

LISTE DES ABREVIATIONS

AAN	: Ac antinucléaires
Ac	: Anticorp
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ADNc	: Acide Désoxyribonucléique complémentaire
Ag	: Antigène
ALICE	: Acid-Labil Isotope-Coded Extractant
AML	: antimuscles lisses
Apo	: Apolipoprotéine
ARN	: Acide Ribonucléique
ARNm	: Acide Ribonucléique messager
CBB	: Bleu de Coomassie Colloïdal
CBP	: cirrhose biliaire primitive
CCD	: Charge Coupled Device
CCL5	: Chimiokine de type CC
CFTR	: cystic brosis transmembrane protein
CLHP	: Chromatographie Liquide à Haute Performance
CXCL	: Chimiokine de type CXC
DIGE	: Difference Gel Electrophoresis
EGBD (2-DGE)	: Electrophorèse en gel bidimensionnelle
ELISA	: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ESI-MS	: Electro Spray Ionisation - spectrometry de masse
FGF	: Fibroblast Growth Factor
Gp	: Glucoprotéine
GRP	: Glucose-Regulated Protein
GS	: Gougerot- Sjögren
GST	: Glutathion S-Transférase
HAI	: hépatites auto-immunes

HIP	: Huntington Interacting Protein
HSP	: Heat Shock Protéine
ICAT	: Isotope Coded Affinity Tag
IDMS	: isotopic dilution mass spectrometry
IEF	: IsoElectroFocalisation
IFI	: immunofluorescence indirecte
IgGκ	: Immunoglobuline G de type kappa
iTRAQ	: isobaric tags for relative and absolute quantitation
LC	: liver cytosol
LCDD	: Maladie des dépôts de chaînes légères
LCR	: Liquide Céphalo Rachidien
LKM	: liver kidney microsome
M/Z	: Rapport Masse sur Charge
MA	: maladie d'Alzheimer
MALDI-MS	: Matrix-Assisted laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry
MALDI-TOF-MS	: Matrix-Assisted laser Desorption/ Ionization - Time of Flight - Mass Spectrometry
MAP-kinases	: Mitogen Activated Proteins kinases
MCF	: Michigan Cancer Foundation
MDA-MB	: M.D. Anderson-Metastatic Brest
MIC	: Protéine des micronèmes MELK : Multiple-Epitope-Ligand « Kartographie »
M	: masse moléculaire
MS	: Mass Spectrometry
MudPIT	: Multidimensional Protein Identification Technology
MV	: mucoviscidose
NBD	: Nucleotide Binding Domain

NCBI	: US National Center for Biotechnology Information
NGF	: nerve growth factor
NSAID	: anti-inflammatoires non stéroïdiens
PAGE	: Electrophorèse en gel de polyacrylamide
PAGE-SDS	: Electrophorèse en gel de polyacrylamide avec dodécyl-sulfate de sodium
PDGF	: Platel et Derived Growth Factor
pH	: Potentiel d'Hydrogène
Phe	: Phénylalanine
pI	: point Isoélectrique
PMF	: Peptide Mass Fingerprinting
PR	: polyarthrite rhumatoïde
PrxII	: Peroxyrédoxine II
RND	: Resistance Nodulation cell Division
ROP	: Protéine du bulbe
RR	: RadioRésistante
SAGE	: Serial Analysis of Gene Expression
SELDI-TOF	: Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight
SILAC	: Stable Isotope Labelling with Aminoacids in Cell culture
SLA	: Soluble Liver Antigen
Tau	: Tubule-associated unit
TCP	: chaperon incontaining
TgSORTLR	: T. gondii Sortilin-Like Receptor
TOF	: Time of Flight

LISTE DES SYMBOLES

kDa : Kilodalton

% : Pourcent

nm : nanomètre

Da : Dalton

µl : Microlitre

α : Alpha

pg : Picogramme

ml : Millilitre

β : Beta

σ : Sigma

Δ : Delta

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Du gène à la protéine et leurs méthodes d'analyse	13
Figure 2 : Un exemple de profil d'électrophorèse bi-dimensionnelle avec l'étiquetage de taches contenant des protéines identifiées par spectrométrie de masse.....	14
Figure 3 : Le principe du PMF (Peptide Mass Fingerprinting) : du découpage des morceaux de gel 2-DE à l'interrogation des banques de données pour l'identification de protéines	16
Figure 4 : Principe de la MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted laser Desorption/ Ionization - Time of Flight - Mass Spectrometry) avec détecteur reflectron.....	17
Figure 5 : Représentation schématique d'une pompe d'efflux.....	29
Figure 6 : Protéome du liquide synovial de patient souffrant de polyarthrite rhumatoïde (PR), d'arthrite non rhumatoïde et d'arthrose par technique SELDI-TOF. Les protéines S100A8 (flèche blanche), S100A9 (flèche noire) et S100A12 (flèche grise) sont surexprimées dans le liquide synovial de PR	43
Figure 7 : Exemple de typage par protéomique d'une amylose inhabituelle ..	46

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Pompes d'efflux et résistance.....	28
Tableau II : Résumé des différentes analyses protéomiques et des méthodes utilisées	34

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR LA PROTEOMIQUE.....	5
CHAPITRE I : Rappels.....	6
I.1. Le Transcriptome	6
I.2. Le Protéome	7
I.3. Les différents types d'analysesprotéomique	8
CHAPITRE II : Les approches protéomiques	12
II.1. Electrophorèse en gel bidimensionnelle (2-DGE)	12
II.2. Identification des protéines par spectrométrie de masse (MS)	15
CHAPITRE III : La protéomique sans gel en biologie clinique.....	19
III.1. Les couplages chromatographiques	19
III.2. La protéomique quantitative	20
III.3. Les biopuces à protéines et les analyses multiparamétriques	21
DEUXIEME PARTIE : APPLICATIONS	24
CHAPITRE I : Applications de la protéomique dans le domaine biomédical	26
I.1. En Biochimie Médicale	26
I.2. En Bactériologie Médicale	27
I.3. En Toxicologie	30
I.4. En Immunologie	31
I.5. En Hématologie biologique.....	33
CHAPITRE II : Applications en recherche expérimentale.....	39
II.1. En Cancérologie	39
II.2. En clinique.....	41
II.3. En anatomoopathologie.....	44
II.4. Monitoring thérapeutique-pharmacologie.....	46
II.5. Parasitologie	49
CONCLUSION.....	51
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	56

INTRODUCTION

La notion de protéomique est apparue dans les années 1990 en définissant le protéome, mot hybride associant protéine et le suffixe « ome » (désignant un ensemble ou un système), comme l'ensemble des peptides et protéines codées par un génome à un instant donné et dans un environnement spécifique [1]. Depuis, le concept a été étendu à l'ensemble des protéines d'un organite, d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme entier.

La protéomique fait partie des approches dites « post-génomiques », comme l'analyse des métabolites (« métabolomique »), des interactions protéiques (« interatomique ») ou encore des lipides (« lipidomique »).

En recherche clinique, la « protéomique clinique », nouvelle discipline biologique et médicale, consiste à analyser le protéome d'un échantillon biologique dans le but d'identifier soit des marqueurs diagnostiques, pronostiques, théranostiques ou de suivis thérapeutiques des pathologies humaines, soit des acteurs physiopathologiques pouvant servir de cible thérapeutique [2].

Contrairement au génome, le protéome d'une cellule ou d'un tissu est hautement dynamique puisqu'il évolue en fonction de son environnement (température, potentiel redox, stimuli émis par d'autres cellules... au niveau cellulaire ; stress, médication au niveau d'un organisme) ou de la condition pathologique : à un génome correspond une infinité de protéomes en évolution constante. Ces paramètres extérieurs influencent la complexité du protéome par la régulation au niveau transcriptionnel de l'expression des gènes et en modulant les modifications post traductionnelles des protéines. De plus, l'analyse de la totalité des protéines d'un milieu biologique est une gageure analytique en raison de la grande diversité des protéines (masse moléculaire de quelques acides aminés à plus de 500 kDa, point isoélectrique entre 4 et 14, et surtout une vaste gamme de concentrations protéiques variant d'un facteur 12).

De manière générale, les techniques d'analyse protéomique suivent un schéma commun : séparation des protéines et identification par spectrométrie de masse.

Chaque méthodologie présente des avantages ou inconvénients, et de par ses caractéristiques et limitations, est plus spécifiquement dédiée à la découverte ou la validation de biomarqueurs. De plus ces différentes méthodes donnent généralement des informations complémentaires, et sont souvent utilisées consécutivement dans les études protéomiques complètes d'identification de biomarqueurs [3].

En biologie fondamentale, elle va permettre une meilleure compréhension de la physiologie des cellules et leurs régulations sous l'influence de stimuli (approche sans a priori). L'un des premiers challenges est actuellement l'acquisition de données reliées à la croissance, la différenciation, la sénescence, aux modifications de l'environnement et aux manipulations génétiques. Un grand espoir se porte aussi sur la puissance de la protéomique pour identifier de nouvelles cibles d'interventions thérapeutiques sur les maladies, étant donné que près de 80 % des cibles des médicaments sont des protéines. En biologie clinique, la protéomique devrait permettre d'identifier des nouveaux marqueurs spécifiques et sensibles de maladies, qui pourraient s'avérer utiles au diagnostic et au pronostic des maladies humaines comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives ou encore infectieuses et inflammatoires. L'analyse protéomique peut également être utilisée avec profit dans les études toxicologiques [4].

Le but de notre étude est de faire le point sur les approches de la protéomique et ses avantages.

Le travail est divisé en deux parties:

- La première partie réservée aux généralités sur la protéomique est composée de trois (03) chapitres:
 - o Chapitre I parle des rappels sur la protéomique.
 - o Le chapitre II est consacré aux approches protéomiques classiques.
 - o Le chapitre III est consacré à la protéomique sans gel en biologie clinique.
- La deuxième partie relative aux applications, est divisée en deux chapitres:
 - o Le chapitre I relate les applications dans le domaine biomédical.
 - o Le chapitre II aborde les applications dans le domaine de la recherche clinique.



PREMIERE PARTIE :

GENERALITES SUR LA PROTEOMIQUE

CHAPITRE I : Rappels

I.1. Le Transcriptome

Si la génomique représente l'étude des génomes sur leur totalité, le transcriptome consiste à établir les profils d'expression des ARNm à grande échelle. Classiquement, plusieurs techniques permettent d'étudier la transcription des gènes; il s'agit par exemple du Northern blot ou de l'hybridation *in situ*. Toutefois, ces techniques sont d'utilisation difficile à grande échelle et les progrès sont venus du développement des Puces. Par principe, les ADN complémentaires de tous les gènes dont on désire étudier l'expression (en principe il pourrait s'agir de la totalité des gènes du génome) sont déposés sur une puce. Les ARNm des tissus ou des cellules à étudier sont alors extraits puis hybridés sur les ADNc de la puce. L'analyse des hybridations permet non seulement de déterminer les gènes qui sont exprimés mais également de disposer d'une mesure semi-quantitative du taux d'expression de chacun des gènes. En pratique et selon cette approche, ce sont surtout des analyses comparatives qui sont réalisées, par exemple la comparaison du profil d'expression des ARNm d'une cellule tumorale versus la même cellule normale [5].

À l'heure actuelle, d'autres systèmes sont en développement et ont pour but de supprimer l'analyse par microscopie confocale et font appel soit à des faisceaux de minuscules fibres optiques soit à un système permettant la genèse d'un courant électrique en cas d'hybridation sur une des sondes de la puce.

D'ores et déjà l'utilisation de ces puces à ADN a permis l'étude du transcriptome de nombreux procaryotes (étude de la transcription sur des puces portant 64 000 oligonucléotides et correspondant à la totalité des gènes de la levure) et le développement de puces pour l'étude du transcriptome chez l'homme est aujourd'hui en phase exponentielle. En dehors des puces, d'autres techniques sont également utilisables pour les études du transcriptome. Il s'agit

par exemple de la technique SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) qui associe une technique de sélection des transcrits (après synthèse d'ADNc) à un séquençage partiel [5].

I.2. Le Protéome

Le protéome est l'ensemble des protéines produites par un génome particulier et exprimées par des cellules, tissus ou organes à un moment donné, avec un historique donné, dans un environnement et des conditions donnés. Ainsi, le protéome peut être assimilé à une empreinte d'une condition particulière pathologique ou non. L'analyse protéomique consiste à caractériser, quantifier, identifier toutes les protéines présentes dans un milieu biologique. Les informations données par l'analyse du génome et du transcriptome et par l'analyse du protéome ne sont pas nécessairement redondantes. Ce sont, au contraire, des outils complémentaires pour la prise en charge des patients [6].

Sur un plan conceptuel, le protéome présente, par rapport au transcriptome, un certain nombre d'avantages évidents: seule la protéine (et non pas l'ARNm) présente un effet biologique; un même génome peut naturellement donner naissance à une variété quasi infinie de protéomes différents; le niveau d'expression d'une protéine ne peut être prédit « efficacement » à partir du seul niveau d'expression des messagers (les messagers d'un même gène sont eux-mêmes très variables et certains messagers sont peu, voire pas du tout, traduits) ; les protéines issues d'un même gène sont très variables, de même que les protéines d'un même ARNm (en prenant en compte toutes les modifications post-traductionnelles dont le clivage, la phosphorylation, la glycosylation...). Il faut d'emblée signaler que l'analyse protéomique se heurte à de nombreuses difficultés : il y a une quantité considérable de protéines possibles à analyser (sans doute plusieurs millions chez l'homme, en particulier du fait de la diversité des modifications post-traductionnelles); la mise en évidence de protéines faisant l'objet de modifications mineures (mutation nucléotidique ponctuelle de

type faux sens, aboutissant à une modification portant sur un seul acide aminé) reste très difficile ; les protéines sont des entités chimiques qui présentent une certaine fragilité en particulier vis-à-vis des protéases. De façon générale, l'analyse protéomique revêt plusieurs aspects dont la protéomique qualitative qui correspond à l'établissement de la liste de protéines exprimées par un échantillon biologique défini, la protéomique quantitative qui en plus de l'approche précédente permet de quantifier les protéines ainsi listées et l'analyse des interactions entre protéines [5].

