

Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant

Résultats scientifiques

Lettre n° 11 - Mars 2008

Vers une production bioinspirée de l'hydrogène sans métaux nobles

Vincent Artero
Page 1

Un chaînon manquant pour l'angiogenèse

Danielle Gulino
Page 2

PSAQ™, un mètre-étalon pour la protéomique

Alain Dupuis
Page 3

En bref

Revue
Chapitre de livre
Transfert
Page 4

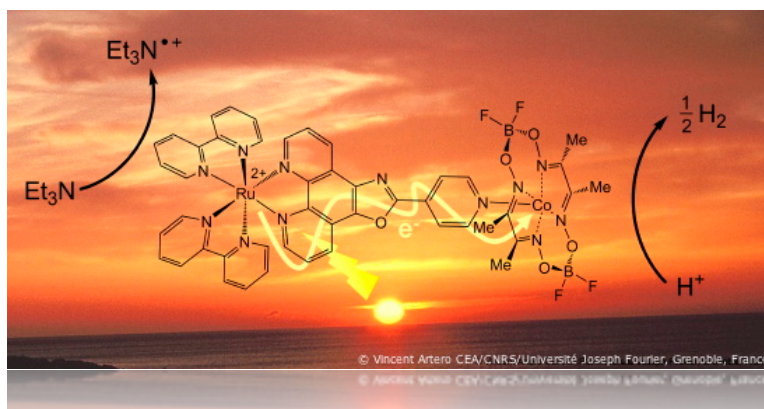
Vers une production bioinspirée d'hydrogène sans métaux nobles

La production d'hydrogène constitue un enjeu majeur pour l'avenir de la filière hydrogène. Utiliser des ressources renouvelables est de plus un impératif pour s'inscrire dans une démarche de développement durable. Pour cela, on peut s'inspirer des processus chimiques à l'œuvre naturellement dans certains micro-organismes photosynthétiques tels que les algues vertes et les cyanobactéries, qui ont la particularité de produire de l'hydrogène à partir de l'eau, sous l'effet de la lumière.

Pour la première fois, les chercheurs de l'équipe [Biocatalyse](#) dirigée par le Professeur Marc Fontecave ([Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux](#)) sont parvenus à produire de l'hydrogène en utilisant un ensemble moléculaire sans métal noble.

Actuellement, tous les dispositifs technologiques développés pour produire ou utiliser l'hydrogène renferment des métaux nobles¹ tels que le platine comme catalyseurs. Les analyses montrent aujourd'hui que les réserves en platine sont limitées et que la rareté et le coût de ce métal ne permettent pas d'envisager une économie basée sur l'hydrogène sur le long terme, malgré les efforts pour en diminuer les quantités dans les électrolyseurs et les piles. C'est là qu'une démarche biomimétique permet de s'affranchir du recours au platine, en

permettant la préparation de catalyseurs à base de métaux plus abondants et moins chers qui sont utilisés par les organismes naturels (fer, nickel, cobalt, manganèse).



Pour reproduire et améliorer les processus biologiques de photoproduction d'hydrogène, le chimiste cherche à élaborer des systèmes complexes renfermant un photosensibilisateur, capable de capter l'énergie lumineuse et d'induire une séparation de charge, et un catalyseur qui utilise l'électron ainsi photogénéré pour réduire l'eau en hydrogène.

Une première version d'un tel ensemble a été mise au point avec des systèmes supramoléculaires, c'est-à-dire où une même molécule assure plusieurs fonctions, comportant un photosensibilisateur et un catalyseur à base de cobalt. Sous l'effet de la lumière, les électrons fournis par donneur sacrificiel (la triéthylamine) sont utilisés pour la réduction de l'eau en hydrogène catalysée au niveau de l'atome de cobalt, avec une efficacité su-

périeure aux systèmes comparables à base de métaux nobles (Pd, Rh et Pt) précédemment décrits. Certes, le système utilise encore le ruthénium pour ses propriétés photochimiques. Une prochaine étape visera à s'en affranchir.

