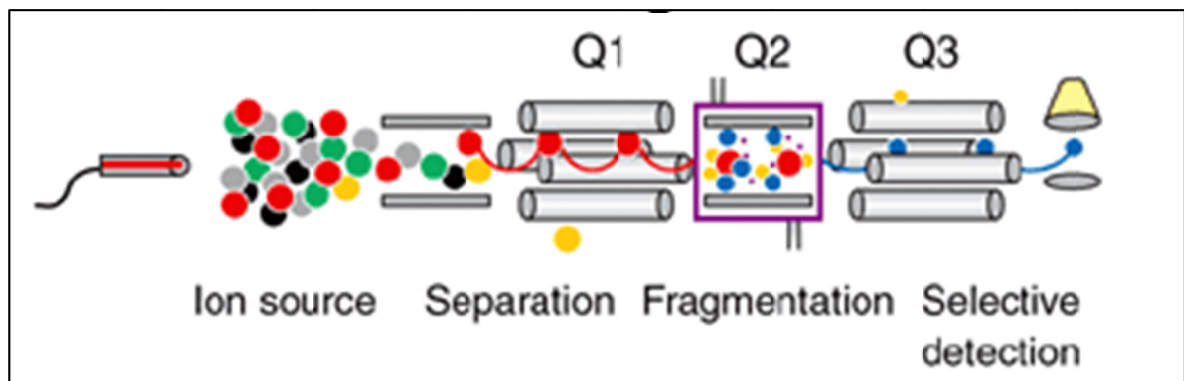


Figure 8 – Schéma du principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse - technologie MRM illustrée (Sabatine, 2010)

1.3.8. La protéomique quantitative

Un rôle important de la protéomique fonctionnelle est de quantifier les changements dans l'abondance des protéines d'un échantillon à un autre en plus d'identifier les protéines présentes dans ces échantillons. Pour ce faire, l'approche doit avoir une sensibilité et une précision assez élevée (Old, 2005).

Il est possible d'évaluer cette valeur quantitative en analysant le pourcentage de la séquence complète qui est couvert par la séquence identifiée en MS. Par contre, cette technique n'est pas très rigoureuse, car elle dépend entre autres de la longueur de la séquence de la protéine complète et de la façon dont cette dernière est digérée (Liu, 2004).

Une approche alternative afin d'évaluer la valeur quantitative est le compte du nombre de peptides détectés. Le principe est que la présence d'une multitude d'acides aminés chargés et de coupures qui ne se sont pas produites lors de la protéolyse fait en sorte que chaque identification d'un peptide vient représenter une portion de la séquence de la protéine totale. Ainsi, chaque fois qu'un peptide est créé et identifié, il est considéré comme un «hit». En assumant que la couverture de la séquence d'une protéine augmente en proportion avec l'abondance de cette dernière, il a été suggéré que ce nombre de « hits » pourrait alors donner une indication de l'abondance de la protéine en question. Une augmentation dans le nombre de peptides (« hits ») exprime qu'une plus grande quantité de protéines est présente, même si ce n'est pas nécessairement linéaire (Pang, 2002). Il est bien de noter toutefois qu'une protéine de taille plus petite ou qui possède plus de sites de clivage aura plus de peptides également. Ceci pouvant expliquer pourquoi la relation n'est pas linéaire entre le nombre de peptides et l'abondance d'une protéine. En effet, les peptides générés n'ont pas les mêmes probabilités d'être détectés. Ainsi, spécifiquement à chaque protéine, seulement quelques peptides seront identifiés de manière reproductible et cela dépendra de l'appareil utilisé (Bergeron, 2007).

La figure 9 nous montre que plus le nombre de peptides identifiés est élevé, plus nous pouvons être sûrs que les identifications sont justes. De façon générale, une identification avec plus de 2 peptides s'avère bien acceptée comme résultat.

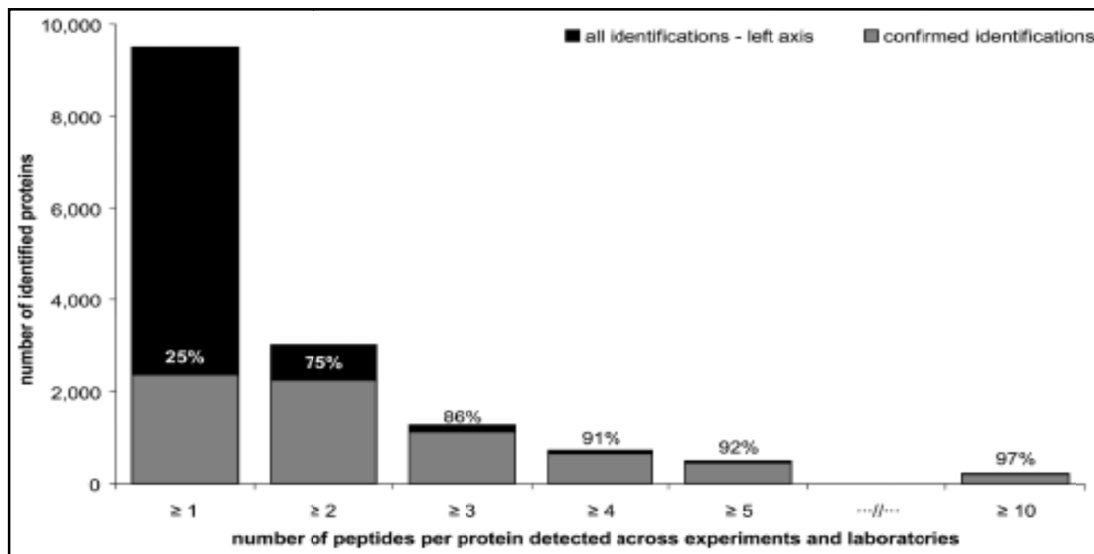


Figure 9 – Ratio entre le nombre de protéines identifiées et le nombre de peptides confirmés (Omenn, 2005)

Sur l'axe des « x », le nombre de peptides détectés par protéine et sur l'axe de « y », le nombre de protéines identifiées. Toutes les identifications sont représentées par la portion de la bande noire foncée, alors que la portion en gris représente les identifications qui ont été confirmées. Nous pouvons constater que plus le nombre de peptide augmente, plus les identifications sont confirmées.

À ce jour, la méthode la plus rigoureuse pour mesurer l'abondance relative d'une protéine est par l'utilisation du « spectral counting » tel que montré par Liu en 2004. Cette approche comptabilise le nombre total des spectres MSMS qui représente les peptides identifiés pour une protéine. L'approche du « spectral counting » a montré une excellente corrélation avec la quantité de protéine et reflète l'abondance relative de la protéine ($r^2 \geq 0,99$). En effet, plus la valeur du « spectral counting » augmente, plus la variabilité diminue et plus la sensibilité augmente. De plus, l'approche permet de calculer une variation entre deux échantillons et d'évaluer l'importance de ces différences avec des méthodes statistiques (Old, 2005).

La figure 10 résume les grandes étapes nécessaires à la compréhension de l'approche protéomique.

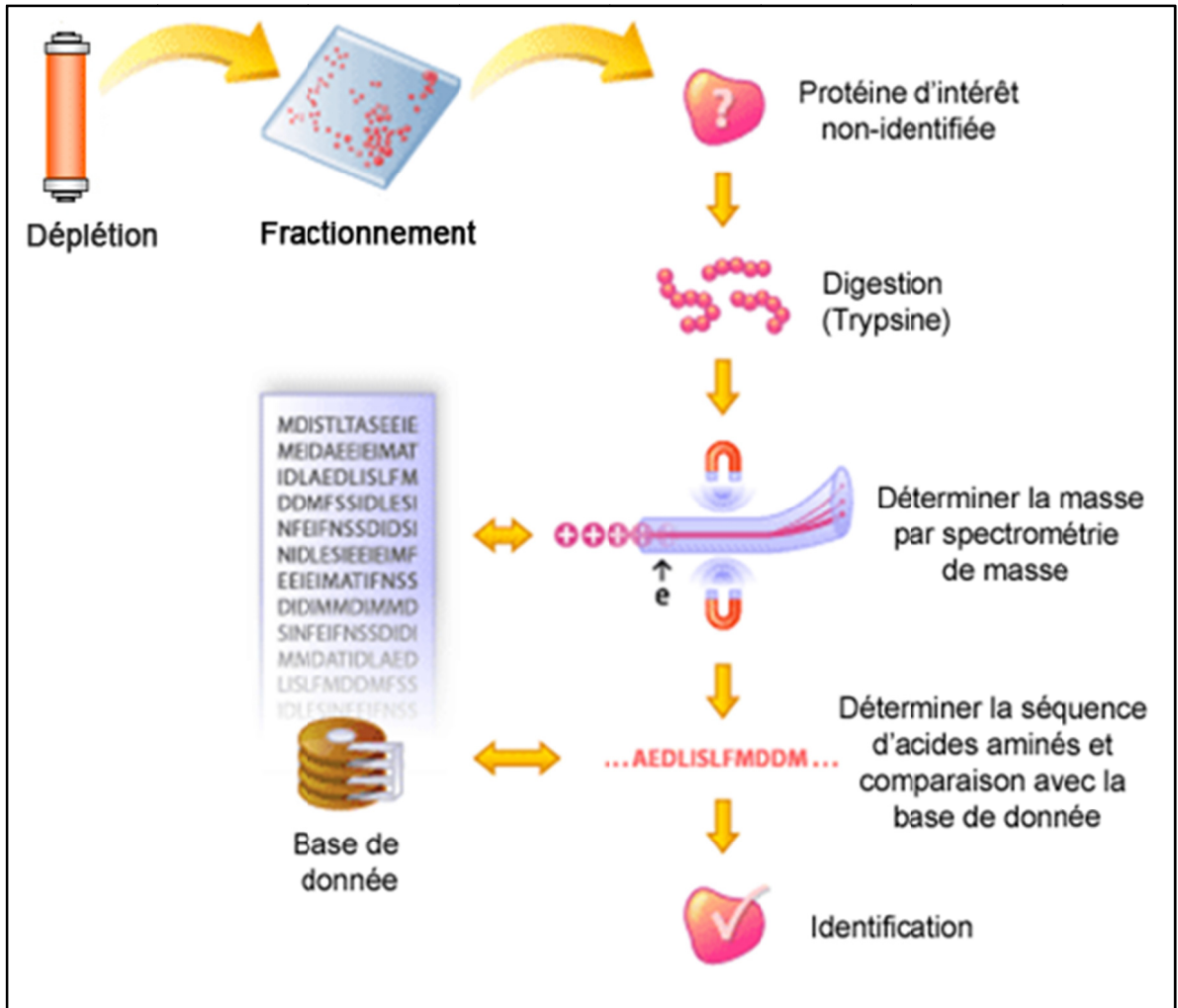


Figure 10 – Récapitulation des étapes essentielles de l'analyse protéomique

1.4.1. La sélection d'une population pour une étude de biomarqueurs de MC

Afin d'augmenter les chances de trouver des candidats présentant des différences significatives entre les deux groupes, il est important que la population soit bien définie et

restrictive pour certains facteurs importants. Cela permet d'avoir un groupe plus homogène qui optimise la détection des différences en diminuant la variation interindividuelle.

L'idée première de la constitution de la banque de sang à l'étude était de réaliser une étude d'ordre génétique. Ainsi, la banque utilisée était très bien définie et très restrictive afin de vraiment avoir une population la plus homogène possible afin de faire ressortir les différences d'ordre génétique. Or, ces caractéristiques sont toutefois tout aussi pertinentes dans une étude de protéomique puisque la génétique et la protéomique sont interreliées, comme mentionné à la section 1.3.1.

À l'origine, cette population a été constituée avec les biais « canadiens-français » et « bas âge » pour faire émerger des marqueurs génétiques de la dépression chez les CAD (McCaffery, 2009). En effet, l'existence de l'effet fondateur dans la population canadienne-française a été confirmée par plusieurs études (Heyer, 1995 & Davignon, 1993). Cet effet fondateur rend la population très appropriée pour une étude de polymorphisme car la majorité des canadiens-français ont des ancêtres communs venant de 7 000 individus arrivés en Nouvelle-France avant 1760 et dont les caractéristiques socio-économiques, religieuses et linguistiques ont fait en sorte qu'il y a eu peu de mélange avec les autres immigrants dans les derniers siècles. Et donc pour ces diverses raisons, une grande partie des individus vivant au Québec ont hérité de chromosomes presque exclusivement de ce petit groupe de fondateurs. Ceci permet de diminuer les variations interindividuelles généralement dues à un bagage génétique hétérogène de la population à l'étude et ainsi de mettre en avant-plan les différences causées plus probablement par la pathologie. L'âge est un autre facteur qui peut affecter la composante génétique au même titre que la composition et les ratios de certaines protéines. Ainsi, il peut s'avérer intéressant d'induire volontairement un biais dans la sélection des individus afin de favoriser une influence plus forte du caractère préventif recherché.

Dans l'étude, nous avons fait usage des deux derniers éléments mentionnés ci-haut. Nous avons enrôlé des individus d'origine canadienne-française et d'âge inférieur à 70 ans afin de diminuer les variations interindividuelles et d'optimiser la détection de candidats

ayant un potentiel protecteur. De plus, nous avons exclu les décès qui n'étaient pas reliés à des causes cardiovasculaires, comme des décès par cancer ou par accident, afin de s'assurer de bien classer chaque catégorie d'individus et encore une fois afin de diminuer les variations qui ne sont pas d'ordre cardiovasculaire. La catégorisation de chaque individu selon la multitude de paramètres mesurés constitue la force de cette étude. Les individus enrôlés dans l'étude ont tous été bien caractérisés par angiographie coronarienne, paramètres biologiques et biochimiques mesurés et par un suivi longitudinal de 5 ans sur leur condition de santé et leur médication. À la suite de ces analyses, chaque individu a été classé dans trois groupes généraux : les individus sains (contrôles), les patients avec MC instable (iCAD) et les patients avec MC stable (sCAD).

Pour cette étude, 18 individus provenant du groupe contrôle et 18 individus provenant du groupe iCAD ont été sélectionnés (voir la section 2 de la méthodologie pour les critères de sélection). Les 18 échantillons de chaque groupe ont été regroupés en un seul « pool » afin de réaliser un premier survol des différences présentes par une analyse protéomique comparative. À la suite de cette étape, une étape de validation des candidats identifiés a été planifiée pour chaque individu de la cohorte initiale avant de confirmer les candidats comme des biomarqueurs intéressants.

2. Méthodologie

2.1.1. Division des groupes et sous-groupes de la population à l'étude

La cohorte inclut 1006 patients d'origine canadienne-française, des hommes et des femmes âgés de moins de soixante-dix ans. Elle a été constituée de 500 contrôles avec une angiographie coronarienne normale et 506 patients symptomatiques dont 271 avec une angine instable basée sur le nombre de vaisseaux avec une sténose $\geq 20\%$, le nombre de lésions et leur histoire cardiaque documentée à l'Institut de Cardiologie de Montréal. Il n'y a eu aucun critère d'exclusion concernant les patients qui se qualifiaient et qui acceptaient de participer à l'étude. La banque de données incluait les données cliniques, démographiques et thérapeutiques ainsi que des aliquots de plasma, de sérum et de lignées cellulaires obtenus lors de la phase d'enrôlement de 1998 à 2003. Tous les patients ont fait l'objet d'un suivi longitudinal à 1, 2 et 5 ans qui s'est terminé à l'hiver 2008-2009. Les événements cliniques incluant toute hospitalisation, toute nouvelle maladie détectée, toute intervention médicale pratiquée et toute la médication prise durant le suivi ont été collectés dans cette banque de données.

De cette banque, deux groupes ont été reconstitués pour représenter les extrêmes de la population. Des patients avec un historique d'IM et une récurrence d'IM durant le suivi longitudinal de 5 ans (n=18, groupe A) et en second lieu, des individus contrôles sans lésion obstructive supérieure à 20% détectée lors d'une angiographie coronarienne et sans événements durant le suivi, appariés pour l'âge, le sexe et la date de prélèvement (n=18, groupe B).