Il est maintenant établi que le protéome de cellules cancéreuses ne subit qu'un nombre limité de modifications par rapport au protéome des cellules normales. Cela traduit probablement le fait que la cancérisation d'une cellule nécessite un nombre limité de modifications moléculaires. Au niveau génique, il a d'ailleurs été montré que l'on peut induire la cancérisation avec seulement quelques modifications (mutations de quelques oncogènes et gènes suppresseurs) et le même profil semble se dessiner au niveau protéique. Autre constatation, il existe une hétérogénéité, une diversité des tumeurs ainsi que de diversité des mécanismes menant à la cancérisation. Des différences en nombre limité et une variabilité d'une tumeur à l'autre, voilà les difficultés principales de l'analyse différentielle [7].

I.3. Les différents types d'analyses protéomique

On peut distinguer de façon conceptuelle deux grands types d'analyses protéomiques: la protéomique descriptive et la protéomique fonctionnelle.

Dans le premier cas, celui de la protéomique descriptive, il s'agit de répondre aux quatre questions suivantes: quelles protéines sont exprimées ; quel est le niveau de cette expression ; quelle est la localisation subcellulaire de ces différentes protéines et quelles sont les modifications post-traductionnelles dont elles font l'objet. Dans le second cas, celui de la protéomique fonctionnelle, on cherche à répondre à des questions du type : quelles sont les molécules qui au

sein de la cellule s'associent à nos protéines d'intérêt ; quel type de modifications structurales est responsable de quel type de modifications d'activité.

❖ En ce qui concerne *la protéomique descriptive*, la réponse à la question : quelles protéines ? relève plus précisément de la protéomique qualitative et ses techniques font appel à l'électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse, à des techniques séparatives diverses couplées à une analyse en spectrométrie de masse en tandem ou à des biopuces à protéines. L'aspect quantitatif de l'expression des protéines (protéomique quantitative) repose au plan méthodologique sur le principe du marquage différentiel effectué soit avant la phase d'extraction des protéines (approche *in vivo* par la méthode SILAC (Stable Isotope Labelling with Aminoacids in Cell culture)) soit après l'extraction de ces mêmes protéines (approche *in vitro* par marquage par des fluorochromes, par la méthode ICAT (Isotope Coded Affinity Tag) ou par la méthode ALICE (Acid-Labil Isotope-Coded Extractant)). En ce qui concerne la localisation subcellulaire de la production des protéines, elle relève de la protéomique « topologique » et s'appuie essentiellement sur la technologie MELK (Multiple-Epitope-Ligand « Kartographie »). Enfin, pour ce qui est des modifications post-traductionnelles, il est fait appel à une approche dite de Shotgun MS consistant en une chromatographie en phase liquide suivie d'une spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) sur un échantillon biologique correspondant à des peptides obtenus après clivage par différentes protéases [8].

❖ Au-delà de *l'analyse différentielle*, la protéomique offre maintenant la possibilité d'explorer les interactions protéine-protéine et les réseaux de signalisation intracellulaires qui gouvernent le phénotype et plus généralement le comportement des cellules cancéreuses. Ce domaine d'activité que l'on appelle protéomique fonctionnelle est actuellement en plein essor et est d'un intérêt primordial pour l'analyse des mécanismes moléculaires de la cancérisation. Des interactions, ligand-récepteurs, à l'activation de voies de

signalisation comme les MAP-kinases ou la régulation de l'activité des facteurs de transcription, rien n'échappe dorénavant à l'outil protéomique. Classiquement, l'analyse de la signalisation cellulaire se faisait par emploi d'anticorps antimolécules de signalisation et par un jeu couplant l'immuno-précipitation au Western-blot. Il était possible de mettre en évidence des interactions spécifiques. La limitation majeure de ces approches traditionnelles est le caractère préconçu des investigations. Si une protéine est suspectée intervenir dans un processus, l'investigateur se procure l'anticorps en question pour démontrer son implication. L'apport essentiel de la protéomique dans ce domaine est de permettre une approche sans a priori, dans laquelle de nouveaux partenaires non suspectés pourront être découverts. Ces potentialités font maintenant appel à des méthodologies spécifiques de mise en évidence des interactions, des marquages par isotope stables dont la détection en spectrométrie de masse peut permettre de mettre en évidence une protéine mais aussi de suivre ses modifications post-traductionnelles [9]. Dans le domaine du cancer du sein, le décryptage des voies de signalisation des facteurs de croissance et des hormones constitue une piste pour la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. Une illustration de la potentialité de ces approches est fournie par les travaux réalisés avec le facteur de croissance FGF. La cycline D a ainsi été montré être une cible de la signalisation de ce facteur de croissance et il a été mis en évidence que les protéines de stress, en particulier HSP-90 (Heat Shock Protéine 90) voient leur synthèse augmentée de façon importante dans les premières minutes de l'activation des cellules de cancer du sein par le FGF-2 [10, 11]. De façon intéressante, l'inhibition de l'activité de HSP-90 (par la substance geldanamycine) entraîne un blocage de l'effet mitogène du FGF-2 et se traduit par un blocage de la prolifération et de la migration des cellules de cancer du sein. Ainsi, HSP-90 est nécessaire à l'activation de la croissance des cellules de cancer du sein et cette protéine

constitue une cible thérapeutique potentielle pour la mise en place de traitements plus ciblés du cancer du sein.

Il est important de souligner que l'utilisation de la protéomique pour l'analyse de la signalisation nécessite la complémentarité avec d'autres approches de biologie cellulaire et moléculaire. Ainsi, une identification en spectrométrie de masse se fondant sur la reconnaissance d'une petite partie de la protéine (fragment trypsique) devra toujours être confirmée par une autre approche comme la reconnaissance par anticorps. La véracité d'une interaction devra toujours être confirmée en microscopie confocale afin de confirmer dans la cellule ce qui est constaté en tube à essai et l'effet d'une inhibition de la protéine d'intérêt devra être étudié après inhibition de la synthèse et/ou de l'activité de cette protéine par ARN interférence ou emploi de dominants négatifs. Il est également important de toujours vérifier de façon ultime l'impact sur le phénotype cellulaire (prolifération, migration différentiation, croissance sans ancrage). Ainsi, dans le domaine de l'analyse de la signalisation des cellules cancéreuses, la protéomique est un outil qui s'inscrit nécessairement dans une démarche plus globale et qui complémente l'arsenal technologique plus traditionnel [12].

CHAPITRE II : Les approches protéomiques

II.1. Electrophorèse en gel bidimensionnelle (2-DGE)

L'établissement du profil d'expression globale des protéines sous leurs formes variées dans un type cellulaire ou un liquide biologique est appelé protéomique descriptive. Cependant, seulement 500 à 1000 protéines sont caractéristiques d'un type cellulaire ; en effet, 80% des protéines ne sont pas spécifiques d'une cellule comme les « protéines de ménage » souvent fortement exprimées, car elles portent les fonctions essentielles à la vie de toute cellule. Or si l'on considère qu'il existe environ 250 cellules hautement différenciées dans le corps humain, 100000 protéines seraient potentiellement intéressantes. L'étude de celles-ci, et plus particulièrement de leurs différences d'expression en fonction de l'environnement et des conditions de vie, est appelée protéomique fonctionnelle. Les modifications de l'environnement induisent des variations d'expression de plusieurs protéines, spécifiques à cette cellule ou communes à différents types cellulaires. Le protéome constitutif est la ligne de base des études fonctionnelles et l'analyse des modifications post-traductionnelles prend ici une importance toute particulière. Toutes ces modifications induisent des changements dans la masse des polypeptides analysables par spectrométrie de masse (MS pour « mass spectrometry »), et visibles par les méthodes bidimensionnelles, en particulier l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DGE) qui est la technique au cœur de l'analyse protéomique. Finalement, la plus grande différence entre génomique et protéomique réside dans le fait qu'à un génome statique va correspondre une infinité de protéomes par organisme et en évolution constante, ce qui amène une vision plus dynamique (**figure 1**).

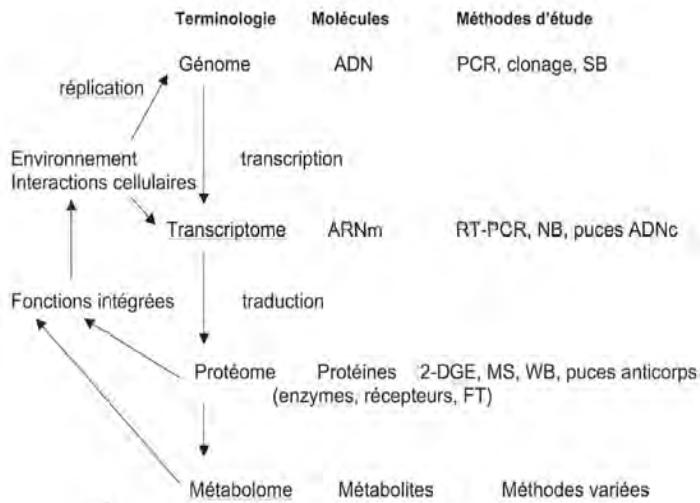


Figure 1 : Du gène à la protéine et leurs méthodes d'analyse [4].

L'approche protéomique classique associe la 2-DGE à l'analyse des taches d'intérêt par spectrométrie de masse en utilisant le principe du « peptide mass fingerprinting » (PMF), c'est-à-dire l'hydrolyse des protéines par une protéase, généralement la trypsine, puis de déterminer précisément la masse des peptides obtenus. Ceci est maintenant possible grâce aux grands progrès qu'a connus la spectrométrie de masse ces dernières années. Les masses des peptides sont alors enregistrées dans des banques de données et l'identité des protéines peut être retrouvée par la connaissance des sites de coupure par la protéase utilisée. Pour déterminer les modifications post-traductionnelles, il est nécessaire de combiner plusieurs types de MS.

La 2-DGE associe la séparation des protéines contenues dans l'échantillon biologique d'abord par isoélectrofocalisation (IEF) en fonction de leur point isoélectrique (pI), c'est la première dimension, puis par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (PAGE-SDS) en fonction de la masse moléculaire (M), c'est la deuxième dimension ; on réalise en fait ici un tamisage moléculaire [13].

L'IEF sur gel est devenue aisée et reproductible grâce aux gels à gradient de pH immobilisé dont il existe de nombreuses gammes plus ou moins étendues ; il existe aussi des méthodes d'IEF « off gel » donc en milieu liquide. Un grand

soin doit être apporté à la préparation des échantillons, toutes les protéines n'étant pas facilement solubles ni même extractibles; les méthodes actuelles permettent de travailler sur quelques dizaines de microgrammes de protéines et de réaliser des électrophorèses multiples en parallèle. Une fois les gels 2D réalisés, les protéines sont révélées par des méthodes de coloration classiques comme par le bleu de Coomassie colloïdal (CBB) ou le nitrate d'argent (AgNO_3) plus sensible (**figure 2**).

On peut aussi utiliser la révélation de radioactivité après marquage sélectif, par exemple l'incorporation de ^{35}S -méthionine en cours de traduction ou le marquage par le ^{32}P pour l'étude des phosphorylations. L'emploi de marqueurs fluorescents est en plein essor; le marquage peut être réalisé avant la 2-DGE, ou après l'étape d'IEF ou encore après la 2-DGE par exemple avec le SyproRuby®.

Cette méthode permet un marquage différentiel par l'utilisation de fluorochromes émettant à des longueurs d'onde différentes (méthode 2-DIGE à par exemple). Toutes ces méthodes de détection très sensibles sont compatibles avec la MS, mais elles nécessitent un appareillage coûteux [14].

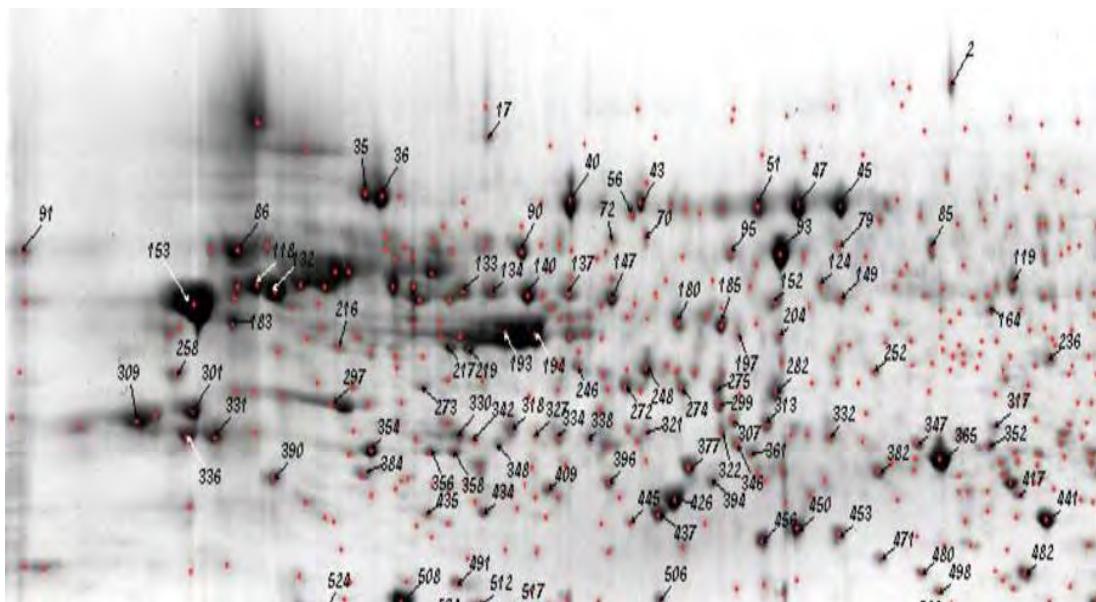


Figure 2 : Un exemple de profil d'électrophorèse bi-dimensionnelle avec l'étiquetage de taches contenant des protéines identifiées par spectrométrie de masse [15].