Même si, à la façon des organismes vivants, l'utilisation de l'eau non seulement comme source de protons, mais aussi comme source d'électrons (évitant ainsi d'avoir à ajouter une molécule organique) reste l'objectif ultime de ces recherches, ce résultat constitue une avancée considérable dans le domaine de la photo-production d'hydrogène.

¹ Historiquement, les métaux nobles étaient les métaux précieux (or, argent, platine) utilisés en orfèvrerie. Ils correspondent pour le chimiste à des métaux qui ne s'oxydent pas facilement. Ce terme s'applique maintenant aux autres métaux de faible abondance dans la croûte terrestre et qui sont donc à la fois rares et coûteux (palladium, rhodium, iridium).

Contact : [Vincent Artero](#)

Référence

- Fihri A, Artero V, Razavet M, Baffert C, Leibl W and Fontecave M. Cobaloxime-based photocatalytic devices for hydrogen production. [Angewandte Chemie International Edition](#), 2008, 47(3): 564-567

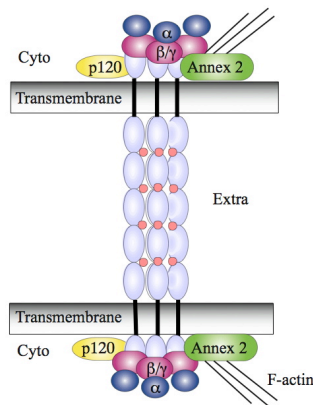


Figure 1 : Les molécules de VE-cadhérine appartenant à des cellules voisines élaborent via leur partie extracellulaire (Extra) des interactions homophiliques et recrutent par l'intermédiaire de leurs parties cytoplasmiques (Cyto) les β -et γ -caténines qui interagissent à leur tour avec l' α -caténine. L'annexine 2 est un nouveau partenaire du complexe de VE-cadhérine qui établit une connexion avec les filaments d'actine.

Un chaînon manquant pour l'angiogenèse?

La croissance d'une tumeur dépend fortement de son approvisionnement en oxygène et en nutriments. Ces apports sont fournis par l'intermédiaire du réseau vasculaire présent à l'intérieur de la tumeur. En fait, les tumeurs promeuvent leur propre vascularisation en induisant la formation de capillaires à partir des vaisseaux pré-existant au sein du tissu hôte. Le processus correspondant à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existant est appelé angiogenèse. La compréhension des mécanismes moléculaires régulant l'angiogenèse et l'identification des molécules clés impliquées dans ce processus pourraient permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour combattre et contrôler l'angiogenèse et par voie de conséquence le cancer.

Au sein de l'endothélium, le processus d'angiogenèse implique l'activation des cellules endothéliales qui se mettent alors à proliférer, à migrer au travers de la membrane basale avant de former des structures en forme de tubes à l'origine des nouveaux capillaires.

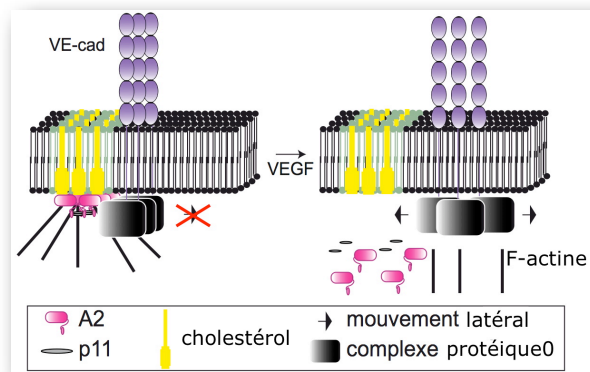


Figure 2 : Le VEGF déstabilise l'interaction entre le complexe de VE-cadhérine et l'annexine 2 entraînant la déconnexion des filaments d'actine.

Les chercheurs de l'unité INSERM 882 étudient l'endothélium vasculaire dont les contacts inter-endothéliaux sont régulés par un récepteur adhésif spécifique de l'endothélium, la VE-cadhérine (VE pour *Vascular Endothelial*)¹, protéine essentielle à l'angiogenèse².