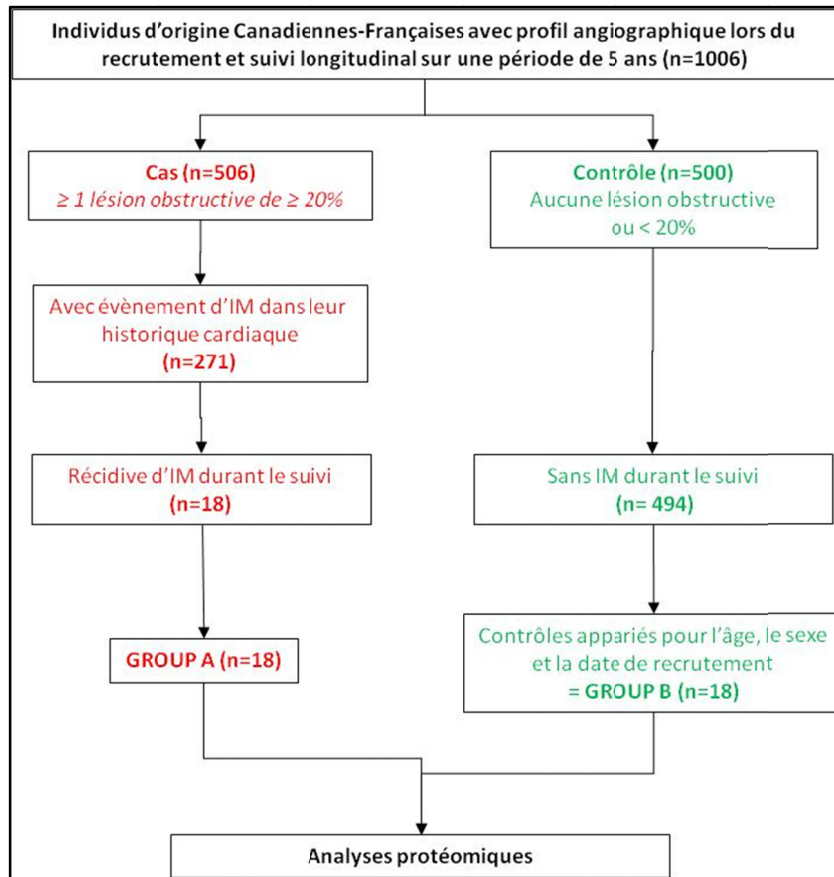


Figure 11 – Les groupes constituant l'étude

Une approche comparative de plusieurs analyses protéomiques a été adoptée afin de permettre la validation d'approche plus innovatrice en confirmant certains résultats obtenus avec une approche plus classique. De plus, cela permet de constater facilement les avantages et les désavantages liés à l'utilisation d'une approche plutôt qu'une autre. La figure 12 présente la stratégie d'analyse protéomique adoptée pour l'étude.

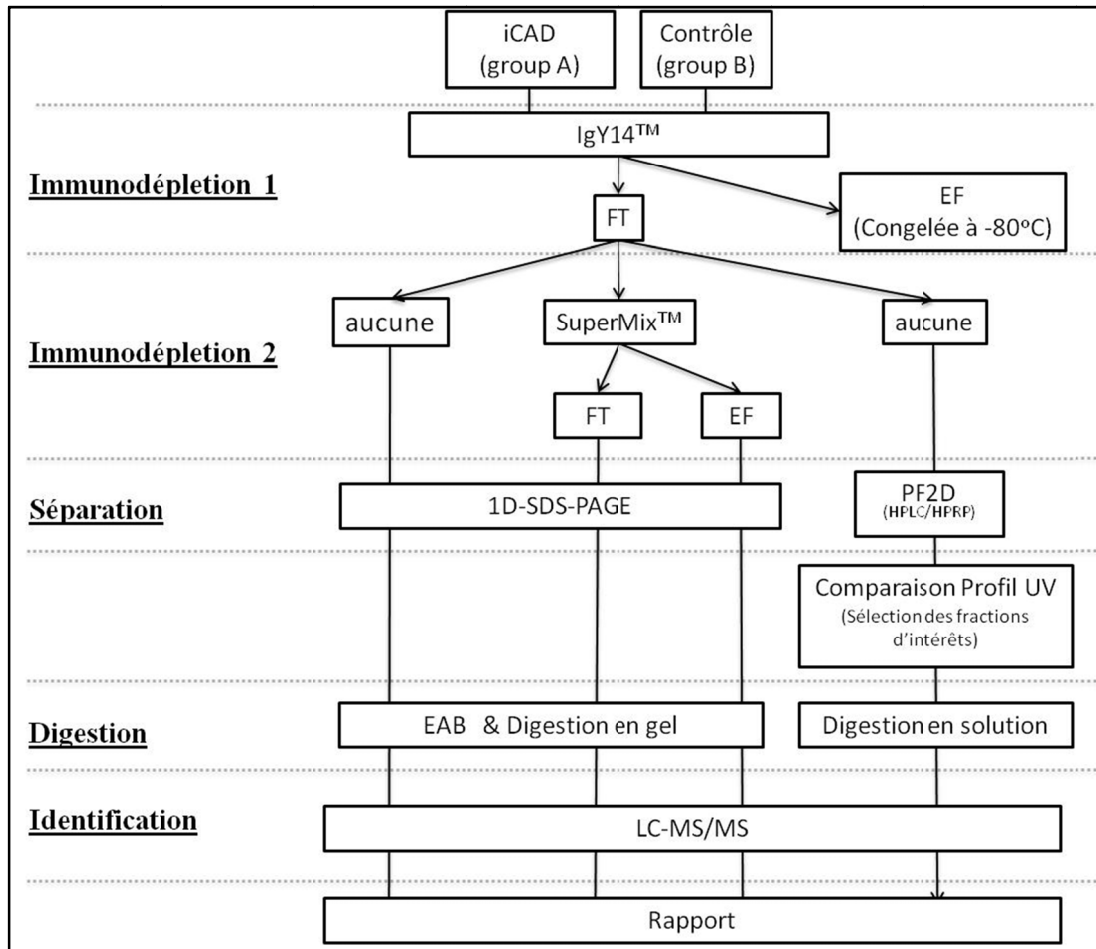


Figure 12 – Schéma de la stratégie d'analyse protéomique

2.1.2. Préparation de l'échantillon

Un échantillon sanguin a été obtenu durant la période de recrutement par une prise de sang qui a été effectuée dans des tubes citraté comme agent anticoagulant. Une centrifugation (1 800g, 15 min à la température de la pièce) a été effectuée afin de récolter le plasma pauvre en plaquettes. Cette portion a ensuite été congelée à -80°C jusqu'au moment de l'analyse.

Le plasma a ensuite été décongelé sur glace et centrifugé à 15 777g, 15min à 4°C. Pour chacun des deux groupes, les analyses ont été réalisées en triplicatas. Les protéines majoritaires ont été déplétées des échantillons par un passage sur colonne de chromatographie liquide Seppro IgY-14 LC5 (Sigma Aldrich, anciennement Genway). Pour ce faire, des inhibiteurs de protéase (Complete EDTA-free, Roche) ont été ajoutés à toutes les solutions (1 pastille pour chaque 50mL de solution). Les échantillons ont été dilués 1 :5 dans du tampon de dilution 1X [solution mère : Tampon de dilution 10X (Tampon salin Tris: 100mM Tris-HCl, pH 7.4, 1.5M NaCl), Beckman Coulter] et filtré sur colonne 0,45µm avec centrifugation à 9 000g, 1min, afin d'enlever les particules avant la déplétion.

Pour chaque séquence de déplétion, un total de 500µL de solution diluée a été injecté sur la colonne IgY14. Les recommandations du protocole du manufacturier ont été suivies pour effectuer les déplétions. Nous avons récolté, pour chaque injection, deux portions : une portion déplétée (ce qui a passé au travers de la colonne, le « flow-through », FT) de 5min à 27,5min et la portion éluée (ce qui a été lié par la colonne, EF) de 36,5min à 55min. La portion EF a été récoltée par l'injection d'un tampon de déshybridation (1M glycine-HCl, pH 2.5). Les échantillons ont été concentrés sur des unités Ultra-15 3K (Amicon), un dosage des protéines totales a été réalisé avec un kit de détection de protéine BCA (Pierce) et c'est ce qui a constitué le matériel de départ pour chaque approche. Chaque portion a été congelée à -80°C jusqu'à l'étape suivante.

2.1.3. Le processus de déplétion

Déplétion des 14 protéines majoritaires

La colonne de chromatographie liquide IgY-14 est basée sur des interactions antigènes-anticorps aviaires. Elle a été conçue pour dépléter les 14 protéines de plus fortes

abondances, soit l'albumine, les IgG, le fibrinogène, la transferrine, les IgA, les IgM, l'haptoglobine, l'alpha2-macroglobuline, l'alpha1-acide glycoprotéine, l'alpha1-antitrypsine, Apo A-I HDL, Apo A-II HDL, le complément C3 et l'Apo B-LDL de fluides biologiques humains. Cela constitue une déplétion de 90 à 95% de la masse protéique totale du plasma.

Déplétion des protéines de moyennes abondances

Une des approches envisagées a exploité un processus de déplétion plus poussé. Les protéines de moyenne abondance (MAP) ont été déplétées à la suite de la déplétion des protéines majoritaires (IgY14) pour enrichir l'échantillon en protéines de faible abondance (LAP). GenWay a développé une technique de séparation utilisant une colonne d'anticorps qui permet de capturer 207 protéines additionnelles après la déplétion des 14 protéines majoritaires d'un échantillon de plasma ou de sérum (colonne SuperMix). Environ 390µg d'échantillon a été dilué dans un tampon de dilution (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.4, avec supplément d'inhibiteurs de protéase) pour constituer un volume de 500µL. Après filtration sur colonne filtrante (0,45µm), l'échantillon a été injecté manuellement sur une colonne SuperMix LC1 et les recommandations du fabricant ont été suivies pour réaliser la déplétion. Le FT et EF ont été collectés et concentrés (Amicon, Ultra-4 3K) et les concentrations de protéines ont ensuite été mesurées par dosage de protéine BCA.

2.1.4. Le processus de séparation

1DGE et Excision Automatique des Bandes

Trente microgrammes de protéines ont été chargés sur un gel de 2,4 cm avec gradient d'acrylamide de 7 à 15%. Après migration, les protéines ont été colorées avec du bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant blue G, Sigma). Chaque ligne de migration a été soumise à une technique d'excision automatique des bandes (EAB) qui génère 15 bandes par ligne (Protein Picking Workstation ProXCISION, Perkin Elmer). Puisque les bandes du haut du gel et celles du bas ne semblaient pas contenir beaucoup de matériel, les bandes 1 et 2, 8 et 9, 10 et 11, 12 et 13, 14 et 15 ont été regroupées (*fig.13*). Ainsi, chaque ligne a généré 10 bandes qui ont été digérées et analysées par LC-MS/MS.

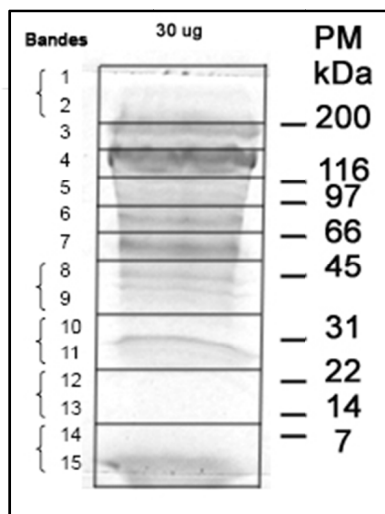


Figure 13 – Technique d'excision automatique des bandes

La ligne complète a été soumise à une EAB et les bandes 1 & 2, 8 & 9, 10 & 11, 12 & 13 et 14 & 15 ont été regroupées pour constituer un total de 10 bandes à analyser en spectrométrie de masse.

2D-LC (Système PF2D)

Le FT de la déplétion IgY14 a été décongelé sur glace et la quantité d'échantillons pour avoir 2,5mg par injection a été calculée. L'échantillon a été dénaturé 30min à la température de la pièce dans du tampon de dénaturation [7.5M urée, 2.5M thiourée, 12.5% glycérol, 62.5mM Tris-HCl, 2.5% (w/v) n-octylglucoside (octyl α -D-glucopyranoside), 6.25mM TCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride), 1.25mM inhibiteur de protéase (Roche)]. Une étape d'élimination des impuretés (cryoprécipitats) a été réalisée en utilisant des colonnes PD10 G-25 de Sephadex (Amersham) et les protéines ont été ensuite éluées par l'ajout de tampon de départ (Beckman Coulter). En 1^{ère} dimension, la séparation a été réalisée à une vitesse d'écoulement de 0,2mL/min à la température de la pièce et une mesure de l'absorbance a été réalisée à 280nm. Selon les recommandations du manufacturier, la colonne a été équilibrée avec du tampon de départ durant 130min et l'électrode a été calibrée en utilisant les standards fournis (Beckman Coulter). Ensuite, les 2,5mg de protéines ont été injectés dans le module de 1^{ère} dimension, où les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique. Les fractions ont été collectées à des intervalles de pH de 0,3 dans des plaques de 96 puits. Une fois la séparation de 1^{ère} dimension terminée, un module s'occupe d'auto-injecter l'échantillon dans le module de deuxième dimension. Ce module de 2^e dimension a été préalablement équilibrée avec 100% du solvant A (0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) dans de l'eau) et 250 μ L du contenu de chaque puits a été injecté dans la colonne de deuxième dimension. Cette séparation a été réalisée par une colonne de chromatographie en phase inversée maintenue à 50°C par un bloc chauffant et avec une vitesse d'écoulement de 0,75mL/min. Les protéines sont détectées par une lecture de l'absorbance à 214nm. L'éluution a été réalisée à l'aide de l'ajout progressif du solvant B (0,08% TFA dans de l'acétonitrile) de 0 à 100%. Les fractions de la seconde dimension n'ont, à ce point, pas été collectées. Cette étape servant à l'observation et à la détection des fractions différentielles. Les plaques de 96 puits de la première dimension ont été congelées à -80°C pour un second passage ultérieur.

Le spectre UV (ou profil) de chaque fraction généré par le logiciel d'acquisition du système PF2D a ensuite été manuellement révisé pour corriger les erreurs d'analyse du logiciel, telles que des pics oubliés, des mauvais assignements ou des erreurs dans la ligne de base. Ces aberrations ont été corrigées à l'aide du logiciel 32Karat ProteomeLab software (Beckman Coulter). Ensuite, un processus d'appariement semi-automatisé des pics a été réalisé entre les profils UV du groupe "contrôle" et ceux du groupe iCAD avec l'aide du logiciel Mapping Tools (Beckman Coulter). Durant cette période de nettoyage et d'appariements, un logiciel maison a été développé avec l'aide de Philippe Comtois, PhD (Institut de Cardiologie de Montréal) pour automatiser le nettoyage et l'appariement des pics. Ce logiciel a permis l'analyse des données des appariements, sélectionnant les fractions quantitativement et qualitativement différentielles entre les 2 groupes d'intérêt.

2.1.5. Le processus d'identification des candidats biomarqueurs

Digestion en gel

Après l'excision de bandes et le transfert de ces dernières dans une plaque de 96 puits, les protéines sont lavées avec 100µL d'eau de grade HPLC durant 10min. Toutes les étapes jusqu'à l'addition des enzymes ont été réalisées à 37°C. L'eau de lavage a été évaporée et les pièces de gel ont été décolorées par une incubation avec 50µL de bicarbonate d'ammonium 100mM durant 10min suivie d'une autre incubation avec 50µL d'acétonitrile 100% durant 10min. Les pièces de gel ont été incubées à nouveau dans le l'acétonitrile 100% durant 5min. Les pièces de gels décolorés ont ensuite été réduites et alkylées par une incubation dans 50µL de dithiothréitol 10mM durant 30min suivie d'une incubation de 20min avec 50µL d'iodoacétamide et finalement d'une incubation avec

100µL d'acétonitrile 100% durant 5 minutes. Les pièces de gel ont ensuite été lavées avec 50µL de bicarbonate d'ammonium 100mM durant 10min suivie d'une autre incubation avec 50µL d'acétonitrile 100% durant 5min. Les pièces de gel ont ensuite été séchées 30min à 37°C et les protéines ont été digérées par l'incubation avec 25µL de trypsine (6ng/µL dans 50mM de bicarbonate d'ammonium, Promega sequencing grade modified trypsin) durant 30min à la température de la pièce suivie d'une incubation de 4h30min à 37°C. Pour extraire les peptides, une incubation avec 30µL d'une solution contenant de l'acide formique 1% et de l'acétonitrile 2% durant 30min à la température de la pièce a été réalisée et ensuite 30µL de liquide a été transféré dans un portoir réfrigéré à 10°C. Deux extractions additionnelles sont réalisées avec l'ajout de 12 µL d'une solution contenant de l'acide formique 1%, de l'acétonitrile 2% et 12 µL d'acétonitrile 100% durant 30min. Ensuite, 15µL a été récupéré et ajouté à la première extraction et cette étape a été répétée deux fois. Donc, au final, un volume total de 60µL d'un extrait de peptide a été récupéré dans 0,54% d'acide formique et 15,9% d'acétonitrile.