L'analyse des gels par un logiciel dédié va consister en l'acquisition des données, puis à diminuer le bruit de fond, éliminer des défauts sur les gels, dénombrer les taches (« spots »), les comparer par superposition de fichiers, enfin effectuer une quantification relative par des mesures d'intensité et de volume des spots, travail souvent long et nécessaire, suivi par des études statistiques. Une analyse protéomique complète va permettre d'établir une référence qui pourra se présenter sous forme d'une banque de données éventuellement mise à disposition sur internet [16]. Pour l'étude des complexes membranaires (et autres complexomes), on peut utiliser l'association de deux types d'électrophorèses : en 1re dimension le Blue Native-PAGE et en 2e dimension le PAGE-SDS. Une pré-purification des protéines est souhaitable, soit par « free flow electrophoresis » (IEF en veine liquide) soit par chromatographie d'exclusion stérique ; la préparation de microsomes (vésicules contenant du cytosol) doit être purifiée par éclatement du culot membranaire en détergent. Les protéines constitutives du complexe sont solubilisées en détergent neutre puis traitées par le bleu de Coomassie G-250 ; dans ces conditions les protéines se séparent assez bien dans le gel de polyacrylamide en gradient et dans un tampon qui contient de l'acide amino-6-caproïque (Blue Native-PAGE). Puis, comme dans la 2-DGE classique, les protéines subissent le tamisage moléculaire en PAGE-SDS. On peut colorer le gel 2D par le CBB, l'AgNO₃ ou encore utiliser un anticorps [17].

II.2. Identification des protéines par spectrométrie de masse (MS)

Les taches d'intérêt sont découpées des gels, soit manuellement au scalpel, soit de façon automatisée avec un gels-potter qui travaille sur des plaques à 96 trous. Chaque tache est ensuite traitée individuellement; notons que chacune peut contenir une ou plusieurs protéines. Le traitement par la trypsine se fait en micro-tubes ou, là encore, de façon automatisée en plaques 96 trous. Des protocoles précis d'hydrolyse trypsique ont été décrits ; il s'agit toujours d'un

travail long avec de nombreuses étapes nécessaires à la déshydratation du gel, l'extraction des peptides, le dessalage de l'hydrolysat peptidique, sa conservation (**Fig. 3**) [18].

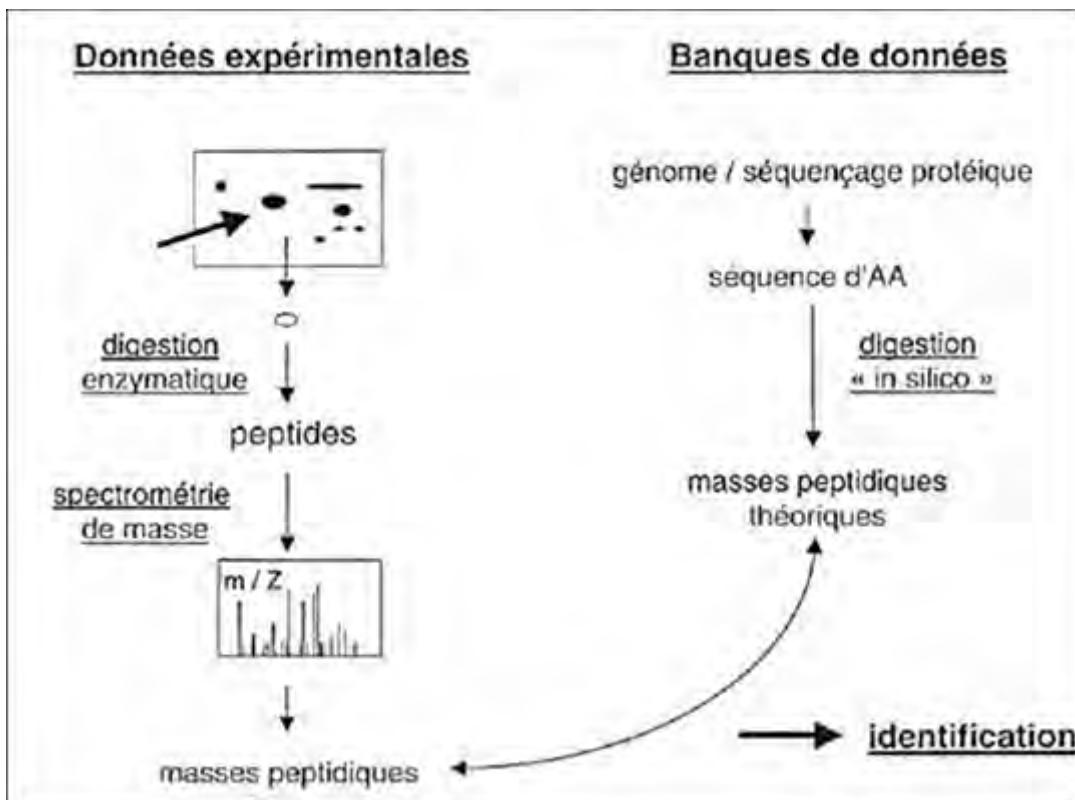


Figure 3 : Le principe du PMF (Peptide Mass Fingerprinting) : du découpage des morceaux de gel 2-DE à l'interrogation des banques de données pour l'identification de protéines [18].

La masse des peptides peut être obtenue aussi bien par MS de type MALDI-MS que ESI-MS, cette dernière étant généralement couplée à la chromatographie liquide (LC). Pour réaliser le PMF par MALDI-MS, l'hydrolysat est dilué dans une matrice de type cinnamique, déposé sur une plaque spéciale et séché ; en effet dans le principe du MALDI-MS (« Matrix-Assisted laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry ») la tâche du mélange séché est bombardée sous vide par un laser (typiquement un laser pulsé à 337 nm) qui excite les molécules et ionise les peptides qui vont être entraînés dans la

plume gazeuse pour entrer dans le champ électrique généré par un aimant qui accélère les ions, aussi sous vide, vers un détecteur [19].

Tous les MALDI-MS actuels permettent une acquisition automatique des données et des bombardements programmables; ils sont tous équipés du mode de détection en Temps de Vol (TOF ou « Time of Flight ») et du mode reflectron qui améliore la précision sur la masse et la résolution en diminuant la dispersion isotopique (**Fig. 4**).

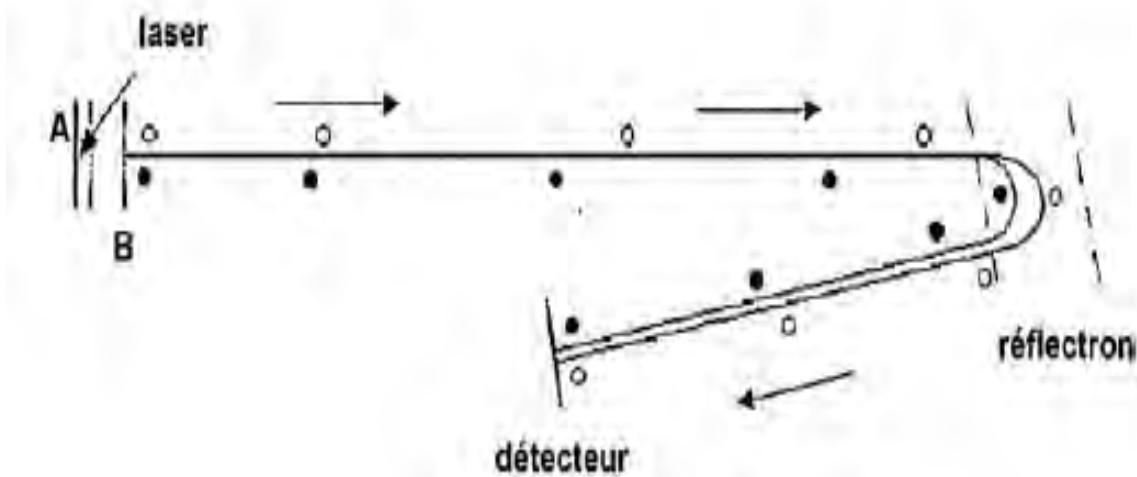


Figure 4 : Principe de la MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted laser Desorption/ Ionization - Time of Flight - Mass Spectrometry) avec détecteur reflectron. A: plaque de dépôt de l'échantillon inclus en matrice et bombardement par laser ; B: grille d'extraction ; une différence de potentiel est appliquée entre A et B [18].

Dans ce principe d'ionisation les ions peptidiques formés majoritairement sont monochargés donc de masse $M+ 1$ ($M+ H^+$); dans le détecteur TOF l'arrivée des peptides chargés se fait dans l'ordre croissant de masse les plus lourds étant ralentis, voire éliminés (la vitesse est une fonction inverse de la racine carrée du rapport M/Z) ; les ions monochargés sont analysés sous le rapport $M/Z-1$ avec Z égal 1, les ions doublement chargés ($M+2H^+$) sous le

rapport M/2–2 et ainsi de suite même si on voit peu de peptides plus de triplement protonés ($M + 3H^+$). Le reflectron permet de focaliser la distribution isotopique en favorisant l'émergence des peptides porteurs de ^{12}C majoritairement; les pics suivants, généralement accolés, contiennent une proportion de ^{13}C . Ce système de détection nécessite un calibrage par des peptides de masse connue à 10^{-4} Da, souvent des angiotensines et des neuropeptides ; on se sert aussi des peptides d'autodigestion de la trypsine pour un calibrage interne [9,20].

L'automatisation de toutes ces étapes, de la 2-DE à l'analyse par MALDI-MS, correspond à ce qu'on appelle la protéomique à haut débit, menant à identifier plusieurs centaines de protéines dans une même série. La dernière étape, si elle est fondée sur un travail avec des logiciels et des banques de données accessibles sur internet, reste longue et pas toujours couronnée de succès. Les deux principaux logiciels, Mascot® et Profound®, fondés sur des algorithmes différents, permettent d'interroger les principales banques de données protéiques que sont SwissProt®, Prosite® et celle de la NCBI (US National Center for Biotechnology Information) ; elles contiennent les séquences traduites des collections de séquences d'ADN maintenues dans la GeneBank, ainsi que les résultats de clivage par les protéases de séquences peptidiques connues [21].

CHAPITRE III : La protéomique sans gel en biologie clinique

III.1. Les couplages chromatographiques

D'emblée ces méthodes de couplage présentent l'avantage de garder l'échantillon en milieu liquide, donc de pouvoir l'analyser secondairement, voire de l'aliquoter pour effectuer de nouvelles analyses et de réaliser d'autres couplages plus ou moins directs [22]. Parmi ces méthodes alliant la CLHP à la MS on peut citer le MudPIT (« Multidimensional Protein Identification Technology ») qui combine la CLHP bidimensionnelle (échangeur cationique fort et phase inversée) à l'ESI-MS à trappe d'ions; cette méthode a permis de produire la plus grande analyse protéomique à ce jour avec 1484 protéines identifiées dans une lignée de levure, mais encore sans applications cliniques [23].

Selon des principes proches, la toute nouvelle technologie Proteome Lab® (Beckman-Coulter) couple deux chromatographies sur colonne (chromatofocalisation en 1^{re} dimension et phase inversée en 2^e) avec élution en continu des protéines et peptides de l'échantillon en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (pI et hydrophobie) ; les molécules recueillies pourront aussi être analysées par le classique PMF en MS, ou encore par électrophorèse capillaire étant donné que des couplages avec ces appareils ont été prévus [24]. Comme une analyse différentielle est possible, des résultats en clinique sont prévisibles à court terme; en effet ces méthodes affichent clairement leurs ambitions dans ce domaine.

Quant à la technologie ICAT (« Isotope-Coated Affinity Tag »), elle est fondée sur le marquage différentiel des protéines de deux séries d'échantillons par conjugaison de la biotine aux thiols cystéiniques par l'intermédiaire d'un linker léger ou lourd (enrichi en deutérium) ; les protéines différemment marquées sont mélangées et traitées par la trypsine; les peptides générés sont ensuite séparés sur colonne d'avidine (affinité en CLHP) et analysés par MS qui

verra la différence d'abondance entre les deux échantillons pour les peptides liant la biotine (masse + 8 pour les peptides deutériés). Toutes ces méthodes hautement résolutives souffrent d'un défaut de capacité suggérant un préfractionnement des échantillons et le développement d'outils bioinformatiques plus performants [25].

III.2. La protéomique quantitative

Plusieurs méthodes de quantification s'appuyant sur un marquage isotopique différentiel des protéomes ont été développées. Les échantillons sont marqués par des isotopes stables et analysés de façon simultanée. La technologie ICAT® (« isotope-coatedaffinity tag ») est basée sur le marquage différentiel des protéines de deux séries d'échantillons par conjugaison de la biotine aux thiols cystéiniques par l'intermédiaire d'un groupe léger ou lourd (enrichi en deutérium). Les protéines différemment marquées sont mélangées et traitées par la trypsine ; les peptides générés sont ensuite séparés sur colonne d'avidine (affinité en CLHP) et analysés par MS [25].