Les molécules de VE-cadhérine participent au maintien et à la restauration de l'intégrité de l'endothélium vasculaire⁴ en s'associant entre elles via leur partie extracellulaire et en interagissant avec différentes molécules cytoplasmiques³ (Figure 1). Jusqu'à très récemment, il était admis que l'une d'entre elles, l' α -caténine, établissait la liaison entre les complexes à base de cadhérine, y compris ceux formés de VE cadhérine, et les filaments d'actine.

Ce dogme a été récemment contesté⁵ et c'est dans ce contexte que ces chercheurs ont entrepris d'identifier toutes les protéines du complexe jonctionnel de VE cadhérine. À cet effet, ils ont mis en place une méthode originale d'immuno-précipitation permettant de capturer et de purifier ce complexe à base de VE-cadhérine à partir de cellules endothéliales humaines en culture. Cette technique d'immuno-précipitation a été couplée ensuite à une approche protéomique en collaboration avec M. Jaquinod (Laboratoire EDyP), et a permis d'identifier de nouvelles protéines du complexe adhésif à base de VE cadhérine dont plusieurs protéines capables d'interagir avec l'actine telle l'annexine 2 (Figure 1). Ces nouvelles protéines pourraient donc constituer les chaînons manquant assurant la connexion entre le complexe VE cadhérine-caténines et le cytosquelette d'actine. Dans le but de déterminer le rôle de ces protéines dans l'élaboration ou la régulation des jonctions adhérentes inter-endothéliales, les chercheurs ont observé que l'ablation de l'expression de l'annexine 2 par siRNA dans des cellules endothéliales

quiescent à un état migratoire et d'induire l'angiogenèse⁶.

Les prochaines expériences tendront à élucider la cascade de signalisation conduisant au découplage de l'annexine 2 du complexe jonctionnel ouvrant ainsi la voie vers la conception de nouveaux traitements anti-angiogéniques.

Contact : [Danielle Gulino](#)

Références

- 1 Lampugnani *et al.*, *J Cell Biol*, 1992, **118**: 1511-22
- 2 Gory-Faure *et al.*, *Development*, 1999, **126**: 2093-2102
- 3 Legrand *et al.*, *J Biol Chem*, 2001, **276**: 3581-3588
- 4 Gulino *et al.*, *J Biol Chem*, 1998, **273**: 29786-29793
- 5 Yamada *et al.*, *Cell*, 2005, **123**: 889-901
- 6 Heyraud *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2008, **28**: 1657-1668

humaines induisait une délocalisation de la VE-cadhérine des jonctions adhérentes et leur déstabilisation.

Cette première étude a montré, d'une façon indirecte, le rôle que joue le cytosquelette d'actine dans le maintien des jonctions inter-endothéliales. Ces chercheurs proposent que son remodelage dynamique permet le remaniement de l'endothélium comme par exemple

son extension au cours de l'angiogenèse. Les multiples connexions existant entre le complexe à base de VE-cadhérine et le cytosquelette d'actine sont régies par les protéines liant l'actine et identifiées au sein du complexe jonctionnel. Ces dernières pourraient intervenir à différentes étapes de la maturation des jonctions inter-endothéliales participant par exemple au transport des molécules de VE-cadhérine nécessaires au remaniement des jonctions inter-endothéliales. Dans ce cadre, ces chercheurs ont montré que le facteur de croissance pro-angiogénique VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) entraîne le découplage du complexe jonctionnel à base de VE-cadhérine de l'annexine 2 et donc la déconnexion du cytosquelette d'actine (Figure 2). Ceci aurait pour conséquence de faciliter le passage des cellules endothéliales d'un état

PSAQ™, un mètre-étalon pour la protéomique

La spectrométrie de masse s'est imposée comme une technique de référence en analyse protéomique, mais les données générées restent principalement qualitatives. Rendre les données de spectrométrie de masse quantitatives constitue donc un enjeu majeur. Une équipe du laboratoire d'Étude de la Dynamique des Protéomes a ainsi conçu la méthode « PSAQ™ » (pour Protein Standard Absolute Quantification) qui permet la quantification exacte de protéines dans des échantillons biologiques complexes par spectrométrie de masse.

sivement dans la protéine à doser (peptide protéotypique).