Analyse LC-MS/MS

Le support pour plaque de 96 puits a été gardé dans un Micro Well-plate Sampler (Agilent 1100 Series). Avant l'injection, la pré-colonne (Zorbax 300SB-C18, 5mm X 0,3mm, 5µm) a été installée sur la valve à 6 ports de Rhéodyne du module et a été conditionnée avec de l'eau contenant de l'acétonitrile 3% et de l'acide formique 0,1% grâce à une pompe isocratique (Agilent séries 1100) programmée avec une vitesse d'écoulement de 15µL/min. Un volume de 20µL de la solution de digestion a été injecté dans la pré-colonne à une vitesse de 15µL/min et l'échantillon a été lavé pour 5min pendant que le FT était évacué dans la poubelle. La valve a été actionnée et les peptides absorbés sur la pré-colonne ont été élués dans une colonne PicoFrit™ de 75µm (New Objective) remplie avec 10cm de BioBasic® C18, 5µm, 300Å grâce à un gradient d'acétonitrile alimenté par une

nanopompe série 1100 (Agilent) à une vitesse de 200nl/min. Le solvant A, de l'acide formique 0,1% dans de l'eau et le solvant B, de l'acétonitrile :eau :acide formique (95 :5 :0,1) ont été préparés afin de créer le gradient. Une fois l'étape de lavage terminée, le gradient linéaire a été amorcé. À 5min, la quantité de B a été de 10,5% et il a été programmé que B atteigne 42% à 45min, 73,5% de B à 53min et 100% de B à 65min. Une concentration de B de 100% a ensuite été maintenue pour 5min et a été retournée à 10,5% entre les minutes 70 et 72. Un Q-ToF microTM (Waters Micromass) équipé avec un Nanosource modifié avec adaptateur nanospray (New Objective) a été utilisé pour tenir la colonne PicoFritTM proche du cône d'échantillonnage. Le voltage capillaire a été ajusté pour obtenir la meilleure pulvérisation à 35% de B. Le balayage MS a été placé à 1s (0,1s interscan) et enregistré de 350 à 1600m/z. Dans un même balayage MS, tous les ions chargés doublement et triplement avec une intensité supérieure à 25 comptes ont été considérés comme des candidats pour aller en fragmentation MSMS. À partir de cette étape, le plus fort d'entre eux a été sélectionné. L'acquisition MSMS a été arrêtée dès que le total du courant d'ions a atteint 2800 comptes/second ou après un maximum de 4 secondes. Le balayage MSMS a été acquis de 50 à 1990m/z sur une durée de 1,35s et un interscan de 0,15s. Un deuxième ion précurseur a été sélectionné à partir du balayage MS précédent. Une fois sélectionné, cet ion précurseur est exclu pour 90s. Si après 90s l'ion précurseur précédent a toujours été le plus intense du balayage, c'est ce dernier qui a été resélectionné pour la MS/MS. Les ions chargés doublement et triplement ont été sélectionnés et fragmentés avec les énergies de collision préprogrammées suivantes : (i) Pour les ions chargés doublement, les énergies de collision ont été de 25V pour l'intervalle de 400 à 653 m/z, 28V pour l'intervalle 653 à 740m/z, 30V pour l'intervalle 740 à 820 m/z, 35V pour l'intervalle 820 à 1 200 m/z et 55V pour l'intervalle 1 200 à 1 600m/z. (ii) Pour les ions chargés triples les énergies de collision ont été de 14V pour l'intervalle de 435 à 547m/z, 19V entre 547 et 605m/z et 24V lorsque supérieur à 605m/z. Les données brutes de MS/MS ont été transférées du micro-ordinateur du QToF à un serveur de 50 téraoctets et réarrangées automatiquement pour générer une liste de pics en utilisant le logiciel Distiller

version 2.1.0 (<http://www.matrixscience.com/distiller.htmls>) avec les paramètres de sélection de pic portés à 30 pour le ratio signal-bruit (SNR) et à 0,6 pour le seuil de corrélation (CT). La liste des pics a ensuite été cherchée dans la base de données de Universal Protein Resource (UniProt) le 04 Novembre 2008 en employant Mascot (<http://www.matrixscience.com>) version 2.1.04, et la recherche a été limitée à jusqu'à une coupure (trypsine) manquée, une carbamidométhyle alkylation de cystéines corrigée, une oxydation variable de la méthionine, une tolérance de 0,5 unité de masse sur les ions parents, fragmentés et monoisotopiques. La recherche a été limitée à la taxonomie de l'*Homo sapiens* (ID : 9606). Les résultats des identifications des protéines par Mascot (Matrix Science) ont été rendus accessibles via un accès internet protégé par mot de passe (<https://genomequebec.mcgill.ca/nanuqAdministration>).

2.1.6. Le processus de validation

Par test ELISA

Dans chaque cas, les échantillons ont été dilués et le test a été réalisé selon les recommandations du manufacturier (R&D). Dans certains cas, des ensembles ELISA de développement ont dû être utilisés, optimisés et développés lorsqu'aucun ensemble industriel n'était disponible.

Par test enzymatique : pour doser l'alpha-mannosidase

Afin de doser l'activité enzymatique de l'alpha-mannosidase 1A, nous avons utilisé le protocole décrit par Prencz en 1992. La procédure consiste à mélanger : 50µL de tampon d'acétate de sodium (0,25M, pH 4.0), avec 10µL de substrat (4-Methylumbelliferyl α -D-mannopyranoside) et 40µL de plasma. L'acidité du tampon permet d'optimiser la réaction

enzymatique. Nous avons incubé à 37°C pour une période de 1h30min et après la période d'incubation, nous avons ajouté 2mL de solution glycine-KOH (0,25M à pH 10.3, Sigma Aldrich) pour permettre au produit de la réaction enzymatique de devenir fluorescent (en condition basique). Nous avons réalisé une lecture avec un fluorimètre à 365nm (excitation) et à 480nm (émission). Le produit, le 4-méthylumbellifère, (Sigma Aldrich) hautement fluorescent en condition basique a été utilisé pour établir une courbe standard.

Par Immunobuvardage de type Western

Un volume égal de plasma (60µL), correspondant à environ 35µg, a été chargé par puits pour chaque individu sur un gel d'acrylamide d'une concentration de 8%. La migration s'est effectuée durant 30min à 80V et ensuite durant 45min à 160V. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose dans une machine de transfert semi-sèche (Bio-Rad) durant 35min à 10V. Une coloration au rouge ponceau et un dosage des protéines de type BCA ont été effectués pour vérifier la quantité de protéine dans chaque échantillon. Nous avons ensuite marqué la membrane avec les anticorps respectifs suivant la procédure normale d'immunobuvardage de type Western et les recommandations du manufacturier.

2.1.7. Les analyses statistiques

Un test t avec une correction de type Welch a été appliqué aux données pour mesurer la significativité des différences dans l'aire sous la courbe et/ou la hauteur entre les pics appariés des groupes contrôle et CAD. Un test de Fischer a été réalisé lorsque des données de type oui ou non étaient présentes. Nous avons considéré comme significatif, des données avec une valeur p inférieure à 0,05. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism 5.0 (Graphpad).

3. Exposé et analyse des résultats

Tableau IV – Paramètres biologiques, biochimiques et thérapeutiques lors du recrutement des groupes totaux et sélectionnés

Features	Contrôles sélectionnés n=18	iCAD sélectionnés n=18	Contrôles (totaux) n=500	iCAD (totaux) n=271
Âge, moyen (a)	59 ± 2	59 ± 2	56,4 ± 0,4	57,1 ± 0,6
Homme (%)	66,7	66,7	61,0	82,7 ^ψ
Lésion obstructive (n)	0	2,4 ± 0,2	0	2,0 ± 0,8
Tour de taille (cm)	102 ± 5	103 ± 3	96,7 ± 0,6	99,6 ± 0,7*
IMC	32 ± 2	31 ± 1	28,0 ± 0,2	28,4 ± 0,3
Fumeurs (%)	27,8	50,0	17,4	24,7*
Diabète (%)	16,7	33,3	9,4	15,5*
Dyslipidémie (%)	38,9	94,4 ^ψ	41,6	79,0 ^ψ
Hypertension (%)	33,3	33,3	39,6	40,6
RC (f/min)	71 ± 2	67 ± 3	70,0 ± 0,5	67,1 ± 0,6 ^ψ
PAS (mmHg)	130 ± 5	131 ± 6	128,5 ± 0,9	126 ± 1
FE (%)	67 ± 3	52 ± 4 [†]	61,9 ± 0,6	53,3 ± 0,8 ^ψ
Plaquettes (10 ⁹ /L)	213 ± 9	228 ± 17	235 ± 3 [‡]	222 ± 3 [†]
Glucose (mmol/L)	5,5 ± 0,2	6,8 ± 0,6*	5,62 ± 0,05	5,98 ± 0,08 ^ψ
Cholestérol (mmol/L)	5,1 ± 0,2	5,1 ± 0,2	5,23 ± 0,04	4,84 ± 0,07 ^ψ
HDL (mmol/L)	1,32 ± 0,07	1,2 ± 0,1	1,41 ± 0,02	1,13 ± 0,02 ^ψ
LDL (mmol/L)	3,2 ± 0,2	2,9 ± 0,2	3,07 ± 0,04	2,82 ± 0,06 ^ψ
TG (mmol/L)	1,4 ± 0,2	2,3 ± 0,4*	1,73 ± 0,05	2,2 ± 0,1 ^ψ
Apo A (g/L)	1,46 ± 0,05	1,36 ± 0,08	1,54 ± 0,01	1,36 ± 0,01 ^ψ
Apo B (g/L)	1,05 ± 0,07	1,11 ± 0,05	1,05 ± 0,01	1,05 ± 0,02
Lp (a) (g/L)	0,34 ± 0,09	0,5 ± 0,1	0,37 ± 0,02	0,52 ± 0,03 ^ψ
CRP (mg/L)	5 ± 2	4 ± 1	4,2 ± 0,3	4,2 ± 0,4
Insulin (µm/L)	93 ± 16	129 ± 21	71 ± 2	91 ± 5 ^ψ
Folates (nm/L)	26 ± 2	18 ± 3*	29,3 ± 0,4	25,6 ± 0,5 ^ψ
Homocystéine (µmol/L)	9,0 ± 0,7	11,2 ± 0,9*	9,1 ± 0,1	9,7 ± 0,2*
Fibrinogène (g/L)	2,8 ± 0,1	2,9 ± 0,2	2,84 ± 0,03	3,07 ± 0,04 ^ψ
D-dimère (mg/L)	0,32 ± 0,06	0,6 ± 0,2	0,34 ± 0,01	0,49 ± 0,03 ^ψ
Leukocytes (10 ⁹ /L)	6,2 ± 0,4	7,8 ± 0,4 [†]	6,11 ± 0,07	6,9 ± 0,1 ^ψ

Les données montrent la moyenne ± SEM. La valeur-p a été calculée à l'aide d'un test t (ou un test de Fischer pour les pourcentages ou la réponse est oui ou non) entre les cas et les contrôles (* p < 0,05 , † p < 0,01 , ψ p < 0,001) et contrôles n=18 vs contrôles n = 500 (‡p < 0,05).

Le tableau IV présente les paramètres biologiques, biochimiques et thérapeutiques lors de l'enrôlement des individus dans l'étude. La première et la deuxième colonne de données présentent les résultats pour les individus reliés à l'étude pilote réalisée, alors que les colonnes trois et quatre présentent les résultats pour l'ensemble de la cohorte.

À partir du plasma des individus de l'étude pilote, trente-cinq microgrammes de protéines de chaque groupe (n=18) d'échantillons ont été chargés sur un gel 1D-SDS-PAGE de 2,4cm avec un gradient d'acrylamide de 7 à 15%. Les résultats de la séparation 1D-SDS-PAGE sont présentés à la figure 14.

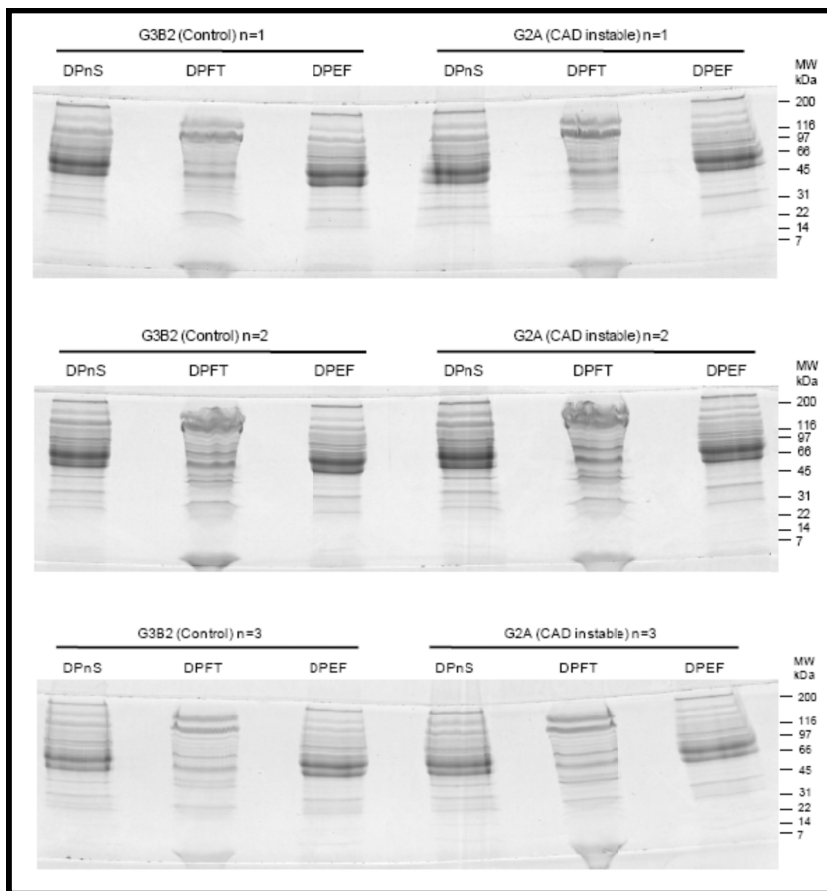


Figure 14 – 1D-SDS-PAGE après IgY14TM et après SuperMixTM

DPnS: Plasma déplété avec IgY14 sans SuperMix; DPFT: Plasma déplété avec IgY14 + fraction non liée après SuperMix; DPEF: Plasma déplété avec IgY14 + fraction liée par la SuperMix.

La figure 14 nous présente les triplicatas réalisés pour chaque approche. Elle nous permet d'observer qu'il semble y avoir peu de différence dans le profil de migration entre le numéro un et le numéro deux, mais quand nous comparons ces deux derniers avec le numéro trois, il semble qu'il y ait eu moins de matériel déposé puisque les bandes sont de plus faibles intensités. Nous voyons qu'il existe une certaine variation qui peut être assez importante même à l'intérieur d'un même groupe d'échantillon analysé en triplicatas.

L'analyse du produit de la migration 1D-SDS-PAGE par MS/MS a permis d'identifier une liste de protéines plasmatiques. Puisque nous avons utilisé des approches complémentaires d'analyses, il est intéressant de comparer les résultats obtenus selon les caractéristiques suivantes : le nombre de protéines identifiées ainsi que le chevauchement entre les différentes approches (*fig.15*).

Nombre de protéines identifiées

Pour l'ensemble de l'étude, nous avons considéré une identification comme étant positive, si la protéine était identifiée avec au moins deux peptides et ce, dans au moins deux des trois réplicatas en utilisant l'approche du *spectral counting*.

Suite à la première approche qui consistait à dépler les échantillons des 14 protéines majoritaires avant de réaliser l'analyse de MS, nous avons été capables d'identifier un total de 108 protéines, dont 5 protéines étaient significativement plus abondantes dans le groupe contrôle et 3 protéines étaient significativement plus abondantes dans le groupe iCAD.

Lorsque nous observons les résultats obtenus suite à l'analyse de la portion déplétée (FT) par la colonne IgY14TM en tandem avec la colonne SuperMixTM, le nombre total de protéines identifiées a été de 125, dont 11 montraient une différence quantitative mesurée

supérieure chez les contrôles contre 8 chez les iCAD. L'évaluation de la portion liée à la colonne (EF), a permis d'estimer l'efficacité de la liaison à cette dernière. Son analyse MS/MS a permis l'identification de 91 protéines qui ont été capturées par la colonne SuperMix™, dont une protéine a présenté une quantité significativement augmentée dans le groupe contrôle contre 3 dans le groupe iCAD. Au final, en combinant les résultats de la portion déplétée (FT) et de la portion liée (EF), il a été possible d'identifier 216 protéines grâce à la déplétion SuperMix™. Après avoir compilé les résultats en supprimant les identifications redondantes, un total de 182 protéines a été identifié par la méthode SuperMix™.

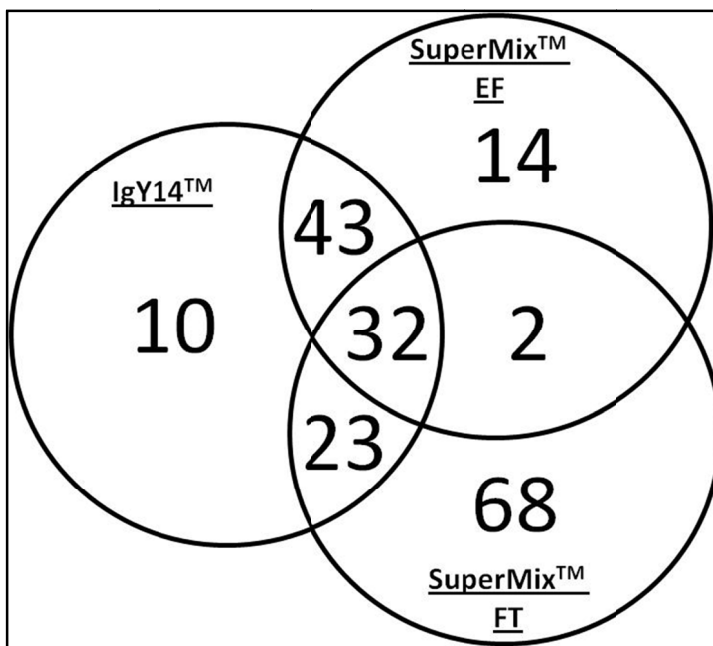


Figure 15 – Diagramme de Venn du nombre total de protéines identifiées pour chaque méthode

Les critères d'une identification positive ont été : 1) identification avec au moins 2 peptides et 2) dans au moins 2 répliquats.

Chevauchement entre les approches utilisées dans les protéines identifiées

Lorsque nous considérons l'ensemble des approches en gel et que nous excluons les protéines qui étaient redondantes entre les méthodes, nous avons pu identifier un total de 192 protéines. Il y a un chevauchement de 26% dans les identifications utilisant les 3 approches en gel, un chevauchement de 31% entre l'approche avec la déplétion IgY14TM et l'approche avec la portion déplétée (FT) de la SuperMixTM, de 61% entre l'approche IgY14TM et l'approche avec la portion liée de la SuperMixTM (EF) et finalement, un chevauchement de 19% entre la portion liée de la SuperMixTM et la portion déplétée de la SuperMixTM.