Sur des principes proches, on peut aussi citer la technologie iTRAQ® (« isobaric tags for relative and absolute quantitation ») utilisable sur certains spectromètres de masse; cette méthode présente l'avantage de permettre la réalisation d'analyses multiples sans compliquer le spectre MS (tag isobarique). Ces méthodes d'analyse différentielle par marquage isotopique chimique nécessitent l'emploi de logiciels d'analyse bioinformatique performants, indispensables à l'intégration de l'ensemble des données, tout en diminuant les risques de mauvaise identification ou quantification, qui n'est souvent que relative. Une quantification absolue (quantité exacte) est pourtant requise en biologie clinique pour l'évaluation de candidats biomarqueurs et en pharmacie pour le contrôle de qualité des médicaments. Suivant le principe de dilution isotopique, une quantification exacte d'un composé peut être obtenue en MS 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. Plusieurs méthodes de quantification exacte de peptides et protéines par IDMS (« isotopic dilution mass spectrometry ») ont été développées utilisant des peptides étalons marqués au ^{13}C et/ou à ^{15}N [26].

Quelques années plus tard a été publiée la méthode iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification) utilisant des sondes isobariques non radioactives fixées par liaison covalente sur l'extrémité N-Terminale et les chaînes latérales amines des protéines [27].

Il existe actuellement 8 sondes isobariques permettant la comparaison d'autant d'échantillons, analysés après marquage selon le même principe que l'ICAT. D'autres techniques de marquage métabolique *in vivo* par des isotopes simples (^{13}C , ^{15}N ou ^{18}O) ont été présentées en parallèle [28].

L'approche SILAC (Stable Isotope Labelling by Aminoacids in Cell culture), est utilisée pour comparer les protéomes de cellules en culture : les cellules sont cultivées en présence d'acides aminés marqués par les isotopes précédemment cités, et ces résidus s'incorporent dans les protéines lors de la traduction [29].

III.3. Les biopuces à protéines et les analyses multiparamétriques

Les biopuces, initialement développées dans le domaine de la génomique, autorisent aujourd'hui l'analyse de plusieurs centaines de milliers de séquences en une seule expérience. Cependant compte tenu de la grande diversité et l'hétérogénéité des protéines, il n'est pas réalisable de transposer ce principe à l'étude du protéome dans sa globalité. Néanmoins plusieurs types de biopuces s'intéressant à un groupe spécifique ou une famille particulière de protéines sont actuellement proposés. La technique d'analyse protéomique haut débit SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight) associe un fractionnement du protéome sur des puces à protéines (échange d'anions, cations...) à une détection par un spectromètre de masse en temps de vol [30]. Cette technique est spécifiquement dédiée aux études de protéomique clinique

car outre son extrême sensibilité (déttection jusqu'à la femtomole) elle permet l'analyse rapide de nombreux échantillons. Sa principale faiblesse réside en son impossibilité d'identification stricte des biomarqueurs, qui sont seulement caractérisés par leur masse moléculaire et leur affinité pour un type de biopuces.

Il convient de différencier la technologie du SELDI-TOF, qui est une technique de protéomique pure utilisant les puces à protéines pour une fragmentation des protéines en plusieurs sous-protéomes, des analyses multiparamétriques (dites multiplexes) qui s'intéressent à un nombre certes important, mais prédéfini de protéines. Parmi ces techniques qui appartiennent néanmoins au champ de la protéomique au sens large du terme, on distingue les technologies réalisées sur support solide de celles faites en milieu liquide [2]. Le principe général des analyses multiplexes en phase solide est la mise en évidence quantitative d'une interaction entre un ligand fixé sur une surface et un biomarqueur à doser [31].

Les protéines d'intérêt dosées par ces puces sont évaluées classiquement selon la méthode sandwich utilisée dans les tests ELISA. Pratiquement plusieurs types d'anticorps immobilisés au fond d'un puits de plaque ELISA ou sur la surface plane d'une puce, capturent leurs antigènes cible qui sont détectées dans un second temps grâce à un anticorps secondaire marqué.

La révélation est ensuite réalisée par la méthode adaptée au marquage (chimioluminescence, fluorescence...) et lecture par des systèmes dédiés (scanner ou caméra CCD, Charge Coupled Device).

Le système d'analyse en milieu liquide repose sur une approche de capture/déttection comparable, à la différence que les anticorps de capture sont fixés sur des billes colorées, chaque couleur étant associée à la mesure d'un biomarqueur spécifique. Le dosage est effectué par une technique de type cytométrie de flux, dans laquelle un premier laser détecte le type de billes, et un second assure la quantification par lecture de l'intensité du marquage par l'anticorps secondaire.

La technologie la plus aboutie fonctionnant sur ce principe est le système Luminex®, permettant d'étudier jusqu'à 500 paramètres dans un volume d'échantillon de 50 µl [32].



DEUXIEME PARTIE :

APPLICATIONS

L'étude du complément protéique total d'un génome offre aux biologistes les clés des portes que le séquençage de l'ADN ne peut pas les ouvrir. En effet, la génomique ne permet pas de saisir toute la complexité du fonctionnement cellulaire.

Les données qui en découlent ne suffisent pas à déterminer:

- la raison pour laquelle un gène particulier est exprimé à un instant donné,
- la concentration relative des produits d'expression,
- l'importance des modifications post-traductionnelles,
- les effets de la surexpression ou de la sous-expression d'un gène,
- la présence de gènes de petite taille, ou encore les phénotypes dus aux phénomènes multigéniques.

Ainsi, élucider chacun de ces points requiert une analyse des produits des gènes, ARN messagers (ARNm) ou protéines. Toutefois, un ARNm n'a qu'une seule fonction: celle de porter temporairement une information. De plus, son expression ne conduit pas directement à l'expression des molécules dont dépend la vie cellulaire. Ainsi, seule la protéomique qui est une étude ciblée directement sur les protéines peut aller au-delà des limites de la génomique et vise à déterminer les niveaux et le mode d'expression des protéines, leurs éventuelles modifications post-traductionnelles, les relations qui se nouent entre elles [33].

De façon très générale, la protéomique est utilisée en biochimie, en bactériologie-mycologie, en toxicologie, en immunologie, en hématologie, en cancérologie, en rhumatologie, en neurologie, en anatomie-pathologie, en pneumologie, en cardiologie, en monitoring-thérapeutique, en recherche.

CHAPITRE I : Applications de la protéomique dans le domaine biomédical

I.1. En Biochimie Médicale

La protéomique est utilisée pour comprendre les mécanismes physiopathologiques. Elle permet d'identifier des marqueurs prédictifs pour le diagnostic des maladies biochimiques. Elle permet aussi l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux médicaments.

Ainsi plusieurs auteurs ont travaillé sur la mucoviscidose (MV) qui est une maladie génétique à transmission autosomale récessive et qui est due aux mutations sur le gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane protein). Plus de 1600 mutations de CFTR ont été identifiées, la mutation la plus fréquente étant une délétion de Phe en position 508, $\Delta F508$.

Certains chercheurs auteurs tentent surtout d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour la mutation $\Delta F508$ CFTR dans la mucoviscidose. Ainsi, Roxo-Rosa et al. Ont effectué les premiers travaux de protéomique dans le contexte de la mucoviscidose depuis en utilisant la protéomique différentielle (gels 2D associées à la spectrométrie de masse (SM) de type MALDI-TOF) [34]. Les résultats de ces travaux ont montré que 2 filaments intermédiaires, les kératines 8/18 (K8/18), sont impliqués dans le dysfonctionnement de $\Delta F508$ CFTR [35].

Une autre approche biophysique de SM permettant aussi l'analyse des structures des protéines a permis de préciser les sites d'interaction entre K8 et $\Delta F508NBD1$.

Récemment, l'association des techniques de dock-in avec les approches de biologie cellulaire, de physiologie et de biophysique a conduit à l'identification de molécules « interruptrices » des interactions et correctrices de l'activité de $\Delta F508CFTR$ dans les cellules provenant des malades atteints de mucoviscidose.

En conclusion, les approches de protéomique et de SM, en association avec d'autres méthodologies s'avèrent être indispensables pour comprendre les

mécanismes physiopathologiques, et contribuer utilement à la recherche de correcteurs des dysfonctionnements observés au cours des maladies. L'exemple des recherches sur la MV le montre très clairement [36].

I.2. En Bactériologie Médicale

L'identification rapide des microorganismes par MS-MALDI- TOF repose sur l'analyse des protéines ribosomales et des protéines associées aux membranes après transfert d'une colonie ou extraction des protéines. Elle passe par une comparaison des spectres obtenus avec des spectres de référence validés [37].

La protéomique est de plus en plus réalisée sur des microorganismes modèles ou pathogènes. De ce fait, certains auteurs ont travaillé sur les mécanismes d'efflux et la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène important en médecine humaine et il est surtout associé aux infections rencontrées chez les patients hospitalisés. À côté de la faible perméabilité de sa membrane externe, l'expression de plusieurs systèmes d'efflux, dont l'activité a été rapportée pour la première fois en 1994, lui permet de résister à divers antibiotiques et biocides [38].

Le génome de *P. aeruginosa* est parmi les plus gros génomes bactériens et permet l'expression d'un grand nombre de protéines impliquées dans la régulation, le transport, la virulence et la résistance; cette capacité assure une adaptation et une flexibilité importante à la bactérie. Plusieurs gènes, associés en opéron, codant pour des éléments de pompes d'efflux ont été caractérisés chez *P. aeruginosa* (**tableau I**) [39].

Tableau I : Pompes d'efflux et résistance [39].

Agents antibactériens	Pompes d'efflux							
	MexAB	MexCD	MexEF	MexGH	MexJK	MexXY	MexVW	TriABC
Pénicillines	+	+				+		
Céphalosporines	+					+		
Aztréonam	+	+						
Céfémique		+				+		
Imipénème								
Méropénème	+					+		
Aminoglycosides						+		
Fluoroquinolones	+	+	+	+	+	+	+	
Triméthoprime	+	+	+					
Chloramphénicol	+	+	+					
Tétracycline	+	+	+		+			
Triclosan	+	+	+		+			+

Les mécanismes d'efflux impliqués en clinique sont présentés en fonction des différentes classes d'antibactériens. Ces pompes sont associées à d'autres mécanismes (perte de porine, enzymes, etc.) contribuant au phénotype MDR.

Le séquençage entier du génome de *P. aeruginosa* a permis d'identifier des gènes codant pour plusieurs pompes d'efflux dont 12 codant pour un transporteur de type RND, et l'implication de quatre d'entre elles a été prouvée dans la résistance aux antibiotiques (**Fig. 5**) [40].

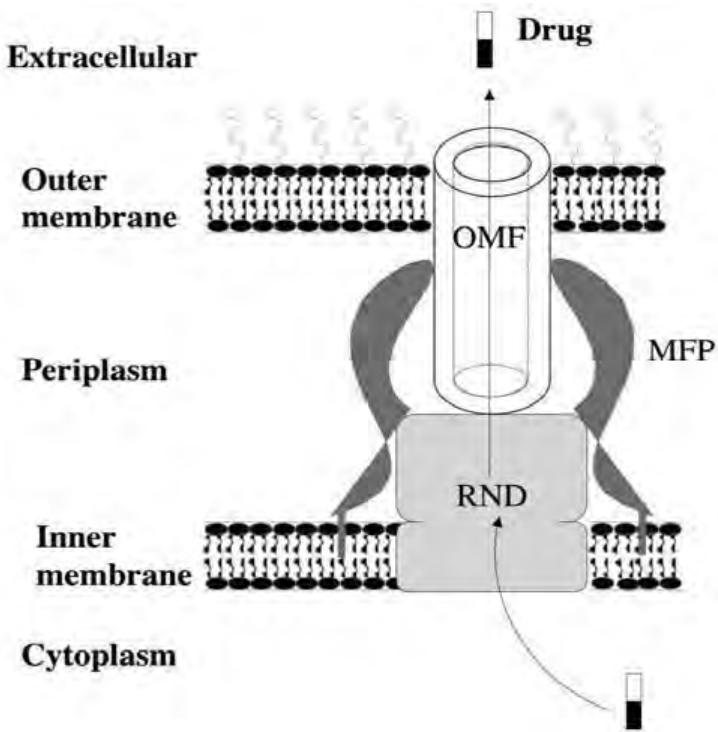


Figure 5 : Représentation schématique d'une pompe d'efflux [39].

La détermination des structures cristallographiques de ces différentes protéines a apporté des informations majeures pour la compréhension de certains aspects du mécanisme de l'efflux du système RND [39].

D'autres auteurs ont utilisé la protéomique pour l'identification d'*Acinetobacter spp.* au laboratoire fréquemment isolé de l'environnement et de la flore cutanée, et responsable d'infections opportunistes. La principale espèce impliquée en pathologie humaine est *Acinetobacter baumannii* dont le véritable habitat reste encore aujourd'hui mal précisé. L'identification de ces bactéries peut être délicate à toutes les étapes, de l'examen direct (cette bactérie à Gram variable est souvent confondue avec un staphylocoque) jusqu'à l'identification de l'espèce, quasi impossible avec les caractères biochimiques utilisés habituellement. Un critère simple et pratique en laboratoire: seule l'espèce *baumannii* et certaines souches du groupe génomique 13 T&U ont une croissance à 44 °C. L'identification protéomique via le MALDI-TOF paraît prometteuse, mais les bases de données doivent être consolidées [41].

La spectrométrie de masse par désorption laser assistée par matrice (matrix assisted laser desorption ionisation time of flight ou MALDI-TOF) permet l'identification des microorganismes par analyse de leur contenu protéique, principalement les protéines ribosomales [42]. Méthode rapide et fiable pour les bactéries d'intérêt médical, elle montre des performances comparables à celles d'un système automatisé d'identification phénotypique de référence. En effet, avec les bases de données actuelles en MALDI-TOF, l'identification est satisfaisante au genre mais pose encore des problèmes pour l'identification au rang d'espèce.