Les toxines superantigéniques de *Staphylococcus aureus* (entérotoxines et TSST-1) sont responsables de pathologies sévères chez l'homme [4] et représentent la seconde cause de toxi-infections alimentaires collectives après *Salmonella*. Ces toxines peuvent contaminer la chaîne alimentaire et les réseaux d'eau potable. Leur détection et leur quantification par des approches immuno-chimiques reste problématique. En collaboration avec l'équipe du professeur F Vandenesch (Inserm U851, Lyon) et JA Hennekinne (AFSSA, Paris), le laboratoire EDyP a donc testé une approche de spectrométrie de masse utilisant des étalons de type AQUA et QconCAT [1, 5] pour la quantification des entérotoxines staphylococciques. Les quantifications obtenues par cette approche se sont avérées inexactes. En effet, alors qu'elles permettent une quantification exacte (« absolue ») de la quantité du peptide ciblé dans l'hydrolysate trypsinique

montré que seule la méthode PSAQ™ permettait une quantification exacte des toxines staphylococciques (Figure 2) [2, 3].

Les chercheurs de LEDyP développent actuellement la méthode PSAQ™ dans plusieurs directions : i/ ils cherchent à repousser la limite de sensibilité de cette méthode sous le nanogramme de protéine cible par ml de matrice complexe (plasma, etc). ii / ils optimisent cette approche pour l'évaluation de biomarqueurs d'intérêt clinique. iii) enfin, ils mettent en place une plate-forme de production « haut-débit » et de calibration d'étalons PSAQ™ pour permettre des analyses multiplexes.

En conclusion, la méthode PSAQ™ s'avère beaucoup plus robuste et juste pour la quantification de protéines dans des échantillons biologiques complexes que les méthodes concurrentes développées précédemment. Sa justesse, sa précision, sa très grande spécificité et sa compatibilité avec des dosages multiplexes, font de cette méthode une alternative très intéressante à l'ELISA pour de nombreuses applications, dont l'évaluation à grande échelle de biomarqueurs dans les fluides biologiques tels que le sérum.

Contact : [Virginie Brun](#)

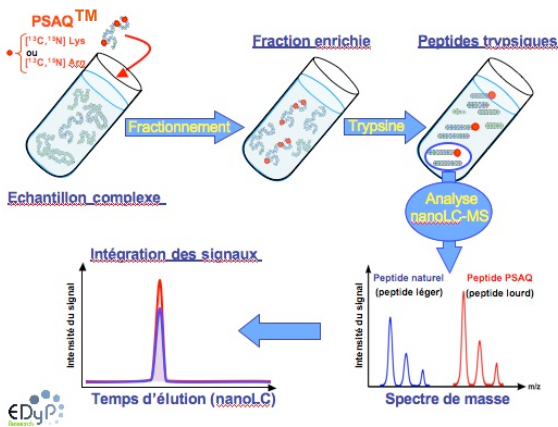


Figure 1 : Synopsis de la méthode PSAQ™
La méthode PSAQ™ repose sur la biosynthèse in vitro d'étalons protéiques marqués isotopiquement. Ces étalons, biochimiquement équivalents aux protéines à doser, sont ajoutés à chaque échantillon préalablement à tout traitement. L'échantillon est ensuite fractionné, digéré à la trypsinase puis analysé en nanoLC-MS. Chaque peptide issu d'un étalon PSAQ™ va ainsi produire un massif isotopique caractéristique décalé du peptide naturel à doser. L'intégration des signaux « léger » et « lourd » résultants nous permet de déterminer la concentration exacte du peptide cible.

La protéomique a vécu une véritable révolution technologique grâce aux avancées de la spectrométrie de masse (MS). Durant ces dernières années, un effort particulier de la communauté internationale a porté sur le développement de méthodes de spectrométrie de masse quantitatives dédiées à la protéomique [6].