L'analyse quantitative de chaque protéine identifiée a ensuite permis de détecter les protéines qui montraient des différences intéressantes pour être des candidats biomarqueurs potentiels. Un total de 35 protéines (tableau V) a été identifié montrant une différence quantitative entre le groupe contrôle et le groupe iCAD.

Tableau V – Protéines différentielles identifiées

Niveaux plus élevés chez	Code	Nom de la protéine	Méthode d'identification	valeur p
CONTRÔLE	ADIPO	Adiponectin	IgY14 FT	*
	CBPB2	Carboxypeptidase B2	IgY14 FT	*
	CERU	Ceruloplasmin	IgY14 FT	0,023
	CHLE	Cholinesterase	IgY14 FT	*
	CPN2	Carboxypeptidase N subunit 2	SM FT	0,017
	CPN2	Carboxypeptidase N subunit 2	SM EF	*
	CXCL7	Platelet basic protein	IgY14 FT	*
	CXCL7	Platelet basic protein	SM FT	0,0041
	EPCR	Endothelial protein C receptor	SM FT	*
	FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	SM EF	0,035
	GPX3	Glutathione peroxidase 3	SM FT	0,048
	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	SM FT	*
	IBP7	Insulin-like growth factor-binding protein 7	SM FT	*
	ICAM	Intercellular adhesion molecule 1	SM FT	*
	IGF2	Insulin-like growth factor II	SM FT	0,001
	LYAM1	L-selectin	SM FT	0,002
	MA1A1	1,2-alpha-mannosidase IA	SM FT	*
	MBL2	Mannose-binding protein C	IgY14 FT	*
	SODE	Extracellular superoxide dismutase	SM FT	*
	VASN	Vasorin	SM FT	0,034
ZPI	Protein Z-dependent protease inhibitor	IgY14 FT	*	
iCAD	A0N5G5	Rheumatoid factor D5 light chain	SM EF	*
	AFAM	Afamin	SM FT	*
	AMBP	Adrenomedullin binding protein	SM FT	0,047
	AOC3	Membrane primary amine oxidase	SM FT	*
	CLUS	Clusterin	IgY14 FT	0,028
	DPP4	Dipeptidyl peptidase 4	SM FT	*
	ECM1	Extracellular matrix protein 1	SM EF	*
	FHR1	Complement factor H-related protein 1	SMEF	*
	GELS	Gelsolin	SM FT	*
	HABP2	Hyaluronan-binding protein 2	IgY14 FT	*
	MASP1	Complement-activating component of Ra	SM FT	*
	PGRP2	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	SM FT	*
	SEPP1	Selenoprotein P	IgY14 FT	*
	TENA	Tenascin	SM FT	*
	TTHY	Transthyretin	SM FT	*
	ZPI	Protein Z-dependent protease inhibitor	SM FT	*

* : La protéine était en quantité inférieure à la limite de détection de la technique ou absente de l'échantillon dans un groupe, donc aucune valeur p n'a pu être calculée.

Pour ce qui est de l'approche utilisant la LC, c'est-à-dire le système PF2D, nous avons effectué l'analyse des profils UV obtenus. Pour chaque groupe, trois échantillons ont été passés en alternant chaque fois entre le groupe Contrôle et le groupe iCAD pour atténuer les variations expérimentales. Ainsi, un total de six séries de profils a dû être analysé. Nous avons tout d'abord commencé par effectuer un appariement des pics entre le groupe contrôle et le groupe iCAD à l'aide du logiciel fourni par le manufacturier (Mapping Tools, Beckman Coulter). Toutefois, nous nous sommes rendu compte que l'appariement ne pouvait pas se faire de façon toujours adéquate, car certains pics n'étaient pas correctement détectés. Ainsi, nous avons fait un retour en arrière dans les données brutes et à l'aide du logiciel 32Karat fourni par Beckman Coulter, nous sommes arrivés à corriger les données de sorte qu'aucun pic réellement présent ne soit omis ou mal attribué. Pour ce faire, nous avons manuellement pris chaque profil et nous avons vérifié les facteurs suivants : i) tous les pics visuellement détectables à l'œil ont été bien identifiés par le logiciel, ii) le point de départ et le point marquant la fin du pic a été correctement attribué et finalement, iii) la valeur de la ligne de base n'a pas été attribuée de manière aberrante (*fig.16*). Durant cette étape de nettoyage des profils, un logiciel a été développé avec la collaboration de Philippe Comtois, PhD, chercheur à l'Institut de Cardiologie de Montréal, afin de pouvoir analyser et interpréter plus facilement l'immensité des données créées par les analyses protéomiques. Nous sommes arrivés à mettre au point un logiciel qui peut lire les tables de données comportant l'appariement des pics, leur point isoélectrique, le temps de rétention, la hauteur du pic et l'aire sous la courbe du pic et de les trier afin de sélectionner seulement i) les pics présents dans les trois répliquas d'un même groupe et ii) les pics qui étaient présents dans les trois répliquas dans les deux groupes. Nous avons donc été très rigoureux dans l'analyse des pics différentiels afin de diminuer les causes possibles d'erreurs. Ainsi, un pic qui n'était pas présent de manière constante dans les répliquas était automatiquement exclu de la liste des pics d'intérêt. Ensuite, une analyse quantitative a été effectuée sur les fractions sélectionnées afin de vérifier s'il y avait des différences significatives ($p < 0,05$) entre le plasma des individus contrôles et celui des individus iCAD. Ce sont les valeurs de l'aire sous la courbe et de la hauteur du pic qui ont

été comparées afin d'établir la liste des fractions d'intérêt. Les fractions qui ont présenté une stabilité dans les réplicatas et qui présentaient une différence statistiquement significative ont été regroupées dans le tableau VI. Les fractions sont exprimées en fonction de leur point isoélectrique, leur localisation dans la plaque de 96 puits et le temps de rétention auquel le pic en question sort en deuxième dimension.

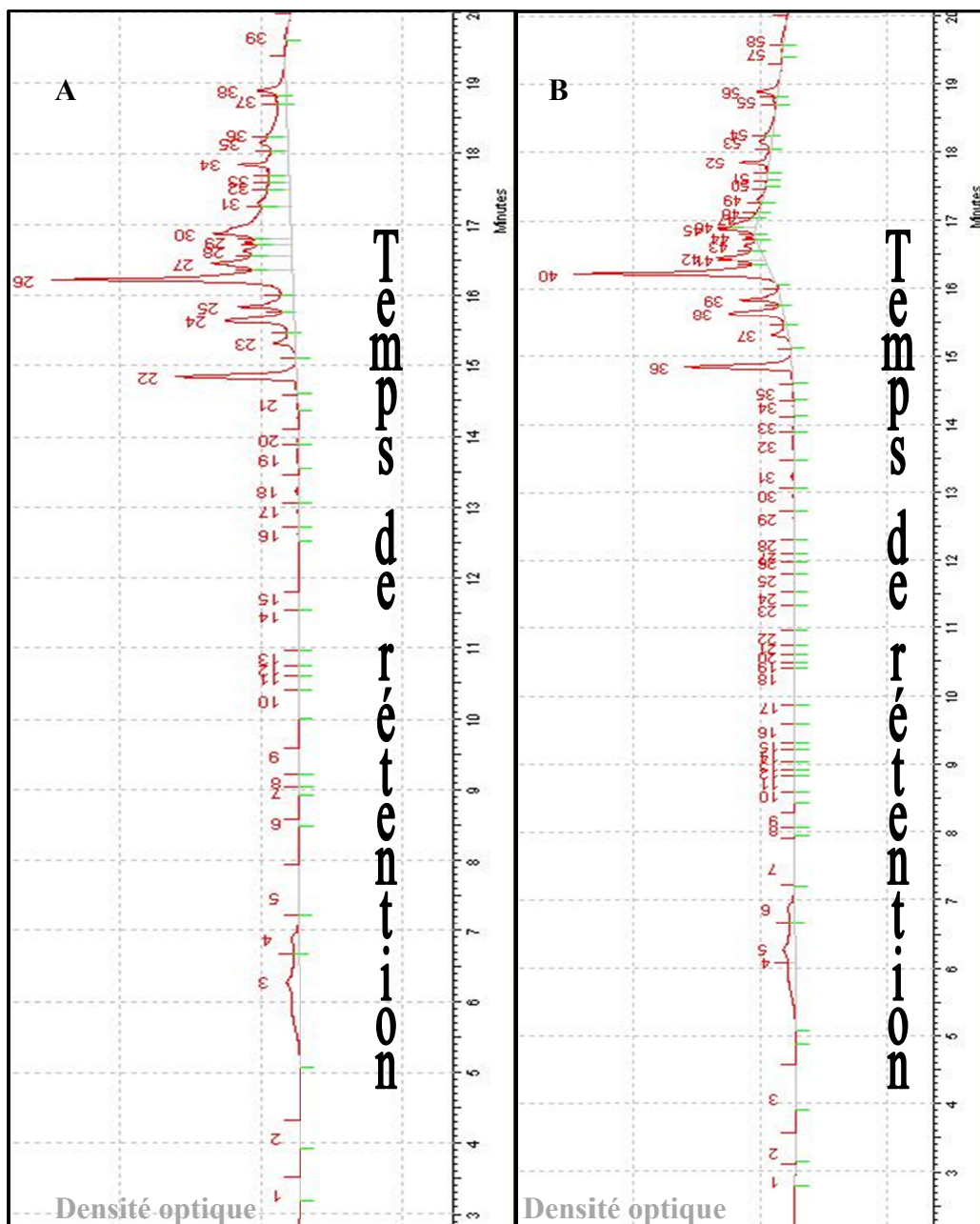


Figure 16 - Profil UV de 2^e dimension avant (A) et après (B) nettoyage manuel

Le nettoyage des profils consistait à manuellement ajouter des pics non détectés par le logiciel, ajuster le point du début et le point de la fin de chaque pic et finalement, réajuster la ligne de base de sorte que chaque valeur numérique de hauteur et d'aire représente bien la vraie valeur du pic. La ligne grise représente la ligne de base, la ligne rouge décrit le profil UV de l'échantillon, les lignes vertes représentent le début et la fin de chaque pic. En abscisse, nous avons le temps de rétention en minutes et en ordonnée, nous avons la densité optique.

Tableau VI - Fractions d'intérêt identifiées par la séparation PF2D

pH	Fraction	Temps de rétention (min)	
		Niveaux supérieurs mesurés chez les contrôles	Niveaux supérieurs mesurés chez les iCAD
>8.40	A1	-	-
>8.40	A2	4.73 - 10.91	-
>8.40	A3	-	-
>8.40	A4	15.29	14.74
>8.40	A5	-	-
>8.40	A6	10.77 - 11.38 - 11.50	-
>8.40	A7	10.54 - 10.77 - 11.41 - 11.94 - 11.53	-
>8.40	A8	-	-
8.40-8.38	A9	-	-
8.38-8.30	A10	9.69	-
8.30-8.00	A11	9.69	-
8.00-7.70	A12	-	-
7.70-7.40	B12	6.46	-
7.40-7.09	B11	-	-
7.09-6.79	B10	-	15.30
6.79-6.49	B9	13.05	-
6.49-6.19	B8	-	-
6.19-5.89	B7	-	-
5.89-5.59	B6	11.52 - 11.69	-
5.59-5.29	B5	8.43 - 12.69	9.27
5.29-4.99	B4	-	-
4.99-4.69	B3	11.70	-
4.69-4.39	B2	12.75	-
4.39-4.10	B1	-	-
<4.10	C1	-	-
<4.10	C2	-	-
<4.10	C3	9.73	-
<4.10	C4	13.49	-
<4.10	C5	6.96	-
<4.10	C6	9.05 - 19.65	-
<4.10	C7	12.52	-
<4.10	C8	9.98 - 11.55	-
<4.10	C9	-	-
<4.10	C10	-	-
<4.10	C11	-	-
Total Nombre Pics		29	3

La fraction B5 du tableau VI a été sélectionnée pour approfondir les analyses. Cette fraction B5 a été choisie, puisqu'elle a présenté plusieurs pics d'intérêt augmentés dans le groupe contrôle et dans le groupe iCAD. De plus, la fraction B5 a été retrouvée dans un intervalle de pH situé dans une zone bien caractérisée (environ au milieu du gradient de pH) comparativement à la fraction A4 où l'on retrouve aussi un pic augmenté chez les contrôles et un chez les iCAD, mais ce dernier se situait dans une zone de pH plus extrême (supérieure à 8,4) et constituait selon nous un résultat probablement moins fiable. En effet, dans les portions extrêmes du gradient de pH (au début ou à la fin), il y a une portion qui n'est pas bien caractérisée puisqu'à ce moment ce sont toutes les protéines avec un point isoélectrique supérieur à 8,4 qui sortiront, sans toutefois que nous contrôlions l'ordre dans lesquelles elles sortent. Le profil de la fraction B5 illustré à la figure 17 en rouge est le profil du groupe iCAD et en vert le profil du groupe contrôle.

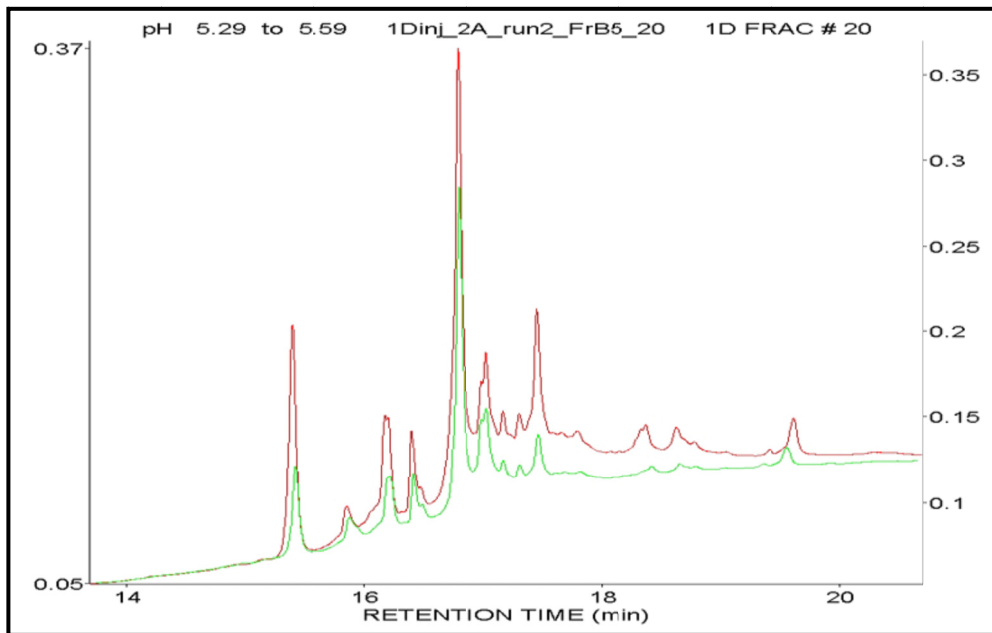


Figure 17 - Profil de la fraction d'intérêt B5 séparée par le module de 2D
L'axe des ordonnées représente la densité optique.

Comme nous pouvons le constater sur la figure 17, il y a présence de différences entre le profil du groupe iCAD et celui du groupe contrôle. Les fractions qui ont présenté

une différence suffisamment grande pour être significative ont été sélectionnées et analysées plus profondément. Nous pouvons observer à la figure 18, un exemple d'une fraction qui a présenté une grande différence quantitative entre les deux groupes en comparaison et une autre fraction qui a présenté une différence qualitative, soit un pic qui était présent dans un seul des deux groupes.

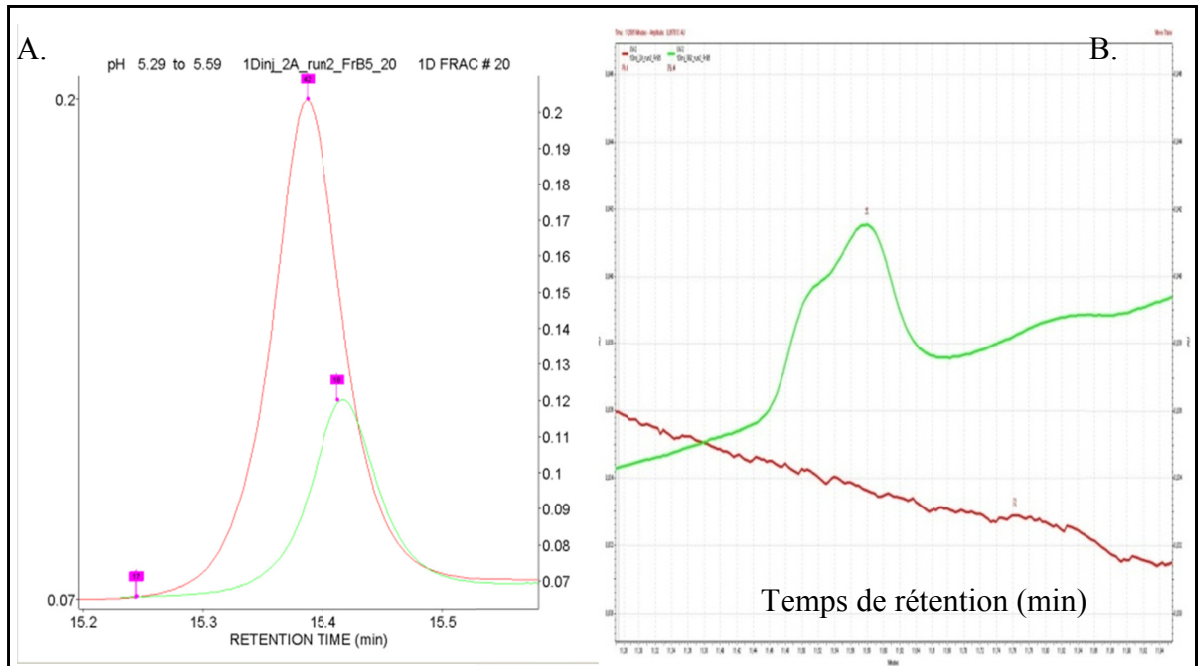


Figure 18 – Profil UV montrant des différences significatives observées par le système PF2D

La fraction B5 montre une différence quantitative (en A) et une différence qualitative (en B) dans les niveaux de protéines mesurées (rouge : iCAD et vert : contrôle). L'axe de l'ordonnée représente la densité optique.