I.3. En Toxicologie

L'analyse protéomique peut aussi être utilisée en toxicologie, domaine où elle a montré son potentiel très tôt [43]. Même si les études toxicologiques sont très lourdes, elles peuvent utiliser des marqueurs indirects, ce qui diminue l'impact du manque d'exhaustivité de l'analyse protéomique [44, 45].

La toxicologie est probablement un des champs où le potentiel de l'analyse protéomique est le plus grand. Les techniques protéomiques permettent de comprendre le mécanisme d'action d'une drogue ou d'identifier ses cibles.

Certains auteurs ont fait des études sur la toxicité des agents thérapeutiques. Ainsi, Vido et al. ont cherché à identifier des activités responsables de la détoxification du cadmium, métal lourd très toxique à faible concentration, chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ils ont comparé le profil d'expression des protéines totales de levures soumises à un stress au cadmium et non traitées: 54 protéines sont induites et 43 sont réprimées. Parmi ces protéines induites, ils ont pu identifier deux voies: glutathion et thioredoxine, qui semblent être essentiels pour une protection contre l'empoisonnement au cadmium [46].

Par ailleurs, d'autres ont consacré leurs études sur la radiotoxicité. Les effets secondaires à court terme s'expliquent grandement par le mode d'action

cytotoxique de la radiothérapie. L'hypothèse de la cellule cible qui prédomine depuis plusieurs années, suppose ainsi que les effets secondaires soient dus à la perte cellulaire par mort radio-induite avec pour résultante une déficience fonctionnelle au niveau de l'organe cible. Si cette hypothèse semble plausible pour les effets secondaires précoces, elle reste difficilement applicable aux effets tardifs, qui supposent des mécanismes plus complexes sur le long terme. La réponse tissulaire est en effet le siège d'activations cellulaires multiples aboutissant notamment à la fibrose radio-induite [47].

Plusieurs études aussi se sont focalisées sur l'effet des rayonnements ionisants sur le protéome en vue d'identifier des marqueurs dosimétriques sans les relier à un effet secondaire particulier. Ces types de marqueurs sont utilisés pour déterminer quelle dose d'irradiation a pu recevoir une personne exposée à des rayonnements.

L'étude de Ménard et al. a pu identifier par une approche de type surface-enhanced laser desorption and ionization-time of flight (SELDI-TOF) une série de marqueurs sériques dont la concentration varie au cours du traitement (23/29) [48].

Ainsi, Ao et al. , par une approche de protéomique quantitative ont pu mettre en évidence 76 protéines sériques qui voient leur expression modifiée entre deux groupes de patients. Parmi celles-ci, le complément C3, la C4b-binding protein alpha chain et la vitronectine sont particulièrement surexprimées chez les sujets atteints d'une toxicité tardive sévère [47].

I.4. En Immunologie

L'utilisation de la protéomique en immunologie nous permet de mieux comprendre le système immunitaire ainsi que les causes et les mécanismes de son dysfonctionnement.

De ce fait plusieurs auteurs ont utilisé les approches protéomiques pour déterminer des Auto-Ag des différentes composantes subcellulaires dans les

hépatites auto-immunes (HAI). On distingue habituellement dans le cadre des hépatopathies auto-immunes, les affections auto-immunes à tropisme hépatocytaire, les hépatites auto-immunes (HAI) et celles à tropisme bilaire, cirrhose biliaire primitive (CBP) et cholangite sclérosante primitive. Des manifestations d'auto-immunité avec en premier lieu la présence d'auto-anticorps (Ac) sont souvent indispensables au diagnostic [49].

La plupart de ces Ac antinucléaires (AAN), antimuscles lisses (AML), antimicrosomes de foie et de rein de type 1 (liver kidney microsome, LKM-1), anticytosol de foie de type 1 (liver cytosol, LC-1), anti-mitochondries sont dépistés par une technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) sur coupes tissulaires qui ne préjuge pas de leur cibles moléculaires [49, 50]. Cette cible est pourtant fondamentale à connaître. C'est pour cela que certains auteurs ont pu identifier des auto-Ag de la membrane plasmique grâce à la protéomique.

Toda et al. ont identifié un de ces Ag membranaires comme un sulfatide par SM [51].

Tahiri et al. ont mis en évidence d'autres molécules, dont des heat shock proteins (HSP) ainsi qu'une liver arginase [52]. Mais ces protéines ne sont pas connues habituellement comme ayant une localisation à la membrane plasmique. Cependant, des travaux de Sostaric et al. basés sur l'analyse protéomique rapportent la localisation possible à la membrane plasmique des HSP [53].

Ainsi Ballot et al. ont travaillé sur l'Ag soluble liver antigen (SLA) par approche protéomique. Dans leur étude, des isoformes de l' α -énolase sont rapportées comme étant le SLA de 50 kDa. Cette même analyse a identifié aussi d'autres protéine SLA reconnues par une faible proportion de sérum de malades, de masse moléculaire 35 et 58 kDa, respectivement, la N-hydroxyaryl amine sulfotransférase et des isoformes de la catalase [54]. On peut noter que l' α -énolase a été identifiée par analyse protéomique comme auto-Ag dans plusieurs maladies auto-immunes, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux

disséminé, la maladie cœliaque, l'encéphalopathie d'Hashimoto, la maladie de Behçet, ainsi que dans l'asthme et certains cancers [55].

Ces sérums positifs pour les Ac anti-LKM atypiques marquent une bande à 25 kDa sur immunoblot avec du cytosol et du microsome de foie et de rein de rat. En électrophorèse bidimensionnelle, cette bande focalise sous plusieurs spots s'étalant de pI 7,5 à pI 9,5. L'identification par SM des spots immunoréactifs trouve une GST thêta-2 de rat qui présente 59% de similitude avec la GST-T1 humaine, confirmant le résultat de l'identification par immunocriblage. L'analyse protéomique des autres spots immunoréactifs met aussi en évidence d'autres isoformes de la GST, appartenant aux familles alpha, mu et pi, plus distantes phylogénétiquement de la famille thêta qu'elles ne la sont entre elles, posant le problème de la reconnaissance d'un épitope commun ou non. Mais d'autres cibles sont identifiées dans ces spots immunoréactifs, la sous-unité bêta-1 du protéasome ainsi que l'anhydrase carbonique de type III [56].

I.5. En Hématologie biologique

Dans ce domaine, la protéomique permet la caractérisation et l'identification de mélanges complexes de protéines dans des échantillons biologiques. Les applications de la protéomique sont innombrables et font déjà partie intégrante du savoir nécessaire au développement de l'hématologie. Ses progrès technologiques intéressent au plus haut point le monde de la médecine transfusionnelle. L'application des techniques protéomiques à la médecine transfusionnelle a récemment fait l'objet d'un grand intérêt, tant au niveau de la connaissance fondamentale des composés sanguins (globules rouges, plaquettes, leucocytes, cellules souches, et plasma), que de l'étude des conditions de stockage des produits sanguins et du contrôle de l'impact des procédés de production sur la qualité des produits (**Tableau II**) [57].

Tableau II : Résumé des différentes analyses protéomiques et des méthodes utilisées [57].

	Sujet de l'étude	Méthodes
Érythrocytes	Analyse protéomique	SDS-PAGE et 2DE, MALDI-MS
	Analyse protéomique membranaire et soluble	LC-MS/MS
	Analyse protéomique membranaire et soluble	SDS-PAGE, LC-MS/MS
	Analyse protéomique	Enrichissement avec ProteoMiner, SDS-PAGE et 2DE, LC-MS/MS
	Analyse protéomique	Déplétion hémoglobine (IMAC) et anhydrase carbonique (SCX), SDS-PAGE, LC-MS/MS
	Modèle d'interactions protéiques, comparaison individu sain et malade	Prédiction in silico utilisant des bases de données
	Modèle d'interactions protéiques, identification de biomarqueurs	Prédiction in silico utilisant des bases de données
	Mode d'action de l'hydroxyurée dans le traitement des drépanocytes (<i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>)	DIGE
	Interactions bande 3 et complexe Rh	Immunoprécipitation et western blot
	Analyse protéomique membranaire, comparaison anémie hémolytique	BN/SDS-PAGE, sonde fluorescente, LC-MS/MS
	Lésions de stockage, influence oxygène et inhibiteur de protéase	2DE, LC-MS/MS
Plasma	Caractérisation des protéines membranaires lors du stockage, érythrocytes et vésicules	LC-MS/MS
	Oligomérisation de la peroxyrédoxine, stress oxydatif et stockage	BN-PAGE, <i>western blot</i> , LC-MS/MS
	Oxydation de protéines après traitement au bleu de méthylène et illumination	2DE, LC-MS/MS
	Impact de la lyophilisation du plasma et de l'inactivation des pathogènes par analyses protéomiques	DIGE, MALDI-MS/MS
	Contrôle qualité de produits dérivés de plasma (facteur VIII et von Willebrand)	SDS-PAGE, LC par exclusion de taille, LC-MS/MS, iTRAQ
	Suivi de production de produits dérivés de plasma (facteur IX)	SDS-PAGE, LC par exclusion de taille, LC-MS/MS, iTRAQ
	Contrôle qualité production facteur VIII	MudPIT
	Analyse protéomique, protéines membranaires et interactions	SDS-PAGE, MudPIT, LC-MS/MS
	Analyse protéomique de plaquettes activées	SELDI-MS
	Analyse protéomique	2DE, MALDI-MS/MS, LC-MS/MS
Plaquettes	Analyse protéomique membranaire	SDS-PAGE, 2DE, LC-MS/MS
	Analyse phosphoprotéomique	IMAC, SCX, LC-MS/MS
	Analyse protéomique, phosphorylation des tyrosines	Immunoblotting, 2DE, MALDI-MS
	Analyse protéomique et phosphoprotéomique, interactions protéine-protéine	SDS-PAGE, immunoblotting, IMAC, LC-MS/MS
	Analyse protéomique des granules alpha	SDS-PAGE, immunoblotting, LC-MS/MS
	Analyse protéomique lors de l'activation plaquettaire par différents agonistes	2DE, LC-MS/MS
	Analyse protéomique de plaquettes stimulées par la thrombine	Microrotofor, SDS-PAGE, immunoblotting, LC-MS/MS
	Variation du protéome lors du stockage	2DE, LC-MS/MS
	Analyse protéomique de microparticules de plaquettes	SCX et RP-LC-MS/MS
	Lésions dues au stockage, analyse protéomique du surnageant	2DE, LC-MS/MS

Certains auteurs ont porté leurs études sur les érythrocytes pour montrer toute la complexité de l'appareil protéique du globule rouge par les approches protéomiques.

En 2002, Low et al. ont identifié 84 protéines membranaires par une approche d'électrophorèse mono et bidimensionnelle [58].

En 2004, Kakhniashvili et al. ont identifié 181 protéines (91 associées à la membrane et 90 protéines solubles) par chromatographie liquide–spectrométrie de masse en tandem [59]. Jusqu'à maintenant, l'essentiel des études protéomiques du globule rouge a porté sur le catalogage des protéines, et relativement peu sur la biologie de la cellule.

Deux groupes ont essayé d'exploiter les listes de protéines produites par ces études protéomiques pour prédire *in silico* des réseaux d'interactions entre protéines, et finalement extraire de l'information biologique de ces données brutes: Goodman et al. sont parvenus à produire un modèle d'interactions protéiques qui rend compte des différences connues entre globule rouge d'un individu sain et atteint de drépanocytose [60].

En suivant une approche similaire, Alessandro et al. ont pu montrer d'une part l'importance des défenses contre le stress oxydatif dans le globule rouge, ont validé leur modèle en montrant le rôle central de Sec23B, une protéine impliquée dans le transport du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi et dans la vésiculation chez les érythroblastes et qui a été identifiée par d'autres études comme marqueur d'anémies congénitales de type II [61]. Ces efforts pour extraire de l'information biologique des catalogages protéomiques sont complétés par des études plus ciblées qui comparent, d'une part, les protéomes de globules rouges sains et atteints d'une pathologie donnée et, d'autre part, qui essaient de mettre en évidence des réseaux d'interactions entre protéines. Par exemple, l'équipe de Goodman s'est attachée à comprendre le mécanisme d'action de l'hydroxyurée dans le traitement de la drépanocytose: en comparant des globules rouges de patients traités *in vitro* par l'hydroxyurée ou non traités,

il a pu être montré par une approche en DIGE que des protéines participent à la lutte contre le stress oxydatif (catalase, thioredoxine peroxydase, biliverdine réductase) ou au maintien de l'intégrité de la membrane (chaperon incontaining TCP1 complex) [62].

Par la suite, une étude *in vivo* a confirmé ces résultats: chez des patients, des modifications des protéines responsables du contrôle du cytosquelette et de la dégradation et réparation des protéines ont été observées par une analyse par DIGE des globules rouges avant et après traitement [63]. Ces deux études montrent que l'outil protéomique permet d'obtenir des renseignements détaillés sur le mode d'action de l'hydroxyurée dans le traitement des drépanocytoses.

Récemment D'Amici et al. ont étudié par électrophorèse bidimensionnelle l'évolution du protéome des membranes de globules rouges stockés en condition habituelles, en absence d'oxygène et en présence d'inhibiteur de protéases. Leurs résultats montrent clairement que le stress oxydatif est responsable de l'essentiel des modifications observées lors du stockage, qui affectent principalement des protéines du cytosquelette [64].

Les résultats obtenus par l'analyse protéomique des globules rouges lors du stockage ont donc permis de confirmer que le stress oxydatif joue un rôle important dans la lésion de stockage, et que la membrane du globule rouge subit un profond remodelage dès les premiers jours.