Plusieurs méthodes génériques permettent actuellement une comparaison des concentrations en protéines présentes dans différents échantillons biologiques, mais ne fournissent pas d'information sur la quantité exacte (« absolue ») de chaque protéine présente. Pourtant, une **quantification exacte** est requise dans des domaines clés tels que l'analyse clinique, l'évaluation de candidats biomarqueurs, le contrôle qualité des médicaments ou des aliments, ou la surveillance sanitaire.

Suivant le principe de la dilution isotopique, une quantification exacte d'un composé peut être obtenue en spectrométrie de masse en ajoutant dans l'échantillon à analyser une quantité connue d'un étalon interne chimiquement identique au composé à doser, mais alourdi par l'incorporation d'isotopes stables. Ainsi, deux méthodes de quantification exacte utilisant des peptides marqués (¹³C et/ou ¹⁵N) comme étalons internes avaient été publiées (stratégies AQUA et QconCAT) [1, 5]. Ces méthodes reposaient toutes deux sur l'utilisation d'un peptide rapporteur par protéine à doser. Ce peptide rapporteur, marqué (¹³C et/ou ¹⁵N) est identique à un peptide trypsinique identifié exclu-

q u e de l'échantillon, elles ne prennent pas en compte les rendements de toutes les étapes biochimiques nécessaires à la préparation de l'échantillon.

Les auteurs ont donc développé la **méthode de quantification PSAQ™** qui utilise comme étalons internes des protéines recombinantes entières biochimiquement identiques aux protéines naturelles à doser. Ces étalons PSAQ™ sont alourdis par incorporation de [¹³C₆, ¹⁵N₂]L-lysine et [¹³C₆, ¹⁵N₄]L-arginine lors de leur biosynthèse en système « Cell-Free ». Les étalons internes PSAQ™, se comportant comme leurs « contre-parties » naturelles, peuvent être ajoutés préalablement à tout traitement de l'échantillon, ce qui permet d'éviter tout biais dû au processus analytique (Figure 1). La technique PSAQ™ est de fait la seule qui prenne en compte les rendements des étapes de pré-fractionnement, de décomplexification et de digestion trypsinique. Une étude comparative a

Références

- [1] Beynon et al. *Nat. Methods*, 2005, 2: 587-589
- [2] [3] Brun et al. *Mol Cell Proteomics*. 2007, 6(12): 2139-2149 et demande de brevet « Method for absolute quantification of polypeptides ». PCT/IB2007/053424
- [4] Dinges et al. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13: 16-34
- [5] Gerber et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 6940-6945
- [6] Ong SE and Mann M. *Nat Chem Biol*. 2005, 1: 252-262

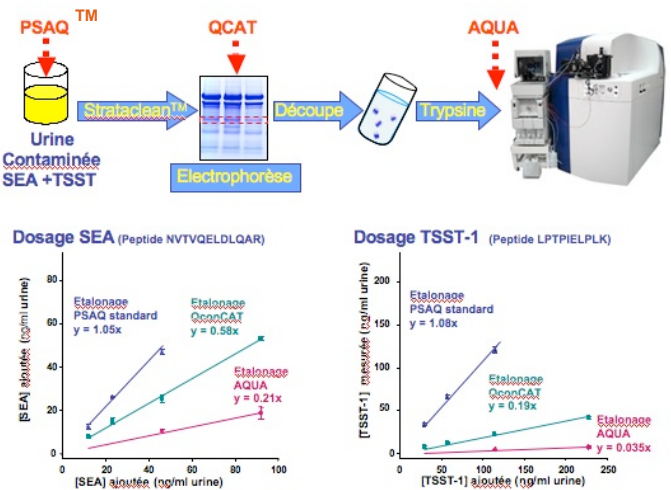


Figure 2 : Évaluation comparative des méthodes AQUA, QconCAT et PSAQ™ pour la quantification exacte des entérotoxines SEA et TSST.