Du profil de la fraction B5 (fig. 17), un total de dix fractions (5 pics X 2 groupes) a été sélectionné pour des analyses en MS. De ces analyses, plusieurs protéines ont été identifiées (voir tableau VII).

Tableau VII – Liste des protéines identifiées montrant des différences intéressantes entre les deux groupes pour la fraction B5

Nom de la protéine	Nb. Peptides (iCAD)	Nb. Peptides (Contrôle)
Fraction de 1D (B5)		
Antithrombin-III	3	1
Apolipoprotein A-1	6	4
Complement Factor H	5	2
Complement component C7	5	3
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	6	2
Kininogen 1	4	1
Serum Albumin	14	9
Transthyretin	4	2
Zinc-alpha-2-glycoprotein	11	6
Fraction de 2D de B5 [A11(ctl) et E3 (iCAD)]		
Beta-2-glycoprotein 1	5	1
Complement factor H	38	5
Extracellular matrix protein 1	10	4
Fraction de 2D de B5 [A7(ctl) et D2 (iCAD)]		
Retinol-binding protein 4	0	2
Fraction de 2D de B5 [A12(ctl) et E4 (iCAD)]		
Plasminogen	3	0
Kininogen	4	1
Fraction de 2D de B5 [A4(ctl) et D5 (iCAD)]		
Retinol-binding protein 4	1	3

Sachant que les études de protéomiques peuvent induire des erreurs d'identification de type faux positif, il s'avère important de valider chaque candidat biomarqueur par un dosage dans le plasma de chaque patient. Nous avons réalisé des tests quantitatifs, soit par ELISA, soit par Immunobuvardage de type Western ou bien par test enzymatique sur une sélection de candidats d'abord dans les plasmas poolés ayant servis pour la présente étude (n=36) puis dans chacun des 1006 plasmas de la cohorte de patients. Les résultats des tests effectués sont illustrés dans les figures suivantes : pour l'adiponectine, aux figures 19 et 21,

pour la protéine de base des plaquettes (CXCL7), aux figures 20 et 22, pour la mannosidase (MA1A1), à la figure 23 et pour le complément facteur H, aux figures 24 et 25.

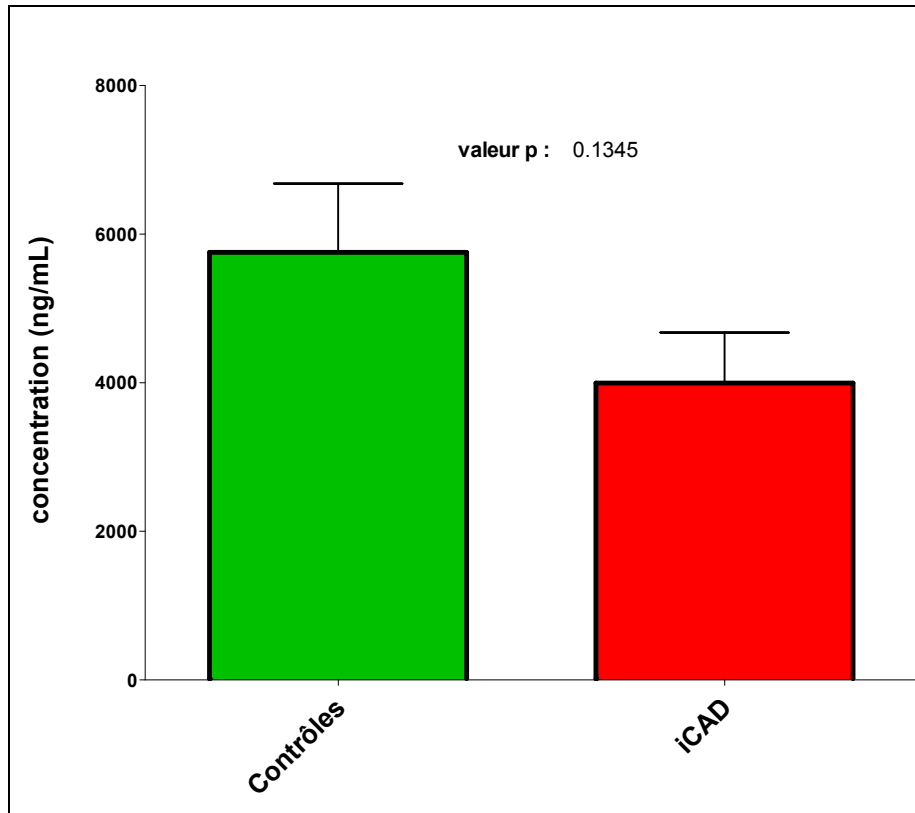


Figure 19 – Concentration plasmatique d’adiponectine (individus sélectionnés)

Un test ELISA a été effectué sur le plasma des individus de l’étude pilote (n=36). Chaque échantillon a été déposé séparément et en duplicatas sur un ensemble Human Total Adiponectin/Acrp30 Immunoassay (cat. DRP300, R&D systems). La moyenne mesurée a été de (3 995 ± 678) ng/mL pour les iCAD et de (5 754 ± 926) ng/mL pour les individus contrôles.

Pour l’étude avec les individus sélectionnés (n=36) de la concentration plasmatique en adiponectine, nous ne sommes pas parvenus à atteindre une différence significative entre les 2 groupes, mais la tendance avec les résultats MS était respectée.

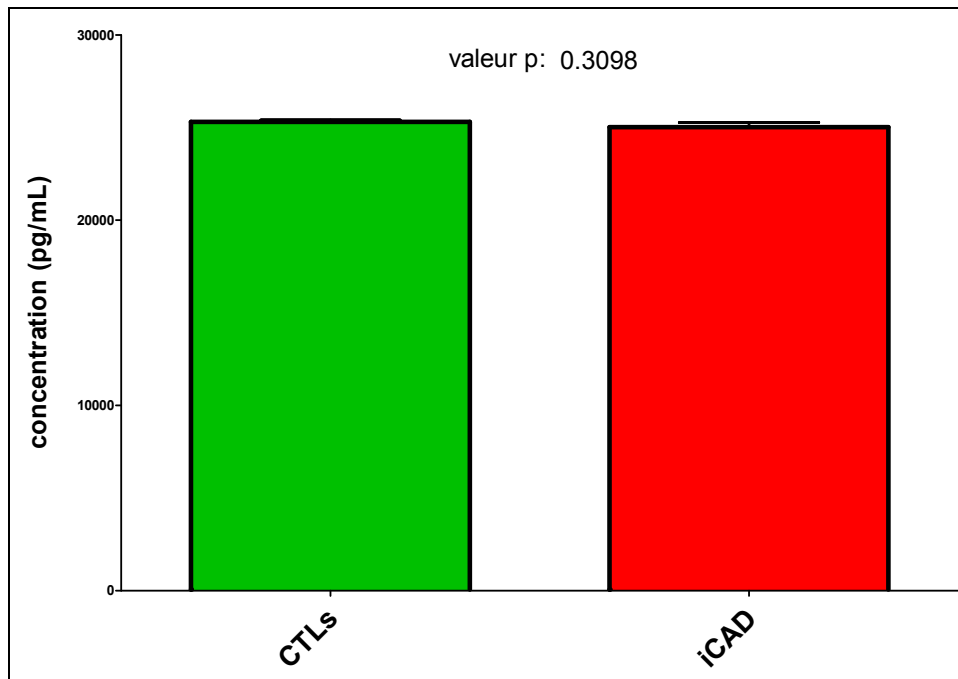


Figure 20 – Concentration de CXCL7 (individus sélectionnés)

Test ELISA effectué sur les individus de l'étude pilote (n=36). La moyenne mesurée a été : (25029 ± 244) pg/mL pour les iCAD et (25 309 ± 113) pg/mL pour les contrôles. Aucune différence significative entre les groupes avec n=36.

Puisque nous avons encore une fois observé une certaine tendance allant avec la tendance observée avec l'analyse MS entre les individus dans le groupe contrôle et ceux du groupe iCAD, mais que cette différence ne s'avérait pas significative, nous avons entrepris une phase de validation sur la banque complète de plasma (n=1006) afin de tenter de faire ressortir cette différence en augmentant le nombre d'individus (n). Les figures 21, 22 et 23 présentent les résultats obtenus jusqu'à ce jour. Notez que dans ces figures, un nouveau groupe est introduit (sCAD). Il s'agit de patients qui ont manifesté de l'angine stable, c'est-à-dire des douleurs à l'effort par exemple, mais sans IM répertorié. Ce groupe n'a pas fait partie de l'étude de protéomique, mais il constituait un groupe de 235 patients de notre

banque de 1006 individus. Ainsi, nous avons procédé aux analyses quantitatives de ce groupe également afin d'avoir la possibilité d'observer une certaine modulation entre les sujets contrôles et l'autre extrême que constituait le groupe iCAD.

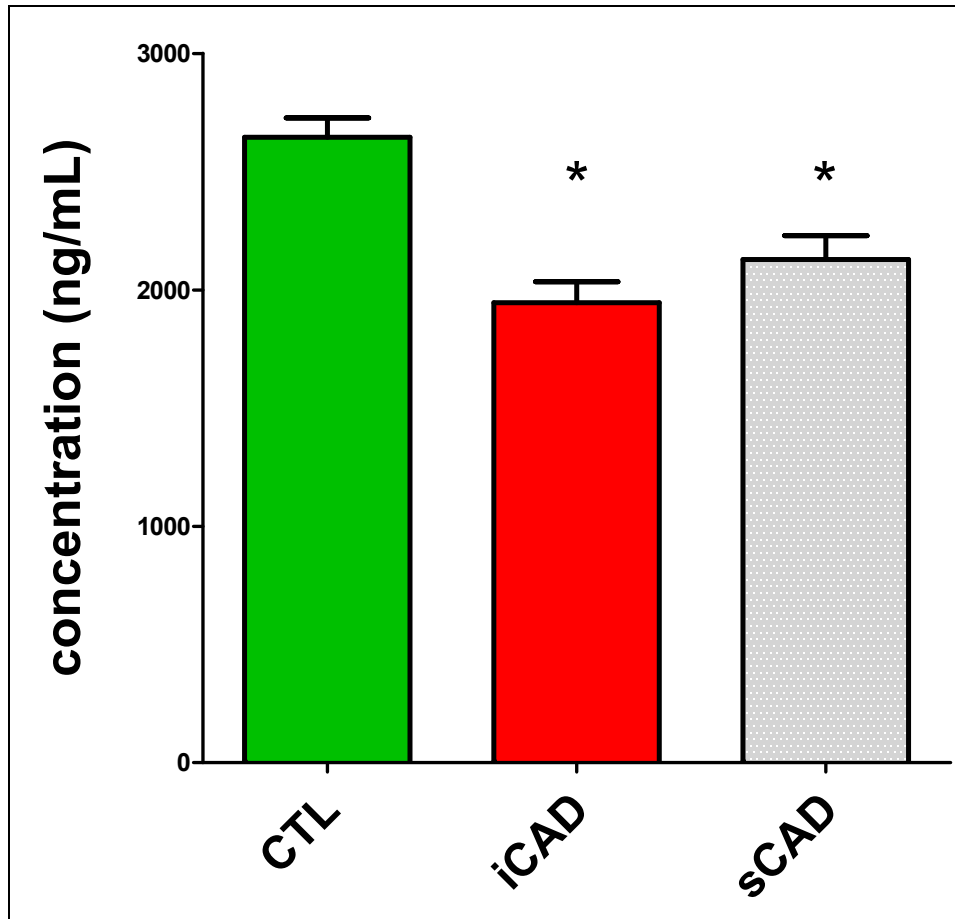


Figure 21 - Concentration d'adiponectine (pour la cohorte totale)

La concentration mesurée en adiponectine a été de $(2\,646 \pm 82)$ ng/mL pour le groupe contrôle ($n=367$), de $(1\,946 \pm 88)$ ng/mL pour le groupe iCAD ($n=197$) et de $(2\,129 \pm 101)$ ng/mL pour le groupe sCAD ($n=152$). Une différence significative ($p^* < 0,0001$) a été mesurée entre le groupe contrôle et le groupe iCAD ainsi qu'entre le groupe contrôle et le groupe sCAD.

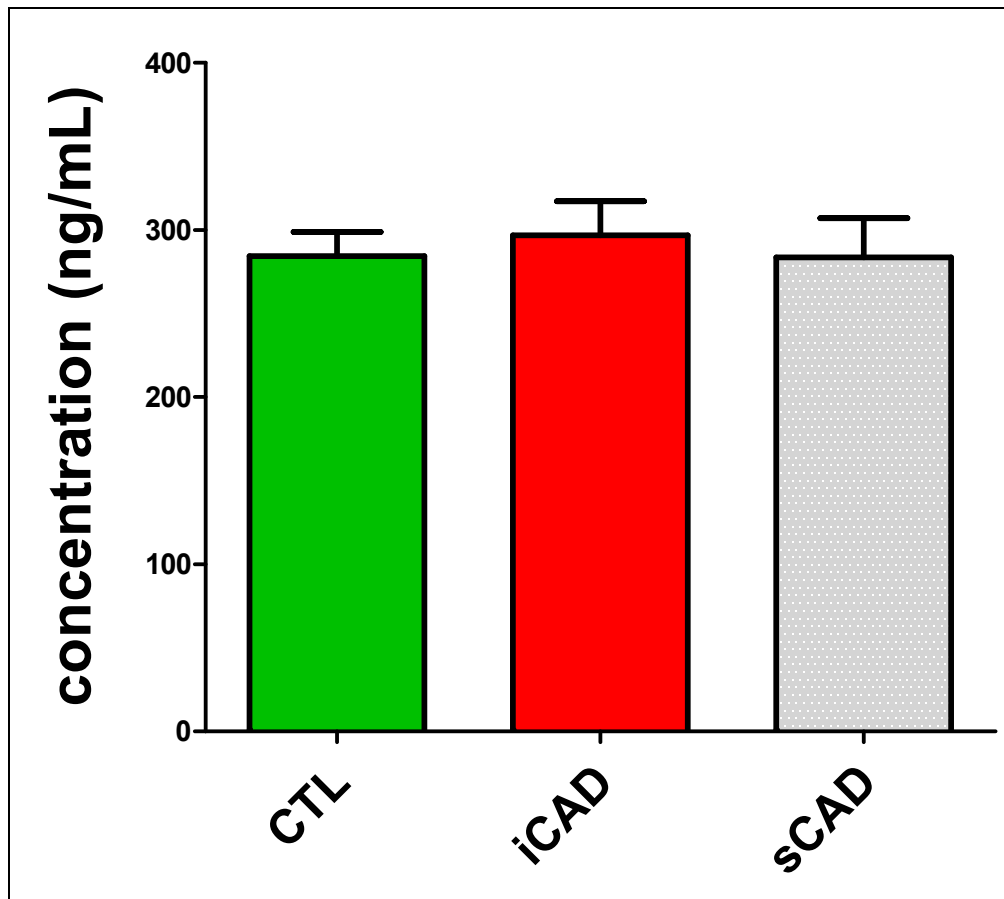


Figure 22 – Concentration du CXCL7 (pour la cohorte totale)

La concentration mesurée en CXCL7 a été de (284 ± 15) ng/mL pour le groupe contrôle (n=356), de (297 ± 20) ng/mL pour le groupe iCAD (n=193) et de (284 ± 23) ng/mL pour le groupe sCAD (n=144). Les différents groupes n'ont pas présentés de différences significatives (valeur p : 0,62 entre les contrôles et les iCAD).