De très nombreuses études ont été consacrées ces dernières années à la caractérisation des protéines plaquettaires et à leur rôle dans la fonction de ces particules sanguines. Le protéome plaquettaire est de mieux en mieux caractérisé, et les sous-fractions, telles que le protéome membranaire, le glycoprotéome, le phosphoprotéome de constituants particuliers telles que les granules alpha ont été explorées [57].

Ainsi Majek et al. ont utilisé la protéomique pour comparer l'activation des plaquettes par la thrombine, le collagène ou l'acide arachidonique en vue de mettre en évidence les modifications des cascades événementielles impliquées

dans l'activation plaquettaire par ces différents agonistes [65]. L'effet de l'activation plaquettaire par la thrombine sur l'expression de protéines telles que HIP-55 a été évalué par Tucker et al. [66]. Ces différentes études ont montré la complexité des interactions protéiques plaquettaires et ont permis d'ébaucher la caractérisation systématique de l'expression du génome au niveau plaquettaire.

Les données obtenues par l'analyse protéomique des plaquettes sont particulièrement importantes pour définir les protocoles d'études qu'il faut mettre en place pour mieux comprendre l'effet du milieu et de la durée de conservation des plaquettes sur les lésions de stockage plaquettaire. Quelques études portant sur ce sujet ont été publiées ces dix dernières années [67, 68, 69]. En utilisant une approche d'électrophorèse bidimensionnelle combinée à la spectrométrie de masse, Thiele et al. ont mis en évidence une série de modifications du profil protéique durant le stockage, notamment touchant la septine 2, la chaîne bêta de l'actine, ainsi que de la gelsoline qui pourraient être utilisées comme marqueurs des lésions apoptotiques induites par le stockage [67].

D'autres ont abordé la caractérisation des protéines ou de microparticules plaquettaires relâchées dans le surnageant des plaquettes stockées jusqu'à sept jours [70, 71]. Une série de protéines, ayant potentiellement un rôle biologique dans l'interaction plaquettes–endothélium (tremlike transcript 1 et integrin-linked kinase) ont été découvertes dans le milieu de conservation. De plus, plusieurs peptides tels que CXCL7, PDGF, ou CCL5 ont été mis en évidence avec une augmentation marquée lorsque la durée de stockage passait de cinq à sept jours. Ces études semblent, pour plusieurs auteurs, être suffisamment prometteuses pour que certains pensent que les outils protéomiques puissent être considérés comme étant potentiellement utiles pour le contrôle de la qualité [57].

Plusieurs groupes ont récemment proposé d'utiliser les outils protéomiques pour l'optimisation et le contrôle qualité des procédés utilisés pour produire du plasma transfusionnel et des dérivés thérapeutiques du plasma [57]. Par

exemple, le groupe de Josic a utilisé les outils protéomiques pour caractériser toutes les étapes de production de plusieurs protéines thérapeutiques, comme le facteur VIII, le facteur IX, à partir de plasma humain [72, 73]. D'autres auteurs ont utilisé les derniers outils protéomiques mis au point pour identifier les contaminants présents dans les formulations thérapeutiques dérivées du plasma, comme Basilico et al. dans différentes préparation de facteur VIII [74].

CHAPITRE II : Applications en recherche expérimentale

Tous les outils de l'analyse biologique moderne sont utilisés par les groupes de recherche impliqués dans la recherche expérimentale touchant les cellules souches. La protéomique ne fait pas exception et les cellules souches d'origine embryonnaire, germinative, dérivées de sang de cordon ou adultes ont été analysées par des outils protéomiques... [57].

Il faut cependant remarquer que ces études n'ont pas, pour l'instant, permis de disséquer des mécanismes moléculaires qui permettent d'orienter la recherche dans une voie déterminante, ni de trouver les clefs associées à la différentiation spécifique d'une cellule souche vers une cellule différentiée. En revanche, l'analyse protéomique fait indéniablement partie de l'arsenal qui sera utilisé pour le contrôle de la qualité des cellules qui seront produites dans des bioréacteurs et joue un rôle dans les processus associés à l'ingénierie et à la thérapie cellulaire de demain... [57].

II.1. En Cancérologie

L'apport de la protéomique dans la recherche sur les différents cancers existants est crucial. Tout d'abord, l'identification et la détermination des fonctions des protéines permet une meilleure compréhension des évènements cellulaires, ce qui procure de nouvelles pistes de recherche dans les mécanismes de cancérisation [75].

En effet l'expression de nombreux gènes est altérée lors de la transformation cancéreuse et lors de la progression tumorale. Ces modifications génétiques et transcriptionnelles se traduisent par des altérations quantitatives et qualitatives des protéines présentes dans la tumeur, l'environnement péritumoral et les fluides biologiques. L'analyse protéomique permet l'étude globale des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles [76].

En cancérologie, il est possible d'explorer le protéome tumoral et le protéome circulant. L'exploration du protéome tumoral se fait directement sur la tumeur. En conséquence, elle s'applique aux tumeurs détectées par les approches conventionnelles. Elle vise à mieux classer les tumeurs en établissant des profils d'expression protéiques ayant une valeur pronostique et à comprendre la maladie dans sa globalité. L'exploration du protéome circulant est plutôt dédiée à la recherche de nouveaux marqueurs circulants caractéristiques d'un type de cancer. Les marqueurs circulants offrent en théorie la possibilité de détecter un cancer par l'examen d'un fluide biologique comme le sang ou les urines. Ils sont soit dérivés de protéines secrétées ou libérées par les cellules cancéreuses dans la circulation sanguine, soit traduisent au niveau sanguin des modifications engendrées par la présence d'une tumeur dans un organe [77, 78].

Les auteurs ont travaillé sur les différents types de cancers par la protéomique. Mais nous allons donner l'exemple du cancer des cancers du sein qui restent la première cause de mortalité féminine entre 35 et 55 ans.

De nouveaux marqueurs ont été identifiés plus récemment. C'est le cas notamment de la chaperonne moléculaire 14-3-3 sigma qui est déterminée par Vercoutter-Edouart et al. grâce à la protéomique. Cette étude montre que le taux de protéine 14-3-3 sigma est dix fois moindre dans les cellules de cancer du sein que dans les cellules mammaires normales et son niveau apparaît très faible dans les biopsies de cancer du sein [79].

De façon complémentaire à l'analyse protéomique, Hermeking et al. en utilisant les méthodes de la génomique, ont montré une hyperméthylation du gène de 14-3-3 sigma dans les cellules de cancer du sein, entraînant une perte d'expression des ARNm de 14-3-3 sigma dans les tumeurs mammaires [80]. 14-3-3 sigmag est maintenant considérée comme un marqueur précoce de la cancérisation mammaire et cette protéine suscite également de l'intérêt pour son rôle potentiel dans le contrôle du phénotype tumoral. En définitive, la mise en évidence de 14-3-3 sigma comme suppresseur de tumeur illustre la

complémentarité des approches de la génomique et de la protéomique pour la mise en évidence de modifications moléculaires caractéristiques du processus de cancérisation.

Un autre exemple est constitué par le facteur de croissance NGF (nerve growth factor). Facteurs de neurotrophique par excellence, le NGF est bien connu pour son rôle stimulateur de la survie et la différenciation des neurones au cours du développement du système nerveux. De façon inattendue, l'équipe de Dollé a montré par analyse protéomique que ce facteur de croissance est fortement exprimé dans les cellules de cancer du sein alors qu'il n'est pas trouvé dans les cellules épithéliales mammaires normales [81].

II.2. En clinique

Depuis quelques années la recherche de biomarqueurs a fait l'objet d'un nombre grandissant d'études dans le champ de la rhumatologie, particulièrement dans le cadre des rhumatismes inflammatoires. De ce fait nous allons donner l'exemple du diagnostic de rhumatisme inflammatoire dans lequel l'outil protéomique est extrêmement intéressant car il parvient à déceler des protéines spécifiquement exprimées dans différents milieux biologiques.

Certains auteurs ont consacré leurs études sur le protéome du sérum. Par exemple, après avoir montré par chromatographie 2D, que la protéine S100A9 est surexprimée dans le liquide synovial de polyarthrite rhumatoïde (PR), Drynda et al. ont caractérisé la surexpression de l'hétéro-complexe S100A8/S100A9 dans le plasma de 23 PR [82]. L'étude par chromatographie liquide HPLC (high-performance liquidchromatography) de Zheng et al sur du plasma d'un nombre plus restreint de patients souffrant de PR a confirmé la possibilité d'utiliser les protéines de la famille S100 comme biomarqueurs diagnostiques de PR [83].

L'équipe de Seny, en utilisant la technique SELDI-TOF (Surface-enhanced laser desorption/ionization - time of flight) plus adaptée à l'analyse d'un nombre important de patients, suggère que la protéine S100A8 offre une sensibilité de 75 % pour une spécificité de 85 % pour le diagnostic de PR [84]. Dans une autre étude, Liu et al. montrent qu'un algorithme combinant 4 biomarqueurs détectés par cette même technique offre une sensibilité de 90 % et une spécificité de 92 % pour le diagnostic de PR [85].

D'autres auteurs ont fait des études du protéome du liquide synovial et de la salive. Le sang circulant offre l'avantage d'être facilement accessible pour l'ensemble des patients. Cependant l'analyse du protéome d'autres liquides biologiques permet de s'affranchir de certains problèmes techniques liés aux protéines majoritaires ou à la dilution des protéines d'intérêts dans le sérum (**Fig. 6**). Certains milieux biologiques peuvent présenter l'intérêt de porter l'empreinte de la réaction inflammatoire. Par exemple, le liquide synovial reflète de manière plus fine la synovite rhumatoïde tout comme la salive l'atteinte des glandes salivaires du syndrome de Gougerot- Sjögren (GS) [86]. L'équipe de Baillet a comparé le protéome du liquide synovial de PR à celui d'arthrose et d'arthrite non rhumatoïde [87]. Parmi les 74 pics protéiques du liquide synovial dont l'intensité est statistiquement différente entre le groupe PR et arthrose et les 27 pics dont le signal diffère dans le liquide synovial de PR et de synovite non rhumatoïde, les trois biomarqueurs les plus surexprimés dans le groupe PR sont les protéines S100A8, S100A12 et S100A9. La protéine S100A8, dont l'expression est dix à quinze fois plus importante dans le liquide synovial de PR, offre une sensibilité de 91 % et une spécificité de 75 % pour le diagnostic de PR devant une arthrite inflammatoire.

Le syndrome de GS, fréquemment associé à la PR, peut parfois poser des problèmes diagnostiques. Ainsi l'équipe de Hu et de Ryu ont fait des études protéomiques de la salive de patients souffrant de cette pathologie et ont révélé la surexpression de β 2-microglobuline et d'IgG κ [88, 89].

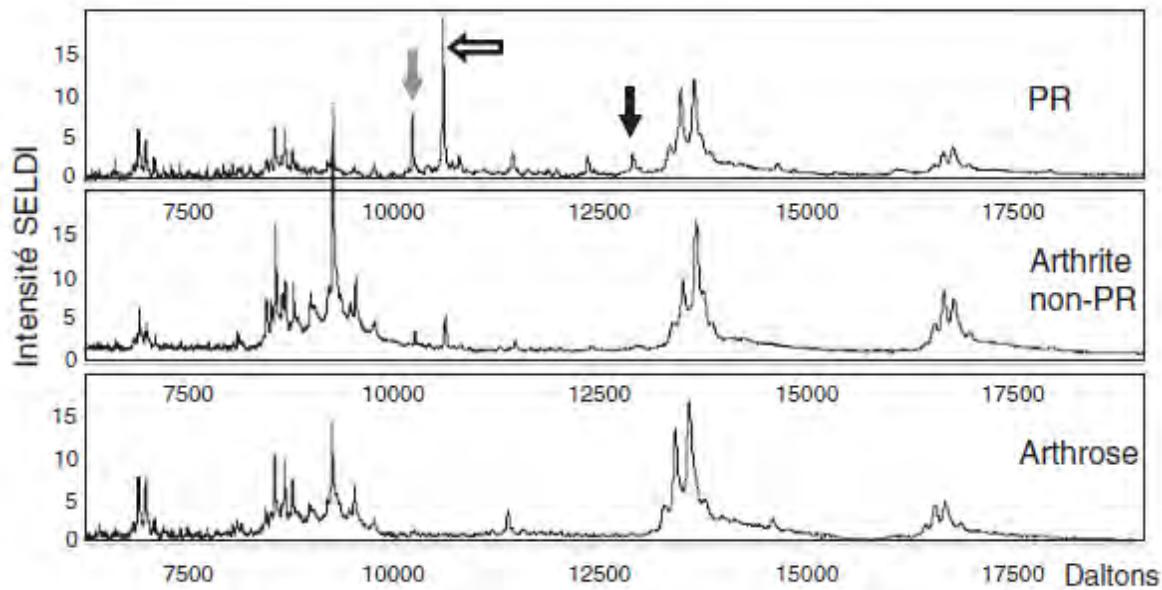


Figure 6 : Protéome du liquide synovial de patient souffrant de polyarthrite rhumatoïde (PR), d'arthrite non rhumatoïde et d'arthrose par technique SELDI-TOF. Les protéines S100A8 (flèche blanche), S100A9 (flèche noire) et S100A12 (flèche grise) sont surexprimées dans le liquide synovial de PR [86].

L'analyse clinique protéomique du LCR représente un outil majeur dans la découverte de marqueurs biologiques dans le champ des affections neurologiques. Les marqueurs biologiques du LCR apparaissent comme des outils essentiels en termes de diagnostic, de pronostic et de valeur prédictive de l'état pré symptomatique; ils permettent également d'approcher les mécanismes physiopathologiques des affections neurologiques. L'intérêt d'un diagnostic précoce et valide s'est avéré croissant, en particulier dans les affections neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer [90].