Un échantillon d'urine est contaminé avec des quantités connues d'entérotoxines SEA et TSST (toxines naturelles). Chaque échantillon est divisé en trois, enrichi en toxine cible par concentration sur Strataclean™ et électrophorèse, et quantifié de manière comparative par les 3 méthodes. Les trois types d'étalon utilisés sont ajoutés comme indiqué par les flèches. Pour chaque toxine, la titration d'un même peptide protéotypique est représentée pour les trois méthodes ($y =$ pente de la droite de titration)

Revue

La revue publiée dans BBA Biomembranes par Yann Wallez et Philippe Huber (LAPV-U882) fait le point sur l'ensemble des propriétés connues des protéines jonctionnelles et analyse les différents types de régulation auxquelles elles sont soumises dans la physiopathologie vasculaire.



Référence

- Wallez Y and Huber P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2008, 1778(3): 794-809

Chapitres de livres

Nathalie Picollet D'Hahan du laboratoire *Biopuces* a publié deux chapitres s'intégrant dans le 3^{ème} Tome du Livre « Les Nanosciences », intitulé « Nanobiotechnologies et Nanobiologie »

Les « canaux ioniques et patch-clamp » décrits au chapitre 11, représentent un aspect de la dynamique et caractérisation électrique du transport. Ce chapitre permet de préciser d'une part le rôle physiologique des canaux ioniques, leur implication dans les pathologies et leur pharmacologie ; d'autre part, de redonner les concepts de base de l'électrophysiologie et la mise en œuvre expérimentale du patch-clamp.

Les « puces patch-clamp », décrites au chapitre 19, représentent un exemple de puces à cellules, qui ont révolutionné le domaine de l'analyse électrophysiologique haut-débit, répondant aux enjeux de l'industrie pharmaceutique dans la découverte accélérée de nouvelles molécules d'intérêt et dans l'évaluation très précoce des effets secondaires de futurs médicaments.

Transfert

Le laboratoire LAPV-U882 a mis en place un modèle d'angiogenèse in vitro récapitulant les différentes phases de l'angiogenèse in vivo et permettant la quantification de l'invasion vasculaire. Ce modèle a été transféré à la société Sanofi- Aventis pour le criblage pharmacologique et la caractérisation de molécules anti-angiogéniques à visée anti-cancéreuse.

Contact : [Philippe Huber](mailto:Philippe.Huber@cea.fr)

Les laboratoires de l'iRTSV

LAPV

Laboratoire d'[An-
giogenèse et Phy-
siopathologie Vas-
culaire](#)

LBBSI

Laboratoire de [Bio-
chimie et Biophysi-
que des Systèmes
Intégrés](#)

Biopuces

Laboratoire [Biopu-
ces](#)

LCBM

Laboratoire de [Chi-
mie et Biologie des
Métaux](#)

LEDyP

Laboratoire d'[Étude
de la Dynamique
des Protéomes](#)

LBIM

Laboratoire [Biolo-
gie, Informatique et
Mathématiques](#)

LPCV

Laboratoire de [Phy-
siologie Cellulaire
Végétale](#)

LTS

Laboratoire [Trans-
duction du Signal](#)

GPC

Groupe [Physiopa-
thologie du Cytos-
quelette](#)

GIPSE

Groupe [Informati-
que Pour les Scien-
tifiques du sud-Est](#)

GPMS

Groupe [Plate-forme
et Moyens Scientifi-
ques et techniques
communs](#)

Directeur de la publication
Pr. Marc Fontecave

Éditeur et mise en page
Pascal Martinez — Pascal.Martinez@cea.fr

Comité de rédaction

Vincent Artero, Alain Dupuis, Danielle Gulino, Philippe Hu-
ber, Nathalie Picollet D'hahan.

**Institut de Recherches en Technologies et
Sciences pour le Vivant**

<http://www-dsv.cea.fr/irtsv>

CEA Grenoble

17 rue des Martyrs

38 054 Grenoble cedex 09

Responsable : Marc Fontecave

Tel. : 04 38 78 45 01

Fax : 04 38 78 51 55