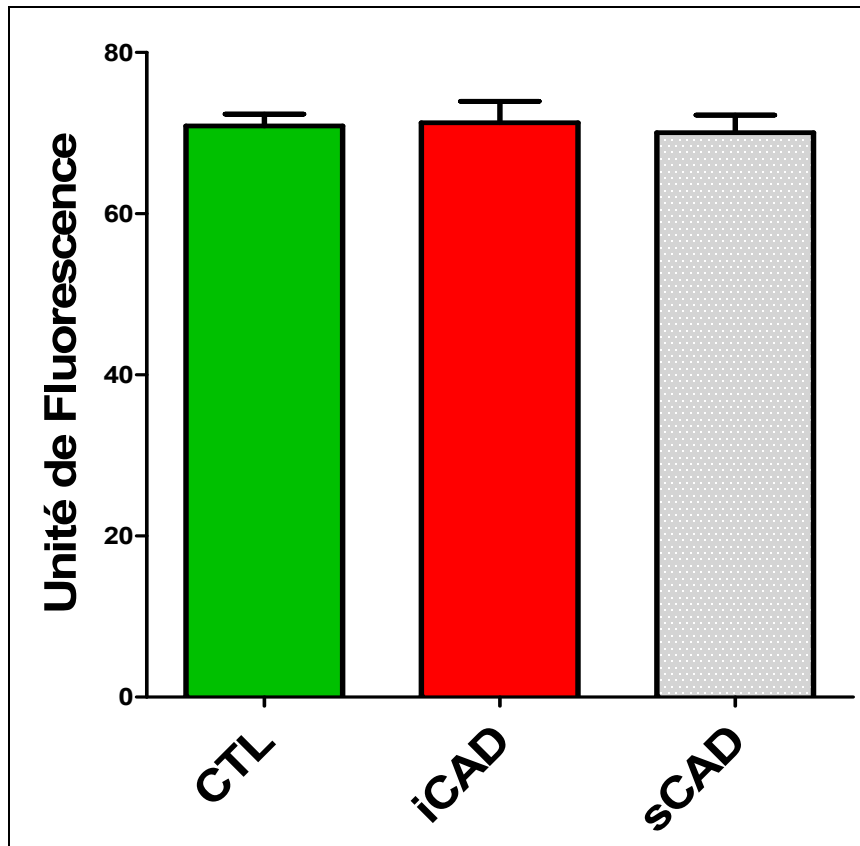


Figure 23 – Dosage de l’activité enzymatique pour la Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA (MA1A1) pour la cohorte totale

La fluorescence produite suite à la lyse du résidu 1,2 alpha du substrat 4-Methylumbelliferyl α -D-mannopyranoside par la mannosidase plasmatique ne montre aucune différence significative quant à l’efficacité enzymatique entre le groupe contrôle et le groupe iCAD. Les intensités moyennes ont été de (71 ± 1) unités (u) pour le groupe contrôle ($n=367$), de (71 ± 3) u pour le groupe iCAD ($n=197$) et de (70 ± 2) u pour le groupe sCAD ($n=152$). Valeur $p = 0,90$ entre les contrôles et les iCAD.

Nous avons analysé par MS une sous-fraction de B5 qui présentait un pic UV variant très fortement entre les 2 groupes (*fig.18A*). Dans la liste des protéines identifiées dans cette fraction commune aux deux groupes, nous avons recherché celle qui présentait

également la plus grande variation quantitative entre les deux groupes. Il s'agissait du complément facteur H. Nous avons par la suite procédé à une étape de validation pour cette protéine en analysant chaque échantillon de plasma par la technique d'immunobuvardage de type Western (*fig.24*).

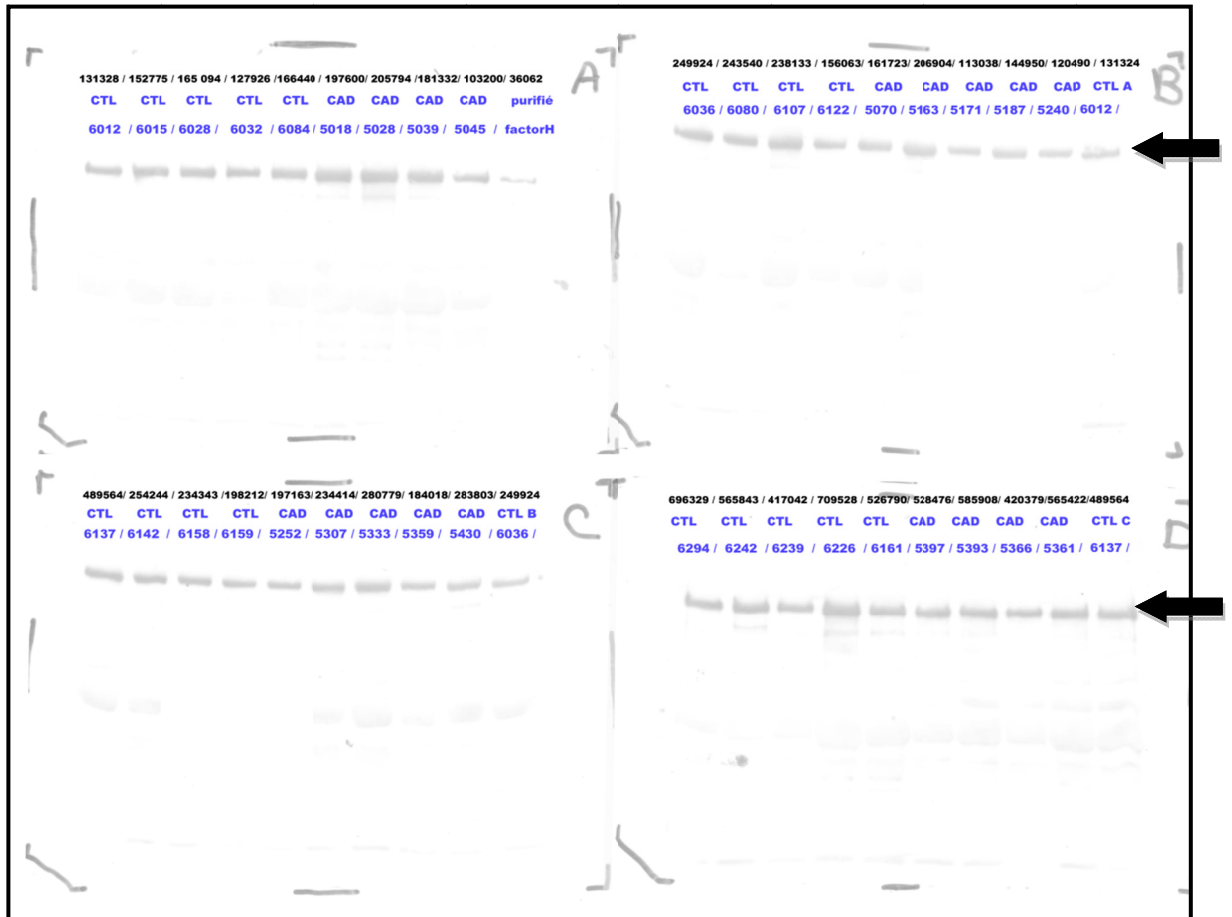


Figure 24 – Immunobuvardage de type western pour le facteur H de chacun des 36 échantillons de plasmas sélectionnés pour l'étude

Un gel 8% a été utilisé pour faire migrer 35 µg/puits de protéines durant 30 min à 80 V et 45 min à 160 V. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose où elles ont été marquées avec un anticorps anti-facteur H provenant du mouton (Abcam ab8842-1, dilution 1:100). L'anticorps secondaire utilisé pour la

révélation était un anti-mouton couplé HRP. La membrane a ensuite été révélée avec le kit de révélation ECL+ (Perkin Elmer). Le complément facteur H est représenté par la bande noire montrée par la flèche aux alentours de 170 kDa. La dernière colonne de la membrane « A » a été chargée avec 0,2 µg de la protéine purifiée (facteur H) à titre de référence.

Les valeurs d'intensité de gris ont ensuite été mesurées avec le logiciel Photoshop de la compagnie Adobe. Les valeurs sont représentées graphiquement à la figure 25.

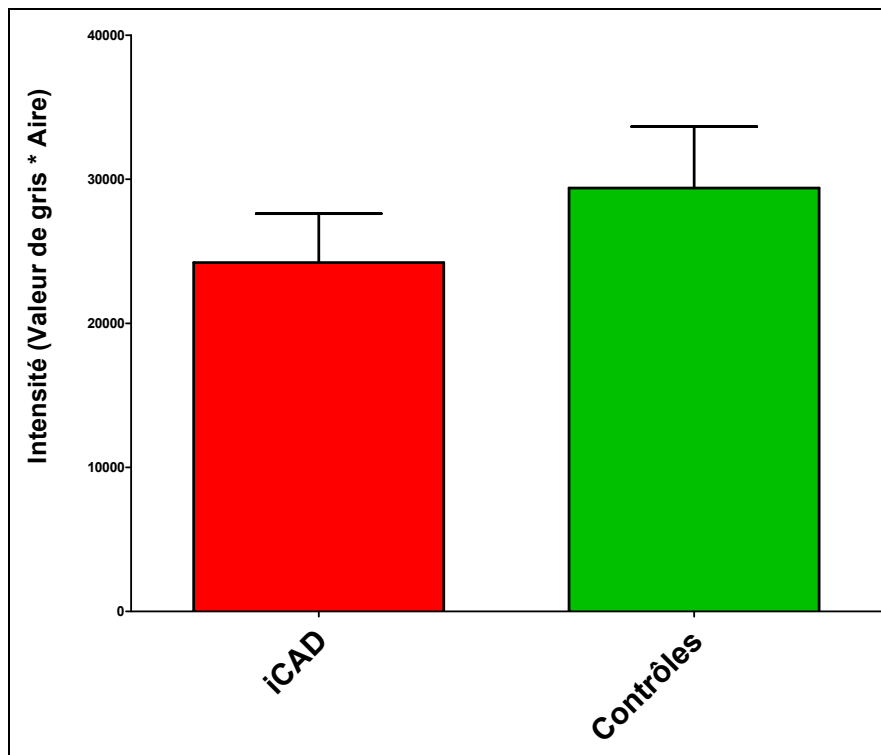


Figure 25 – Valeurs d'intensité de gris pour le complément facteur H

Valeurs mesurées à partir des échantillons de la phase pilote (n=36). Aucune différence significative n'a toutefois été observée (valeur $p = 0,35$).

4.1.1. Discussion générale

4.1.2. Homogénéité et différences dans la banque de patients

Le tableau IV nous a permis de montrer que la population contrôle de l'étude pilote représente bien l'ensemble de la population contrôle totale puisqu'il y a très peu de variations significatives entre ces deux ensembles. Le seul paramètre qui varie significativement pour les deux ensembles contrôles a été dans le nombre de plaquettes sanguines. Ceci peut se justifier par différentes raisons. Tout d'abord, il est important de mentionner que le nombre de plaquettes sanguines peut varier de façon significative d'un individu à l'autre. Les taux normaux peuvent varier entre 150 000 à 400 000 plaquettes par mm^3 . Les maladies infectieuses sont souvent une source qui fait varier considérablement le nombre de plaquettes par exemple. Les résultats de décompte plaquettaire obtenus, bien qu'ils présentent une variation significative entre les deux ensembles, se retrouvent tout à fait à l'intérieur des balises standards.

Lorsque nous observons les résultats entre les patients iCAD de l'étude pilote et la totalité des patients iCAD de l'étude, nous pouvons observer une plus grande variation. Nous n'avons pas réalisé de statistiques afin de comparer si la population de iCAD de l'étude pilote représentait bien la population totale de iCAD de l'étude puisque nous avons spécialement choisi les cas les plus extrêmes et donc nous nous attendions à ce que les patients iCAD de l'étude pilote ne représentent pas nécessairement l'ensemble des individus iCAD. Cette approche avait pour but, encore une fois, d'optimiser la détection de différence entre ce groupe iCAD extrême et les contrôles sans lésion lors de l'angiographie.

Des paramètres biologiques mesurés lors de l'enrôlement, nous pouvons déjà observer une certaine tendance qui présente des différences significatives entre le groupe contrôle et les iCAD et ceci, autant pour l'étude pilote que pour l'étude totale. Le tableau IV montre bien des différences entre les deux groupes qui s'apparentent au syndrome métabolique. Ce

syndrome métabolique représente une certaine controverse parmi les spécialistes qui n'arrivent pas à se mettre en accord afin de bien le définir. Mais la présente étude présente plusieurs des caractéristiques qu'y se retrouvent généralement dans la définition relativement bien acceptée du syndrome métabolique. Mentionnons, par exemple, les différences significatives au niveau du pourcentage de diabétiques, du tour de taille, des taux de TG, des taux de HDL et des niveaux de glucose.

4.1.3. La séparation des protéines

La figure 14 présente les profils de migration sur gel 1D-SDS-PAGE du plasma. Cette figure permet d'observer visuellement la reproductibilité des triplicatas. Nous observons, sur cette figure, que la migration des 2 premiers réplicatas semble assez similaire, mais que pour la migration 3 (3^e réplicatas), il semble visuellement y avoir moins de matériel que dans les deux premiers cas. Une cause qui peut expliquer cette variation est une mauvaise évaluation de la quantité totale de protéines par le dosage BCA causant par la suite la charge d'une quantité inférieure à 35 µg dans le puits de migration pour ce 3^e réplicatas ou bien une différence dans la performance de la colonne de déplétion. La figure 14 montre également une similitude plus importante entre les profils de migration des échantillons déplétés avec la colonne IgY14 mais sans SuperMix (DPnS) et la fraction éluée de la SuperMix (DPEF); ce résultat concorde avec les identifications effectuées (section Chevauchement entre les identifications de la section des résultats) qui présentent aussi un chevauchement plus important entre ces deux approches qu'avec les autres. En effet, la portion DPnS devrait être en théorie la somme des identifications de la portion DPEF et de la portion représentant la portion déplétée par la SuperMix (DPFT). Il est logique de conclure que lorsque nous analysons les 2 fractions (le FT et EF), nous devrions obtenir les mêmes résultats que les identifications obtenues avec le matériel de départ, soit la portion DPnS. Or, ce n'est pas tout à fait cela qui se produit, en effet, nous pouvons observer que certaines protéines sont exclusivement identifiées par une technique, mais pas dans d'autres

approches. Nous pouvons ainsi conclure que les identifications sont modulées selon la méthode utilisée pour les obtenir. Ceci étant maintenant connu, il s'avère donc très important d'utiliser des méthodes qui sont complémentaires afin de s'assurer de valider certains candidats ou de ne pas omettre l'identification de certains autres.

Le fractionnement par chromatographie bi-dimensionnelle PF2D génère des spectres UV (*fig.16, 17 et 18*) permettant de visualiser plus aisément les portions présentant des différences. Par contre, ces spectres UV amènent également une difficulté de plus pour l'analyse, car la densité optique d'un pic ne correspond pas nécessairement à l'abondance d'une protéine. En effet, il peut y avoir plusieurs protéines qui sortent pour un même pic (problème apparenté au gel SDS-PAGE). Ces spectres UV permettent toutefois d'établir des profils caractéristiques des différents stades d'une pathologie. Ces profils pourraient éventuellement servir aux cliniciens afin d'aider à établir ou confirmer un diagnostic. L'étape suivante consiste à confirmer la validité de ces profils en les recherchant non plus dans un regroupement de plasmas (ou *pool*), mais dans une large banque de plasmas pris individuellement. Par contre, la méthode crée une quantité importante de données qui représente un travail d'analyse important.

4.1.4. Le nombre de protéines identifiées

Notre étude a permis d'identifier plusieurs protéines plasmatiques et une trentaine de candidats à titre de biomarqueurs. Pour la technique utilisant la séparation par gel 1D-SDS-PAGE, parmi les protéines identifiées les plus faiblement abondante, il y a le complément C2, avec une concentration habituelle de 0,02 mg/mL dans le plasma (Colombani, 1993) et la protéine C-réactive avec une concentration habituelle en dessous de 0,01 mg/mL (Source : Wikipédia). Ceci représente donc une plage dynamique d'identification de l'ordre d'environ 10^5 à 10^6 . Selon l'organisme HUMAN Proteome Organisation (HUPO), le nombre de protéines à ce jour répertorié dans le plasma est de 3020 (Omenn, 2005). Notre

étude révèle un nombre de protéines détectées inférieur à ce nombre de référence. Voici quelques raisons qui peuvent justifier ceci.

Il faut tout d'abord mentionner que cette référence fournie par l'HUPO a été établie à la suite d'une méta analyse multicentrique réalisée en 2002. En effet, ce nombre résulte d'une analyse effectuée dans 35 laboratoires participants, et ce, dans 13 pays. Chaque laboratoire a eu le contrat d'analyser les échantillons plasmatiques fournis par l'HUPO et d'utiliser une méthode au choix du laboratoire afin de pousser au maximum les limites de détection. Les 3020 protéines identifiées résultent donc de plusieurs analyses, dans plusieurs laboratoires avec des méthodes de détection et d'analyse différentes. Et comme le montre bien cette étude, les protéines identifiées sont souvent modulées par la méthode de détection utilisée, ainsi il serait très difficile, voir même impossible, d'arriver à un tel résultat en utilisant une seule méthode de détection.

Cela étant dit, il faut également considérer le fait que pour l'analyse protéomique en gel, un gel à 1D a été utilisé pour la séparation. Le gel 1D offre un moins bon fractionnement (faible résolution) des protéines et ceci va affecter considérablement la détection de protéines. En effet, plus la complexité d'un échantillon est grande, plus le pouvoir d'identifier toutes les protéines le constituant diminue. Cette méthode utilisant le gel 1D voulait tester la pertinence de déléter davantage un échantillon en remplacement d'une séparation plus poussée. J'émet l'hypothèse que la séparation 1D n'était probablement pas assez poussée pour la détection d'un plus grand nombre de protéines. De plus, le gel a été coupé en 15 bandes de façon automatique comme le montre la figure 11. Par contre, certaines bandes montrant visuellement peu de matériel ont été regroupées. Encore une fois, cette étape voulant diminuer les coûts de MS a probablement fait en sorte d'empêcher l'identification de certaines protéines en augmentant la complexité de l'échantillon à analyser par MS.