Ainsi on donne l'exemple de la maladie d'Alzheimer. En effet trois principaux marqueurs biologiques sont particulièrement étudiés dans le LCR pour le diagnostic de la MA: la protéine Tau totale, sa forme phosphorylée phospho-Tau et le peptide A- β . Ces marqueurs sont les témoins des deux lésions histopathologique de la MA, leur validation est actée pour le diagnostic positif

de la MA, et reste à définir pour les stades précoces de l'affection et dans les diagnostics différentiels.

L'une des avancées dans le champ des marqueurs biologiques dans le cadre de la MA restent la possibilité de doser de façon indépendante les formes phosphorylées de Tau ou phospho-Tau (P-Tau). Ainsi, les différentes P-Tau peuvent être analysés par Elisa sur différents épitopes dont principalement les thréonines 181, 231 et les serines 199, 235, 396 et 404. Le dosage le plus couramment utilisé est celui développé par la société Innogenetics¹ dirigé contre l'épitope en thréonine en 181. Les valeurs de référence varient avec l'âge. La valeur seuil pathologique de ce dosage est supérieure à 60 pg/ml (valeurs de référence du test ELISA) [91].

II.3. En anatomopathologie

Dans ce domaine, la protéomique permet d'analyser des tissus extrêmement variés (tube digestif, foie, cœur, rein, glandes salivaires accessoires, voies aériennes, poumon, larynx, cavité buccale, organes génitaux, organes lymphoïdes, synoviale, œil, thyroïde, voies urinaires et tissus mous) pour rechercher des protéines cibles.

Nous allons donner l'exemple de typage optimal des amylose qui font aujourd'hui partie des quelques exemples de maladies pour lesquels la protéomique est réalisée en pratique clinique. Les amyloses forment un large spectre de maladies liées à la présence dans l'espace extracellulaire de différents tissus, de dépôts protéiques insolubles de conformation bêta plissée responsables d'une toxicité cellulaire. Ce repliement protéique anormal confère aux dépôts amyloïdes une biréfringence jaune-vert spécifique après coloration par le Rouge Congo et analyse en lumière polarisée. Aujourd'hui, une trentaine de protéines sont reconnues comme pouvant être responsables d'amylose [92].

Le succès de la protéomique pour ce typage est avant tout lié au fait que la protéine recherchée est habituellement la protéine dominante au sein des dépôts analysés.

L'équipe de Colombat a eu l'occasion d'analyser différents tissus par différentes techniques. Les résultats montrent que l'immunomarquage n'est pas contributif dans 92 % des cas, essentiellement du fait de l'absence de fragment de tissu congelé. Pour les 8 % restant, une spectrométrie de masse est quand même réalisée du fait d'un doute clinique sur l'exactitude des résultats de l'immunomarquage. Sur les 94 amyloses (96 échantillons provenant de tissus variés) étudiées, la protéomique est informative dans 95 % des cas. Le pattern d'amylose avec co-expression de l'apo E et du composant P est présent dans tous les cas. Les variétés d'amylose identifiées sont: amylose AL ou primitive (48 %), amylose ATTR (23 %), amylose AA (9 %), amylose apo AI (5 %), amylose apo AVI (2 %), amylose à calcitonine (2 %), amylose à chaîne alpha du fibrinogène (2 %), amylose apo AII (1 %), amylose à insuline (1 %), amylose à lysozyme (1 %) et amylose à séménogéline (1 %).

Le typage est pertinent avec l'ensemble des données (cliniques, biologiques et génétiques) du dossier du patient dans 97 % des cas. Pour les 3 % restant (2 apo AVI et 1 AL), le résultat du typage méritent d'être confirmé par des techniques plus complexes [93].

Parallèlement cette même équipe a constitué deux groupes témoins : un groupe de divers tissus sains ($n= 15$) et un groupe de maladie des dépôts de chaînes légères (LCDD) pulmonaires ($n= 9$) [94]. Pour les tissus sains, l'analyse protéomique n'a pas mis en évidence de protéine amyloïde dominante. Pour les cas de LCDD, l'analyse protéomique a identifié une chaîne légère kappa dominante sans le cortège de protéines habituellement associées aux amyloses (Fig. 7), ces auteurs rapportent le cas d'une amylose dont le typage a nécessité le recours à la protéomique [95].

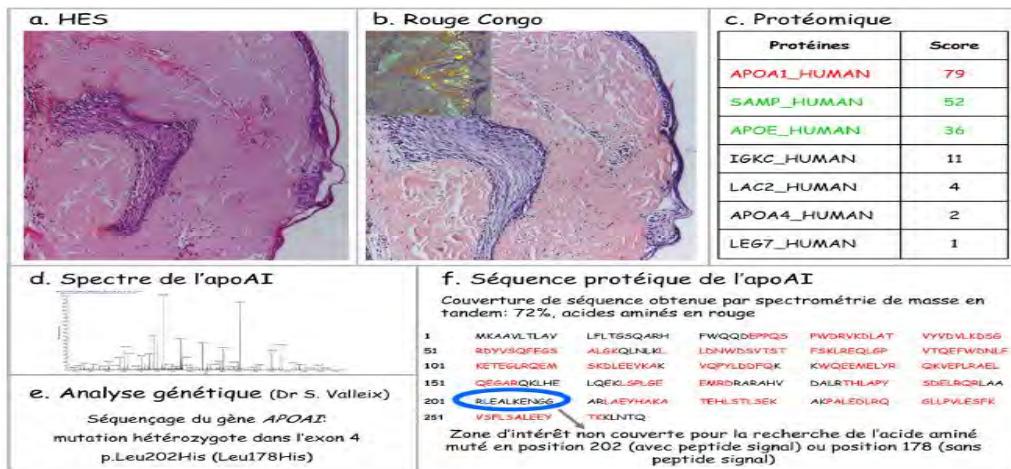


Figure 7 : Exemple de typage par protéomique d'une amylose inhabituelle [93].

II.4. Monitoring thérapeutique-pharmacologie

L'analyse protéomique s'applique en pharmacologie à l'estimation in vitro de l'efficacité des nouveaux médicaments et à l'étude comparative des relations structure/activité d'une série de composés.

La caractérisation complète du protéome mitochondrial peut mener au développement de nouveaux médicaments, en particulier dans le domaine des anti-cancéreux qui viendraient alors enrichir la liste des principes actifs protéiniques, comme l'érythropoïétine et l'interféron [33].

Ainsi nous pouvons donner des exemples d'application de la protéomique sur l'étude de l'efficacité des agents thérapeutiques. De nombreuses études utilisant la protéomique ont déjà été utilisées pour étudier les effets d'un médicament sur des échantillons biologiques.

Le groupe de Eberini a fait une application de la protéomique aux effets d'agents thérapeutiques par l'établissement de profils protéiques typiques d'une catégorie d'agents. Cette étude montre que l'indométhacine a servi à établir un profil d'expression protéique typique des agents anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID) [96]. En établissant le même type de profil pour d'autres

NSAID potentiels, il devient alors possible de prédire leur efficacité par comparaison avec le profil type correspondant au traitement à l'indométhacine.

De même, le groupe de Lück a observé le devenir d'un système de prise de thérapeutique par voie intraveineuse constitué de particules de latex servant de transporteur pour l'agent thérapeutique. En comparant les gels 2D des protéines adsorbées sur ces particules dans différents milieux *in vitro*, sérum frais ou inactivé, plasma, il a pu déterminé que ces particules provoquent l'activation de la voie alternative du complément, permettant ainsi leur élimination *in vivo* [97].

Par ailleurs d'autres auteurs ont travaillé sur l'identification de marqueurs prédictifs de la réponse à la radiothérapie grâce à l'approche protéomique.

Dans le cas du cancer du sein, Wang et al. ont identifié un panel de protéines impliquées dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires aux radiations en comparant des cellules MCF radiorésistantes avec des cellules MCF radiosensibles [98]. Par une approche 2-DE/MS, 100 protéines différentiellement exprimées entre les deux lignées cellulaires ont été identifiées. La peroxyrédoxine II (PrxII) présente un niveau d'expression quatre fois plus élevé dans les cellules MCF radiorésistantes que dans les cellules MCF radiosensibles. La diminution de son niveau d'expression par des ARN interférents conduit à une radiosensibilisation des cellules MCF, alors que sa surexpression augmente la radiorésistance des cellules MCF.

De par son rôle dans les processus d'oxydoréduction, ces résultats sur la PrxII montrent l'importance des dérivés réactifs de l'oxygène dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires aux radiations. Smith et al. ont, quant à eux, utilisé une combinaison de trois approches protéomiques pour l'analyse de la radiorésistance de cellules du cancer du sein [99]. Ils ont ainsi utilisé la 2-DE/MS, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), et une méthode quantitative par iTRAQ pour identifier des biomarqueurs prédictifs de la radiorésistance tumorale mammaire. Trois

lignées cellulaires de cancer du sein (MCF7, MDA-MB-231 et T47D) et leurs dérivées radiorésistantes (MCF7RR, MDA-MB-231RR et T47DRR) ont été analysées. En 2-DE/MS, les auteurs ont identifié 50 protéines présentant un changement d'expression significatif dans une ou plusieurs lignées cellulaires radiorésistantes. En LC-MS/MS, 242 et 310 protéines ont été identifiées respectivement dans la lignée parentale T47D et la lignée dérivée T47DRR. Enfin, par iTRAQ, les auteurs ont identifié 40 protéines présentant une différence d'expression significative entre les trois lignées cellulaires parentales et leurs dérivées. Parmi l'ensemble des protéines identifiées, les auteurs se sont plus particulièrement intéressés à deux protéines sous-exprimées dans les trois lignées cellulaires radiorésistantes: la protéine du protéasome 26S et la protéine GRP78. Il est à noter cependant que cette dernière protéine GRP78 est surexprimée dans les lignées cellulaires radiorésistantes de carcinomes nasopharyngés [100].

Dans le cas des Cancer de la tête et du cou, Ramsamooj et al. ont été les premiers à comparer les profils protéiques de lignées cellulaires tumorales de la tête et du cou radiorésistantes et radiosensibles [101]. Par des approches d'électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse (2-DE/MS), les auteurs ont identifié 14 protéines préférentiellement exprimées dans les lignées cellulaires radiorésistantes et 15 protéines préférentiellement exprimées dans les lignées cellulaires radiosensibles.

Récemment, Lin et al. ont étudié deux autres lignées cellulaires tumorales par protéomique [102].

Après fractionnement subcellulaire, les auteurs ont identifié par spectrométrie de masse, 64 protéines potentiellement associées à une radiorésistance tumorale. Parmi elles, nombreuses sont celles impliquées dans la régulation de la réponse au stress, l'apoptose et la glycolyse.

Il s'agit notamment de l'annexine V (sous-exprimée dans les lignées cellulaires radiorésistantes) et de la Gp96, la Grp78, l'HSP60. De manière intéressante, la sous-régulation de Gp96 rend sensible les cellules radiorésistantes *in vitro* et *in vivo*. Dans un autre modèle, notamment de carcinome nasopharyngé, Feng et al. ont identifié 34 protéines différentiellement exprimées entre une lignée cellulaire radiosensible de carcinome nasopharyngé et son clone radiorésistant en utilisant une approche combinant la 2-DE et l'identification par MALDI-TOF [100]. Quatre de ces protéines, Mn-supéroxyde dismutate, GRP78, 14-3-3 σ et Maspin, ont ensuite été validées par western blot et immunohistochimie sur 39 biopsies tumorales radiorésistantes et 51 radiosensibles. La combinaison de ces quatre protéines permet de discriminer les carcinomes nasopharyngés radiosensibles des radiorésistants avec une sensibilité de 90 % et une spécificité de 88 % [103].

II.5. Parasitologie

Plusieurs études protéomiques sont utilisées en parasitologie pour identifier des protéines qui peuvent être des marqueurs ou cible thérapeutique. Mais nous focalisons seulement dans l'étude protéomique de la sortiliné, un récepteur déterminant pour la toxoplasmose causée par le parasite *Toxoplasma gondii*.

Les apicomplexes, y compris *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum* qui représentent un vrai problème de santé publique et vétérinaire. Ils ont comme dénominateur structural commun la présence de trois organites apicaux: rhoptries, micronèmes et granules denses exclusivement trouvés dans ces parasites et essentiels pour envahir et survivre dans les cellules hôtes. Les récepteurs qui sont responsables dans le tri, le transport des protéines présentes dans ces organites sécrétoires ne sont pas encore connues mais demeurent au centre du développement de stratégies thérapeutiques.

Les travaux de Tchilabalo et al. ont porté sur un récepteur putatif nommé TgSORTLR ("T. gondiiSortilin-LikeReceptor") qui est localisé simultanément dans l'appareil de Golgi et les structures endosomales. L'étude protéomique du complexe protéique, isolée grâce à l'utilisation d'un agent chimique pontant le DSP, a permis d'identifier des protéines partenaires telles que les micronèmes (MIC1, MIC4) et les rhoptries (ROP1, ROP2, ROP4 et ROP5).

Ils ont démontré que le domaine N-terminal de TgSORTLR interagit spécifiquement avec les protéines ROP et MIC, alors que son extrémité cytoplasmique C-terminale se fixe spécifiquement aux protéines endosomales et joue un rôle capital dans le trafic antérograde et rétrograde du récepteur, dans sa localisation subcellulaire et ses fonctions biologiques.

Ainsi, la TgSORTLR est non seulement impliquée dans le tri des protéines mais également dans la biogénèse d'organites apicaux, et l'infection de l'hôte [104] et permet donc d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques contre la toxoplasmose, le paludisme et autres maladies parasitaires humaines et vétérinaires.