Quant aux résultats de la fraction analysée de la séparation avec le système PF2D, nous n'avons pas identifié toutes les fractions en MS. Cela ne constituait pas le but de cette méthode et cela aurait été beaucoup trop dispendieux. Le but premier de cette méthode était d'offrir une façon d'optimiser l'analyse MS en réalisant une présélection des fractions

présentant des intérêts particuliers et de faire l'analyse de ces fractions seulement afin de diminuer les coûts d'analyse MS. Lorsque nous observons les résultats des protéines identifiées pour une seule fraction après la séparation en 1D, nous obtenons un nombre de 36 protéines identifiées (résultat non présenté). L'échantillon a été séparé en 35 fractions, chaque fraction possède un nombre de protéines qui lui est propre en fonction du point isoélectrique des protéines qui constituent l'échantillon. Ainsi, il est difficile d'estimer le nombre de protéines qu'il serait possible d'identifier au total avec cette méthode, mais nous pouvons probablement parler d'un nombre au moins supérieur à 1000 protéines. Ceci nous rapproche de la valeur de référence donnée par l'HUPO. Parmi les protéines identifiées, la protéine la plus faiblement abondante identifiée serait l'interleukine 25 avec une concentration habituelle inférieure à 50 pg/mL. Ceci représente une plage dynamique d'identification d'ordre d'environ 10^{10} à 10^{11} .

Bien entendu, en protéomique, plus nous en faisons, mieux c'est. Ainsi, il aurait pu être plus juste de combiner les méthodes afin de déléter davantage tout en séparant davantage également, mais tout ceci avait un coût qu'il faut considérer également! Et il faut noter que plus nous manipulons un échantillon, plus nous effectuons de procédures sur ce dernier, plus les risques de dégradation ou d'introduire des variations augmentent. Ceci représente donc un point important dans l'élaboration du plan d'analyse, afin de s'assurer que toute étape soit réalisée de façon optimale.

4.1.5. Les candidats identifiés

Cette étude a permis d'identifier des candidats potentiels comme biomarqueurs de différents stades de la MC. Les candidats que nous avons identifiés sont soit non-reliés aux MC jusqu'à présent, soit des liens peuvent être faits avec les MC ou finalement soit déjà très bien connus comme marqueurs des MC. Ces derniers viennent en quelque sorte renforcés notre étude, montrant que nous sommes arrivés à montrer certaines protéines déjà bien connues comme étant impliquées avec les MC.

Voici une revue de la littérature des candidats identifiés dans notre étude qui sont bien connus comme étant impliqués au niveau de la maladie coronarienne.

Adiponectine

Cette protéine de 244 acides aminés sécrétée dans le système sanguin compte pour environ 0,01% de la totalité de protéines plasmatiques; elle se retrouve à une concentration d'environ 5-10 µg/mL. Selon la littérature, des taux plus faibles d'adiponectine sont retrouvés chez les patients atteints de MC. Il faut également noter que les concentrations plasmatiques présentent un dimorphisme sexuel, les femmes ayant des valeurs généralement plus élevées que les hommes. Les niveaux d'adiponectine sont également diminués chez les diabétiques par rapport aux non-diabétiques. Finalement, l'incidence de mort cardiovasculaire chez les insuffisants rénaux est plus élevée chez les patients avec des niveaux d'adiponectine plus bas comparativement à ceux avec des niveaux d'adiponectine plus élevés (Matsuda, 2002).

Afamin

À cause de l'hydrophobicité et de l'emplacement primaire dans la membrane plasmique, la vitamine E doit se lier à un mécanisme de transport dans le plasma. Elle utilise l'afamin pour ces raisons. Une déficience en transporteur va conséquemment induire une déficience en vitamine E qui ne pourra plus être transportée vers son site d'action. Ainsi, une déficience en vitamine E est associée avec plusieurs pathologies chroniques, comme l'athérosclérose, les pathologies ischémiques cardiaques, les déficiences immunitaires, différents types de cancer et certains syndromes neurologiques (Jerkovic, 2005).

Ceruloplasmin

Cette protéine d'environ 132 kDa possède des fonctions diverses. Elle s'avère importante pour l'homéostasie du fer, dans l'angiogenèse et la coagulation et agit comme

pro-oxydant ou comme antioxydant. Des niveaux plus élevés de ceruloplasmin sont généralement retrouvés chez les patients atteints de maladies coronariennes (Göçmen, 2008).

Clusterin

In vivo, cette glycoprotéine hétérodimérique d'environ 75-85 kDa. In vivo, elle est surexprimée dans plusieurs conditions sévères qui sont reliées au vieillissement, incluant son accumulation dans la membrane de l'artère durant le développement de l'athérosclérose. Plus récemment, la clusterin a montré qu'elle stabilisait les protéines stressées en un état replié et qu'elle était impliquée dans la mort cellulaire programmée. Des études in vitro ont permis de montrer que la clusterin induisait une déplétion de l'ester cholestérol dans des cellules spumeuses murines indiquant la possibilité qu'elle puisse jouer un rôle dans l'homéostasie du cholestérol dans des conditions normales ou pathologiques (Trogakos, 2002).

Glutathione peroxidase 3

Elle protège les cellules et les enzymes contre le dommage causé par les dommages oxydatifs en catalysant la réduction du peroxyde d'hydrogène, des peroxydes lipidiques et de l'hydroperoxyde organique. Cette oxydation des LDL est considérée comme un facteur clé initial de l'athérosclérose et du développement et de la progression de la maladie coronaire. Le stress oxydant est également considéré comme un point central de dysfonction endothéliale et dans la rupture de la plaque (Flores-Mateo, 2009).

L-selectin

Un des premiers évènements dans l'initiation de l'athérosclérose est l'adhésion des monocytes circulants à la surface de la membrane médiée par la surexpression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales ainsi que sur les monocytes. La L-selectin est exprimée de façon constitutive sur les leucocytes non activés et semble être

responsable du début de l'attachement et du phénomène de roulement des leucocytes stimulés sur l'endothélium (Serrano, 2009 & Blankenberg, 2003).

4.1.6. Les candidats en cours de validation

Pour l'adiponectine (*fig.21*), nous sommes arrivés à montrer la présence du dimorphisme sexuel (résultats non montrés, voir annexe-1) quant aux femmes ayant un niveau d'adiponectine supérieur à celui des hommes et à montrer un niveau mesuré d'adiponectine chez les individus contrôles significativement ($p < 0,0001$) supérieur comparativement au niveau mesuré chez les patients avec MC stable et instable.

Pour CXCL7 (*fig.22*), MA1A1 (*fig.23*) et le facteur H (*fig.25*), aucune différence significative n'a été observée jusqu'à maintenant dans cette banque de données.

4.1.7. Avantages et Inconvénients de chaque approche

La déplétion des quatorze protéines les plus abondantes améliore la résolution et permet d'aller plus profondément dans l'analyse des protéines de plus faible abondance. Cette déplétion a permis d'identifier quelques protéines qui auraient normalement été cachées par les protéines de forte abondance.

L'approche SuperMixTM, par sa déplétion plus poussée de l'échantillon avant l'analyse MS montre un pouvoir de détection supérieur. Comparativement à la méthode utilisant la colonne IgY14TM, la méthode SuperMixTM révèle une augmentation de 39% (74 protéines) du nombre de protéines identifiées. Nous pouvons ainsi conclure que la méthode SuperMixTM permet une meilleure couverture du protéome plasmatique. Ceci suggère un pouvoir de détection des protéines de plus faible abondance qui est amélioré de manière significative.

Le fractionnement des protéines par le système PF2D permet de diminuer la complexité de l'échantillon avant l'analyse MS, de fournir un profil d'un stade d'une pathologie et il permet également de sélectionner les fractions d'intérêt à analyser; diminuant de façon significative le coût relié à analyses MS. Malgré tout, il faut tenir compte du fait qu'il y a beaucoup de données à analyser et que ceci demande un temps qui souvent est précieux.

4.1.8. Les limitations de l'étude

Des précautions ont été prises afin de maîtriser les paramètres pouvant induire des variations de mesure artéfactuelles comme la durée de congélation, la décongélation, la manipulation et la dégradation des échantillons plasmatiques. Malgré tout, nous ne pouvons exclure qu'il soit possible que de tels effets se produisent quand même. La constitution de la banque plasmatique a été réalisée sur 5 ans (entre 1999 et 2004), ainsi nous nous devons de considérer le temps d'entreposage comme une possible source d'erreurs. En effet, certains échantillons ont été gardés jusqu'à une période de 10ans après le prélèvement, ceci constitue une longue période d'entreposage. Une étude récente a d'ailleurs souligné les effets d'un entreposage à long terme d'échantillons plasmatiques. Considérant leurs résultats, un entreposage dans l'azote liquide au lieu d'un congélateur à -80°C aurait diminué davantage les effets possibles de dégradation (Ahmad, 2009). Il aurait également été mieux de prélever simultanément les différents stades de la MC pour encore diminuer les effets de l'entreposage sur les différences observées dans cette étude.

Il faut également garder en tête que puisque nous avons regroupé 18 individus ensemble pour chacun des groupes, les différences quantitatives observées en protéomique peuvent être l'objet d'une quantité exagérée chez seulement un ou quelques patients. Le regroupement des 18 individus était nécessaire afin d'avoir un regard de survol pour détecter les différences les plus intéressantes dans les protéines de faible abondance (les fractions d'intérêt). Cela montre qu'il est très important de confirmer les différences observées par des tests standardisés sur notre banque et sur d'autres banques plasmatiques.

De plus, les échantillons ont été centrifugés une seule fois après le prélèvement. De nos jours, il est recommandé de faire une double centrifugation de l'échantillon sanguin avant le début des analyses afin de s'assurer de bien enlever toutes les plaquettes. Ainsi, en ayant réalisé une seule centrifugation, nous ne sommes pas à l'abri d'obtenir des résultats aberrants dus à la sécrétion ultérieure des plaquettes restantes (contaminant notre échantillon plasmatique). Pour tenir compte de ce facteur, nous avons déterminé certains seuils afin d'éliminer les valeurs qui pouvaient être dues à cette sécrétion.

Un des facteurs limitant dans toutes les études protéomiques est bien entendu le coût relié à ces dernières. En effet, il aurait été intéressant de pouvoir analyser la totalité des fractions recueillies par le système PF2D afin de voir la puissance de cette approche, mais cela coûterait vraiment très cher et n'était pas le but d'investiguer dans cette approche! Il aurait pu être souhaitable également de combiner la déplétion avec l'approche PF2D pour ainsi voir l'effet d'une déplétion poussée combinée avec un fractionnement poussé sur les identifications en MS. Mais encore une fois, le coût relié à cette approche aurait été élevé.

Il y a également la capacité des colonnes de déplétion qui peut avoir limité les résultats obtenus. La capacité de déplétion des colonnes étant limitée, nous avons donc réalisé des déplétions, en série, portion par portion des échantillons. Malgré le fait que tous les échantillons déplétés d'un même plasma de départ ont ensuite été regroupés, il n'est pas impossible qu'il y ait eu certaines pertes à ce niveau ou certaines variations introduites par cette étape de déplétion en série. Car, il faut noter que la performance de la colonne diminue également avec le temps (durée de vie d'une colonne: 100 rondes de déplétion, selon le manufacturier). Ceci est dû au fait que la colonne, avec le temps et les hybridations/déhybridations successives, perd sa capacité à lier adéquatement les protéines à déléter, diminuant ainsi ses performances et ayant donc un impact potentiel en modifiant la composition protéique des échantillons. De plus, une colonne de déplétion tend à déléter de l'échantillon la protéine visée mais par contre, il reste parfois encore un peu des protéines majoritaires dans l'échantillon et ces dernières peuvent toujours être en concentration suffisante pour cacher la présence de certaines protéines de très faible

abondance. Par exemple, une déplétion de 99% de l'albumine semble très efficace, mais le calcul réel des faits mentionne qu'il reste encore environ 0,4g/L d'albumine dans notre échantillon, ce qui constitue une quantité non négligeable même si la déplétion a très bien fonctionné (Omenn, 2005). Lorsque nous observons les résultats, nous constatons que certaines protéines qui devraient être déplétées par les déplétions sont quand même parfois identifiées en MS, ainsi cela confirme que pour notre étude, les déplétions n'étaient bel et bien pas complètes.

Un autre point à considérer concerne la constitution d'un de nos groupes. Le groupe « contrôles sains » était constitué d'individus qui n'ont eu aucune lésion apparente lors de l'angiographie ainsi qu'aucun historique d'évènement cardiovasculaire. Par contre, ces individus se sont rendus jusqu'à la consultation, ainsi ils n'étaient possiblement peut-être pas tous parfaitement sains. Le syndrome X caractérise d'ailleurs cette situation où des individus apparemment sains présentent en réalité certaines microlésions qui ne sont pas apparentes lors des tests médicaux. Ainsi, ces individus atteints du syndrome X peuvent représenter une population présente dans notre groupe contrôle sain, affectant les résultats obtenus.

Nous avons, pour l'étude protéomique, pris des individus aux extrêmes de notre population, donc les 36 individus les plus différents côté historique médical et dans leur condition de santé au moment de l'enrôlement. Ainsi, il est possible que des différences significatives fussent présentes lorsque nous comparions 18 patients iCAD avec 18 individus contrôles des plus différents, mais que lorsque nous regardons l'ensemble de la population de la cohorte totale, ces différences diminuent au point de perdre la significativité observée par l'étude protéomique. C'est ce qui pourrait expliquer le fait que nous ayons observé des différences lors de l'analyse MS, mais pas lors de la phase de validation par ELISA sur toute la banque de plasmas.

Pour ce qui est des validations des candidats par la technique ELISA, nous avons testé les 1006 échantillons séparément à l'aide de tests de développement. Selon plusieurs études, afin d'être valide les analyses de validation doivent être réalisées sur plus de 1000

individus. Ainsi, la base de données du Dr. Théroux est limitée quant au nombre d'individus la constituant (Rifai, 2006, Gerszten, 2008 et Sabatine, 2010). Toutefois, il faut noter que cette étude avait pour mission de détecter de nouveaux candidats et qu'il est prévu que les validations se fassent également dans d'autres banques de données afin d'augmenter la puissance de nos résultats.

Et pour ce qui est de la validation pour MA1A1, nous avons évalué l'activité enzymatique de l'alpha-mannosidase par le test enzymatique. Par contre, il existe plusieurs types d'alpha-mannosidase de type 1,2 et de classe A, B et C. Nous avons déterminé la classe 1A comme présentant une différence significative entre les 2 populations sélectionnées. Par contre, le test enzymatique effectué ne permet pas de différencier la contribution de chaque type et classe de cette enzyme; ainsi, les résultats obtenus ne peuvent peut-être pas bien montrer la différence quantitative entre les groupes pour MA1A1. Par exemple, si la contribution de chaque type et classe d'enzyme ne s'avère pas être équivalente (ce que nous pensons qui est probable), nous ne pouvons conclure adéquatement par l'utilisation de ce test. Un test plus sensible serait alors requis.

Une manière d'améliorer les résultats obtenus et de pousser un peu plus loin les identifications aurait été d'utiliser la technologie « gel free » pour notre approche plus classique, c'est-à-dire une colonne de chromatographie de type SCX (Strong Cation Exchange) en première dimension afin de remplacer la séparation 1D-SDS-PAGE (Sabatine, 2010, Zhao 2010). Aujourd'hui, cette technologie est beaucoup plus standard pour les expériences utilisant le plasma. Nous n'avons pas opté pour cette technologie, car au moment de la constitution de l'étude, nous ne disposions pas d'un accès à cette technologie et nous voulions comparer l'approche PF2D innovatrice à une technologie bien connue dans la communauté scientifique (gel).

Le iTRAQ (« isobaric tag for relative and absolute quantitation ») est une autre technologie qui avait été envisagée, mais qui n'a pas été utilisée pour cette étude. Cette technique consiste à marquer trois éléments : un groupe de « reactive peptide » qui permet

le marquage des peptides en N-terminal, un groupe « balance » qui assure que le marquage est indiscernable par la masse et un groupe « reporter of variable mass » qui leur permet d'être différenciable par la dissociation induite par une collision lors du relâchement de ce dernier groupe. L'avantage du iTRAQ repose sur son agilité à analyser simultanément plusieurs spécimens biologiques permettant de diminuer le niveau d'erreurs expérimentales (Zhao, 2010).

Le « multiple reaction monitoring (MRM) » est une technologie de choix pour la détection et la quantification des composants d'un échantillon complexe. Le principe du MRM (*fig. 8*) est qu'un ion précurseur pour un composant d'intérêt est individuellement sélectionné en fonction de sa masse et ensuite fragmenté par une excitation de type collision ou résonance. Les fragments produits de cette sélection sont monitorés pour l'identification et la quantification. L'outil le plus souvent utilisé pour ce type d'expérience est l'analyseur à triple-quadripôle, dont le quadripôle 1 (Q1) est utilisé pour la sélection selon la masse, le quadripôle 2 (Q2) est utilisé pour fragmenter le composant via une excitation de type collision avec un gaz inerte comme l'azote, le quadripôle 3 (Q3) est utilisé pour suivre les ions produits de manière spécifique. Cette technologie aurait également pu être envisageable pour améliorer la performance de l'étude. En effet, le MRM offre la possibilité d'analyser seulement quelques fragments de l'échantillon ce qui permet d'améliorer la limite de quantification ainsi que d'augmenter la vitesse d'analyse (Abbatiello, 2010).

Conclusion

Cette étude a permis de montrer qu'une combinaison d'approches était souhaitable pour valider les résultats obtenus. Comme nous avons pu le constater, les résultats obtenus sont grandement modulés par la technique servant à leur détection. Ainsi, il s'avère juste d'utiliser plusieurs approches en parallèle afin d'optimiser le pouvoir d'identification et aussi éviter tout risque d'erreur.

Cette étude montre également qu'en augmentant la puissance de la déplétion et/ou de la séparation, le pouvoir d'identifier de nouveaux candidats potentiellement intéressants augmente. Il s'avère donc essentiel de pousser l'analyse le plus possible selon nos moyens financiers. L'étude a également permis de développer une nouvelle approche (système PF2D) afin de chercher de nouveaux biomarqueurs. Cette approche a été comparée à des approches plus classiques (en gel) afin de pouvoir valider la puissance, la pertinence et la précision de cette nouvelle approche. Les résultats obtenus montrent qu'il est possible de déterminer des candidats biomarqueurs sur un échantillon de plasma par l'utilisation de ce type de méthode d'analyse protéomique, mais que ces derniers ont besoin d'une étape de validation rigoureuse et à grande échelle afin de s'assurer de la véracité des candidats identifiés.

Nous pouvons également constater que certains candidats identifiés sont déjà très bien connus comme étant des protéines impliquées dans les MC. Ces derniers viennent donner de la valeur aux autres candidats identifiés qui sont moins bien connus ou totalement inconnus dans la MC et servent un peu à « valider » notre approche protéomique de recherche de candidats.

Le développement et le perfectionnement réalisés sur le système PF2D permet d'utiliser l'approche PF2D pour n'importe quelle catégorie de pathologie. Ainsi, il serait possible de créer des profils caractéristiques des différentes pathologies afin de les déceler plus tôt dans leur développement et, ainsi, agir suffisamment tôt afin de les renverser ou de les contrôler plus aisément.

Bibliographie

- 1) ABBATIELLO SE, MANI DR, KESHISHIAN H, CARR SA. *Automated Detection of Inaccurate and Imprecise Transitions in Peptide Quantification by Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry*, *Clinical Chemistry*, 2010, 56 (2), p.291-305.
- 2) BLANKENBERG S, BARBAUX S, TIRET L. *Adhesion molecules and atherosclerosis*, *Atherosclerosis*, 2003, 170, p.191-203.
- 3) BERGERON J, HALLETT M. *Peptides you can count on*, *Nature*, 2007, 25(1), p.61-62.
- 4) COLOMBANI J, HLA : Fonctions immunitaires et applications médicales, *Médecine Sciences*, John Libbey Eurotext, 1993, 285p.
- 5) CRISTEA I, GASKELL S, WHETTON A. *Proteomics techniques and their application to hematology*, *Blood*, 2004, 103 (10), p.3624-3634.
- 6) DAVIGNON R, *Familial Hypercholesterolemia in French Canadians: Taking advantage of the presence of a "founder effect"*. *American Journal of Cardiology*, 1993, 72, p.6D.
- 7) FOUNTOULAKIS M, JURANVILLE J-F, AVILA J, RÖDER D, JAKOB P, BERNDT P, EVERS S, LANGEN H. *Depletion of the high-abundance plasma proteins*. *Amino Acids*, 2004, 27, p.249-259.
- 8) FLORES-MATEO G, CARRILLO-SANTISTEVE P, ELOSUA R, GUALLAR E, MARRUGAT J, BLEYS J, COVAS M.I. *Antioxidant Enzyme Activity and Coronary Heart Disease: Meta-analyses of Observational Studies*, *American Journal of Epidemiology*. 2009, 170 (2), p.135-147.
- 9) GÖÇMEN AY, PAHIN E, EMIZ E, GÜMÜPLÜ S. *Is elevated serum ceruloplasmin level associated with increased risk of coronary artery disease?* *Canadian Journal of Cardiology* 2008, 24(3), p.209-212.
- 10) GRANADA J, KALUZA G, RAIZNER A, MORENO P. *Vulnerable Plaque Paradigm : Prediction of Future Clinical Events Based on a Morphological Definition*, *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, 2004, 62, p.364-374.
- 11) HEYER E, TREMBLAY M. *Variability of that genetic contribution of Quebec population founders associates to some deleterious genes*. *American Journal Human Genetics*, 1995, 56, p.970-978.
- 12) HUANG P. *A comprehensive definition for metabolic syndrome*, *Disease Models & Mechanisms*, 2009, 2, p.231-237.
- 13) ISHIKAWA T, HATAKEYAMA K, IMAMURA T, DATE H, SHIBATA Y, HIKICHI Y, ASADA Y. *Involvement of C-reactive protein obtained by directional coronary atherectomy in plaque instability and developing restenosis in patients with stable or unstable angina pectoris*. *American Journal of Cardiology*, 2003, 9, p.287-292.
- 14) JERKOVIC L, VOEGELE A, CHWATAL S, KRONENBERG F, RADCLIFFE CM, WORMALD MR, LOBENTANZ EM, EZEH B, ELLER P, DEJORI N, DIEPLINGER B, LOTTSPEICH F, SATTLER W, UHR M, MECHTLER K, DWEK R, RUDD PM, BAIER G, DIEPLINGER H.

Afamin is a Novel Human Vitamin E-Binding Glycoprotein Characterization and In Vitro Expression. Journal of Proteome Research, 2005, 4, p.889-899.

- 15) LACOURSE W. *Column Liquid Chromatography: Equipment and Instrumentation*, Analytical Chemistry, 2002, 74, p.2813-2832.
- 16) LATHROP J, ANDERSON L, ANDERSON N, HAMMOND D. *Therapeutic potential of the plasma proteome*, Molecular Therapeutics, 2003, 5 (3), p.250-257.
- 17) LIU H, SADYGOV R, YATES J. *A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics*, Analytical Chemistry, 2004, 76, p.4193-4201.
- 18) LEE D, CHIU M, MANUEL D, TU K, WANG X, AUSTIN P, MATTERN M, MITIKU T, SVENSON L, PUTNAM W, FLANAGAN W, TU J. *Trends in risk factors for cardiovascular disease in Canada : temporal, socio-demographic and geographic factors*, Canadian Medical Association Journal, 2009, 181 (3-4), p.E55-E66.
- 19) *Le Fardeau économique de la maladie au Canada (FEMC)*, 1998.
- 20) *Le fardeau croissant des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux*, Fondation des maladies du cœur du Canada, mai 2003.
- 21) MARIEB EN. *Anatomie et physiologie humaines*, Traduction de la 4^e édition américaine, DeBoeck Université, 1999, 1994p.
- 22) MATSUDA M, SHIMOMURA I, SATA M, ARITA Y, NISHIDA M, MAEDA N, KUMADA M, OKAMOTO Y, NAGARETANI H, NISHIZAWA H, KISHIDA K, KOMURO R, OUCHI N, KIHARA S, NAGAI R, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y. *Role of adiponectin in preventing vascular stenosis*. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277 (40), p.37 487-37 491.
- 23) MCCAFFERY JM, DUAN QL, FRASURE-SMITH N, BARHDADI A, LESPÉRANCE F, THÉROUX P, ROULEAU GA, DUBÉ MP. *Genetic predictors of depressive symptoms in cardiac patients*, American Journal of Medical Genetics B Neuropsychiatric Genetics. 2009, 150B (3), p.381-388.
- 24) MCDONNELL B, HEARTY S, LEONARD P, O'KENNEDY R. *Cardiac biomarkers and the case for point-of-care testing*, Clinical Biochemistry, 2009, 24, p.549-561.
- 25) NAKA T, JONES D, BALDWIN I, FEALY N, BATES S, GOEHL H, MORGERA S, NEUMAYER H.H, BELLOMO R. *Myoglobin clearance by super high-flux hemofiltration in a case of severe rhabdomyolysis: a case report*, Critical Care, 2005, 9, p.R90-R95.
- 26) NEWSHOLME E.A., BEIS I, LEECH A.R., ZAMMIT V. *The role of Creatine Kinase and Arginine Kinase in Muscle*, Biochemistry Journal, 1978, 172, p.533-537.
- 27) O'FARREL PH. *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. The Journal of Biological Chemistry. 1975, 250 (10), p.4 007-4 021.
- 28) OLD W, MEYER-ARENDRT K, AVELINE-WOLF L, PIERCE K, MENDOZA A, SEVINSKY J, RESING K, AHN N. *Comparison of Label-free Methods for Quantifying Human Proteins by Shotgun Proteomics*, Molecular & Cellular Proteomics, 2005, 4 (10), p.1 487-1 502.
- 29) OMENN G, STATES D. ADAMSKI M, BLACKWELL T, MENON R, HERMJAKOB H, APWEILER R, HAAB B, SIMPSON R, EDDES J, KAPP E, MORITZ R, CHAN D, RAI A, ADMON A, AEBERSOLD R, ENG J, HANCOCK W, HEFTA S, MEYER H, PAIK Y, YOO J,

- PING P, POUNDS J, ADKINS J, QIAN X, WANG R, WASINGER V, WU C, ZHAO X, ZENG R, ARCHAKOV A, TSUGITA A, BEER I, PANDEY A, PISANO M, ANDREWS P, TAMMEN H, SPEICHER D, HANASH S. *Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: Results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database*, *Proteomics*, 2005, 13, p.3 226-3 245.
- 30) PANG J, GINANNI N, DONGRE A, HEFTA S, OPITECK G. *Biomarker Discovery in Urine by Proteomics*, *Journal of Proteome Research*, 2002, 1, p.161-169.
- 31) PARADIS G., THIVIERGE C., *Les maladies cardiovasculaires : Facteurs de risque. Prévention en pratique médicale*, Bulletin de la Direction de la santé publique de Montréal, Mars 2004.
- 32) PATTESON S, AEBERSOLD R. *Proteomics : the first decade and beyond*, *Nature Genetics supplement*, 2003, 33, p.311-323.
- 33) PRENCE EM, NATOWICZ MR, *Diagnosis of alpha-Mannosidosis by Measuring alpha-Mannosidase in Plasma*, *Clinical Chemistry*, 1992, 38(4), p.501-503.
- 34) QIAN W-J, KALETA D, PETRITIS B, JIANG H, LIU T, ZHANG X, MOTTAZ H, VARNUM S, CAMP D, HUANG L, FANG X, ZHANG W-W, SMITH R. *Enhanced Detection of Low Abundance Human Plasma Proteins Using a Tandem IgY12-SuperMix Immunoaffinity Separation Strategy*, *Molecular & Cellular Proteomics*, 2008, 7(10), p.1 963-1 973.
- 35) ROSS, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *New England Journal of Medicine*, 1999. 340 (2), p.115-126.
- 36) SABATINE M, CARR SA, GERSZTEN RE. *Integration of Proteomics-Based Tools for Improved Biomarkers of Myocardial Injury*, *Clinical Chemistry*, 2010, 56 (2), p.194-201.
- 37) SARKAR J, SOUKHAREV S, LATHROP J, HAMMOND D. *Functional identification of novel activities: Activity-based selection of proteins from complete proteomes*, *Analytical Biochemistry*, 2007, 365, p.91-102.
- 38) SCHUCHARD, MD, MELM CD, CRAWFORD AS, CHAPMAN HA, COCKRILL SL, RAY KB, MEHIGH RJ, KAPPEL WK, SCOTT GB. *Immunoaffinity depletion of 20 high abundance human plasma proteins. Removal of approximately 97% of total plasma protein improves identification of low abundance proteins*. *Origins*, 2005, 21, p.17-23.
- 39) SCHUCHARD M, MELM C, CRAWFORD A, CHAPMAN H, COCKRILL S, RAY K, MEHIGH R, CHEN D, SCOTT G. *Specific Depletion of Twenty High Abundance Proteins from Human Plasma*, Reagents Resource Workshop, NCI Proteomic Technologies, December 12-13, 2005.
- 40) SERRANO CV, PESARO AE, DE LEMOS JA, RACHED F, SEGRE JA, GOMES F, RIBEIRO AF, NICOLAU JC, YOSHIDA VM, MONTEIRO HP. *Native LDL-Cholesterol Mediated Monocyte Adhesion Molecule Overexpression is Blocked by Simvastatin*, *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 2009, 23, p.215-220.
- 41) SIMPSON K, WHETTON A, DIVE C. *Quantitative mass spectrometry-based techniques for clinical use: Biomarker identification and quantification*, *Journal of Chromatography B*, 2009, 877, p.1 240-1 249.

- 42) TAMMEN, H., *Specimen Collection and Handling: Standardization of Blood Sample Collection*, Clinical Proteomics : Methods and Protocols, 428, p.35-41.
- 43) THÉROUX, P., *Acute Coronary Syndromes – A companion to Braunwald’s heart Disease*, Saunders – Elsevier Sciences, 2003, 752p.
- 44) TROUGAKOS IP, POULAKOU M, STATHATOS M, CHALIKIA A, MELIDONIS A, GONOS ES. *Serum levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein J increase significantly in diabetes type II and during development of coronary heart disease or at myocardial infarction*, Experimental Gerontology, 2002, 37, p.1 175-1 187.
- 45) WATSON LM, CHAN AKC, BERRY LR, LI J, SOOD SK, DICKHOUT JG, XU L, WESTUCK GH, BAJZAR L, KLAMUT HJ, AUSTIN RC. *Overexpression of the 78-kDa Glucose-regulated Protein/Immunoglobulin-binding Protein (GRP78/BiP) Inhibits Tissue Factor Procoagulant Activity*. Journal of Biological Chemistry, 2008, 278 (19), p.17 438-17 447.
- 46) ZAKYNTHINOS E, PAPPAS N. *Inflammatory biomarkers in coronary artery disease*, Journal of Cardiology, 2009, 53, p.317-333.
- 47) ZHANG J, TU Y, LU L, LASKY N, BROZE GJ. *Protein Z dependent protease inhibitor deficiency produces a more severe murine phenotype than protein Z deficiency*. Blood, 2008, 111, p.4 973-4 978.
- 48) YE H, SUN L, HUANG X, ZHANG P, ZHAO X. *A proteomic approach for plasma biomarker discovery with 8-plex iTRAQ labeling and SCX-LC-MS/MS*, Mol Cell Biochemistry, 2010, [Epub ahead of print].

Annexe – 1

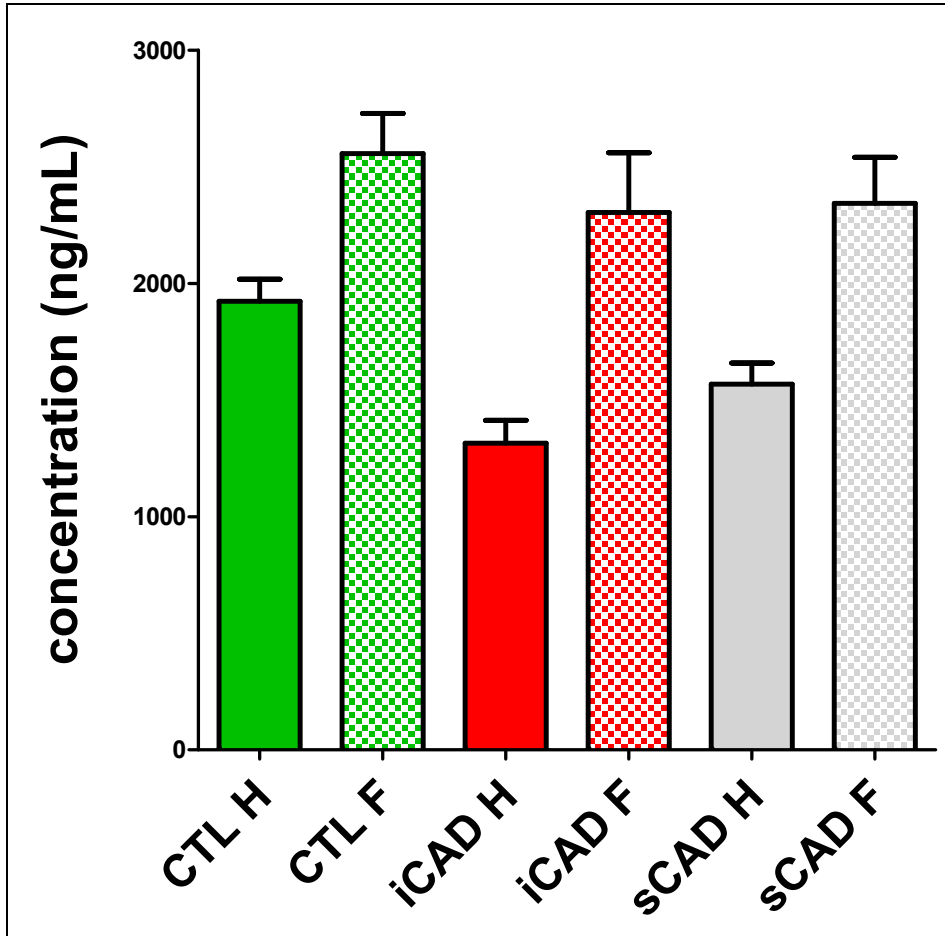


Figure 26 – Concentration d'adiponectine (dimorphisme sexuel)

Cette figure présente le niveau supérieur mesuré chez les femmes pour chacun des groupes, causé par la présence d'un dimorphisme sexuel.