CONCLUSION

La protéomique est la technique qui permet l'étude du protéome. Le protéome désigne l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe, à un instant donné et dans un environnement donné. La protéomique fait partie des approches dites « post-génomiques », comme l'analyse des métabolites (« métabolomique »), des interactions protéiques (« interatomique ») ou encore des lipides (« lipidomique »). Elle permet de déterminer les protéines qui sont exprimées, leurs niveaux d'expression, leurs localisations subcellulaires et leurs modifications post-traductionnelles. Elle permet aussi de déterminer les molécules qui au sein de la cellule s'associent à nos protéines d'intérêt et le type de modifications structurales qui est responsable de quel type de modifications d'activité.

L'étude du complément protéique total d'un génome offre aux biologistes les clés des portes que le séquençage de l'ADN ne peut pas les ouvrir. En effet, la génomique ne permet pas de saisir toute la complexité du fonctionnement cellulaire. Les données qui en découlent ne suffisent pas à déterminer la raison pour laquelle un gène particulier est exprimé à un instant donné, la concentration relative des produits d'expression, l'importance des modifications post-traductionnelles, les effets de la surexpression ou de la sous-expression d'un gène, la présence de gènes de petite taille, ou encore les phénotypes dus aux phénomènes multigéniques. Elucider chacun de ces points requiert une analyse des produits des gènes, ARN messagers (ARNm) ou protéines. Toutefois, un ARNm n'a qu'une seule fonction: celle de porter temporairement une information. De plus, son expression ne conduit pas directement à l'expression des molécules dont dépend la vie cellulaire. Ainsi, seule la protéomique qui est une étude ciblée directement sur les protéines peut aller au-delà des limites de la génomique.

L'approche protéomique est fondée sur le couplage de trois technologies de pointe :

- l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE), qui permet de séparer plusieurs milliers de protéines d'un même échantillon;
- la spectrométrie de masse (MS), qui permet d'identifier ces protéines et met en évidence leurs modifications post-traductionnelles;
- la bioinformatique, qui permet la quantification du niveau des protéines et la constitution de bases de données.

Un grand espoir se porte sur la puissance de la protéomique pour identifier de nouvelles cibles d'intervention sur les maladies et leurs traitements étant donné que près de 80 % des cibles des médicaments sont des protéines (soit des enzymes, des récepteurs ou encore des facteurs de transcription). Plus encore, elle peut identifier des protéines marqueurs spécifiques et sensibles de maladies, biomarqueurs qui sont utiles aux diagnostics, pronostics, suivis évolutif et thérapeutique des maladies humaines comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, infectieuses, inflammatoires etc.

De façon très générale, dans le domaine biomédical, la protéomique est principalement utilisée en biochimie médicale, en bactériologie médicale, en toxicologie, en immunologie et en hématologie biologique. En recherche expérimentale, elle est aussi principalement utilisée en cancérologie, en clinique, en anatopathologie, en Monitoring thérapeutique-pharmacologie et en parasitologie.

En biochimie, elle peut être utilisée pour l'identification d'une nouvelle cible thérapeutique ex : recherche de la mutation $\Delta F508CFTR$ dans la mucoviscidose.

En bactériologie médicale, la protéomique est de plus en plus réalisée sur des microorganismes modèles ou pathogènes ex: recherche des mécanismes d'efflux de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques.

La toxicologie est probablement un des champs où le potentiel de l'analyse protéomique est le plus grand. Certains auteurs ont fait des études sur la toxicité

des agents thérapeutiques comme par exemple l'identification des activités responsables de la détoxification du cadmium, métal lourd très toxique à faible concentration, chez *Saccharomyces cerevisiae*. Par ailleurs, d'autres auteurs ont consacré leurs recherches sur la radiotoxicité des rayonnements ionisants.

L'utilisation de la protéomique en immunologie nous permet de mieux comprendre le système immunitaire ainsi que les causes et les mécanismes de son dysfonctionnement. De ce fait plusieurs auteurs ont utilisé les approches protéomiques, par exemple pour la détection des Auto-Ag des différentes composantes subcellulaires dans les hépatites auto-immunes (HAI).

Dans le domaine de l'hématologie biologique, ses progrès technologiques intéressent au plus haut point le monde de la médecine transfusionnelle. Ainsi, l'application des techniques protéomiques à la médecine transfusionnelle a récemment fait l'objet d'un grand intérêt, tant au niveau de la connaissance fondamentale des composés sanguins (globules rouges, plaquettes, leucocytes, cellules souches, et plasma), que de l'étude des conditions de stockage des produits sanguins et du contrôle de l'impact des procédés de production sur la qualité des produits.

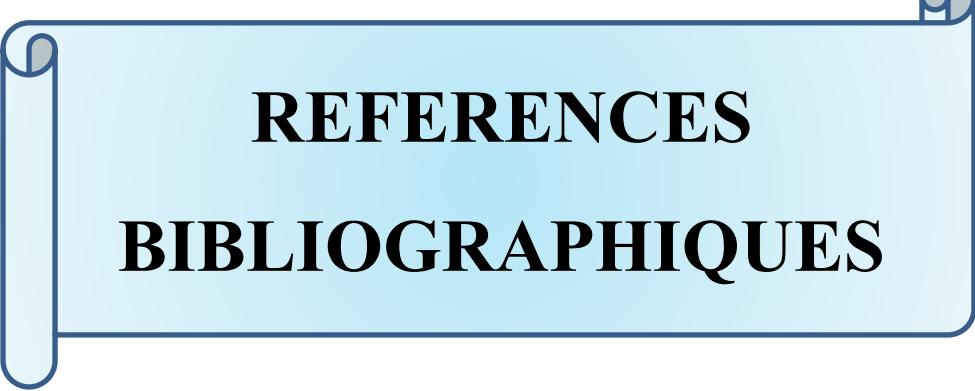
En cancérologie, l'apport de la protéomique dans la recherche sur les différents cancers existants est capital. Dans ce domaine, il est possible d'explorer le protéome tumoral et le protéome circulant. L'exploration du protéome tumoral se fait directement sur la tumeur. L'exploration du protéome circulant est plutôt dédiée à la recherche de nouveaux marqueurs circulants caractéristiques d'un type de cancer. Des auteurs ont beaucoup travaillé sur les cancers du sein qui restent la première cause de mortalité féminine entre 35 et 55 ans.

En clinique, depuis quelques années la recherche de biomarqueurs a fait l'objet d'un nombre grandissant d'études. Certains auteurs utilisent la protéomique pour le diagnostic de rhumatisme inflammatoire, d'autre aussi l'ont

utilisé pour la caractérisation des marqueurs biologiques dans le cas de la maladie d'Alzheimer.

Dans le Monitoring thérapeutique-pharmacologie la protéomique s'applique en pharmacologie à l'estimation *in vitro* de l'efficacité des nouveaux médicaments et à l'étude comparative des relations structure/activité d'une série de composés. La caractérisation complète du protéome mitochondrial peut mener au développement de nouveaux médicaments, en particulier dans le domaine des anti-cancéreux qui viendraient alors enrichir la liste des principes actifs protéiniques, comme l'érythropoïétine et l'interféron. Ainsi certains auteurs ont fait des applications de la protéomique sur l'étude de l'efficacité des agents thérapeutiques. Par ailleurs d'autres auteurs ont travaillé sur l'identification de marqueurs prédictifs de la réponse à la radiothérapie grâce à l'approche protéomique.

L'ambition initiale de la protéomique de description au niveau moléculaire de l'ensemble fonctionnel du génome par l'exploration d'un inventaire de la totalité des protéines reste encore loin d'être atteinte. Aujourd'hui, la protéomique est utilisée pour mesurer l'expression de gènes par la quantification des protéines pour caractériser un processus biologique et en déterminer les mécanismes de contrôle. Les attentes sont nombreuses dans le domaine du diagnostic, mais le coût de telles techniques va limiter l'utilisation aux pathologies pour lesquelles aucun autre moyen précoce de diagnostic n'est utilisable. Dans le domaine thérapeutique, ces attentes vont viser la caractérisation non seulement de nouvelles molécules actives sur des cibles particulières, mais aussi l'activité thérapeutique de nouveaux produits.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. **BAUDIN B.** Ed. Protéomique, spectrométrie de masse et analyses multiples. *Cahier de formation Biologie Médicale n °46. Paris : Bioforma ; 2010.*
2. **LEHMANN S, DUPUY A, PEOC'H K, ET AL.** Présent et future de la protéomique clinique. *Ann Biol Clin, 2007;65:463-71.*
3. **RUIZ-ROMERO C, BLANCO FJ.** Proteomics role in the search for improved diagnosis, prognosis and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage 2010;18:500-9.*
4. **BRUNO B.** Protéomique et spectrométrie de masse. *Revue Francophone Des Laboratoires - Décembre 2011 - N°437.*
5. **D. PORQUET.** Protéome et transcriptome. *Transfusion Clinique et Biologique, 2003, 10, 214–216.*
6. **ATHAN B, CANDICE T, PHILIPPE G.** Analyse protéomique en rhumatologie : implication dans la prise en charge des rhumatismes inflammatoires. *Revue du Rhumatisme, 2011, 78, S187-S 190.*
7. **VERCOUTTER-EDOUART AS, LEMOINE J, LE BOURHIS X, LOUIS H, BOILLY B, NURCOMBE V, et AL.** Proteomic analysis reveals that 14-3-3 sigma is down-regulated in human breast cancer cells. *Cancer Res 2001; 61:76–80.*
8. **DOMINIQUE PORQUET.** Analyse protéomique : stratégies méthodologiques et applications en biologie clinique. *SPECTRA BIOLOGIE n° 145 • Mai 2005.*
9. **AEBERSOLD R, MANN M.** Mass spectrometry-based proteomics. *Nature 2003; 422:198–207.*
10. **VERCOUTTER-EDOUART A, LEMOINE J, SMART CE, NURCOMBE V, BOILLY B, PEYRAT J, et AL.** The mitogenic signaling pathway for fibroblast growthfactor-2 involves the tyrosine phosphorylation of cyclin D2 in MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Lett 2000; 478:209–15.*
11. **VERCOUTTER-EDOUART AS, CZESZAK X, CREPIN M, LEMOINE J, BOILLY B, LE BOURHIS X, et AL.** Proteomic detection of changes in protein synthesis induced by fibroblast growth factor-2 in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp Cell Res 2001; 262:59–68.*
12. **ÉDITORIAL.** Protéomique du cancer du sein : des potentialités aux difficultés. *Pathologie Biologie 54 (2006) 194–198.*
13. **BRUNEEL A, MAILLOUX A, VAUBOURDOLLE M, BAUDIN B.** Étude par électrophorèse bidimensionnelle du protéome des cellules endothéliales humaines. In: Garnier JP, Le Moël G, Nivet-AntoineV, Beaudeux JL, editors. *Act. Pharm. Biol. Clin. Paris: Lavoisier; 2000. p. 133–7 11ème série.*
14. **O'FARRELL PH.** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J BiolChem 1975; 250:4007-21.*

15. <http://www.huvec.com>. Consulté le 25 / 11 / 2016.
16. PERNET P, BRUNEEL A, BAUDIN B, VAUBOURDOLLE M, PH PROTEOMICDB: A module for two-dimensional gel electrophoresis database creation on personal Web sites. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2006; **4**:124-36.
17. WITTIG I, BRAUN HP, SCHÄGGER H. Blue native PAGE. *Nat Protoc* 2006; **1**:418-28.
18. B. BAUDIN, A. BRUNEEL. L'analyse protéomique : intérêts et perspectives en biologie clinique. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* **19** (2004) 313–322.
19. PAPPIN DJ. Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2003; **211**:211–9.
20. SHEVCHENKO A, CHERNUSHEVICH I, WILM M, MANN M. De novo peptide sequencing by nanoelectrospray tandem mass spectrometry using triple quadrupole and quadrupole/time-of-flight instruments. *Methods Mol Biol* 2000; **146**:1–16.
21. BAXEVANIS AD. The molecular biology database collection: an online compilation of relevant database resources. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**:1–7.
22. GIDDINGS JC. Concepts and comparisons in multidimensional separation. *J High Res Chromatogr* 1987; **10**:319–23.
23. DARE DO, DAVIES HA, TURTON JA, LOMAS L, WILLIAMS TC, YORK MJ. Application of surface-enhanced laser desorption/ionization technology to the detection and identification of urinary parvalbumin-alpha: a biomarker of compound-induced skeletal muscle toxicity in the rat. *Electrophoresis* 2002; **23**:3241–51.
24. TANGW, HARRATA AK, LEE CS. Two-dimensional analysis of recombinant E. Coli proteins using capillary isoelectric focusing electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 1997; **69**:3177–82.
25. HAN DK, ENG J, ZHOU H, AEBERSOLD R. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 2001; **19**:946–51.
26. BRUN V, DUPUIS A, ADRAIT A, MARCELLIN M, THOMAS D, COURT M, et AL. Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2007; **6**:2139-49.
27. ROSS PL, HUANG YL, MARCHESE JN, et AL. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004; **3**:1154-69.
28. MIYAGI M, RAO KC. Proteolytic 18O-labeling strategies for quantitative proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2007; **26**:121-36.

- 29. ONG SE, MANN M.** Stable isotope labeling by amino acids in cell culture for quantitative proteomics. *Methods Mol Biol* 2007; **359**:37-52.
- 30. SEIBERT V, WIESNER A, BUSCHMANN T, et AL.** Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS) and Protein Chips technology in proteomics research. *Pathol Res Pract* 2004; **200**:83-94.
- 31. STOEVESANDT O, TAUSSIG MJ, HE M.** Protein microarrays: hightthroughput tools for proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2009; **6**:145-57.
- 32. CANDICE TROCME, ATHAN BAILLET, PHILIPPE GAUDIN.** La protéomique : comment cela fonctionne-t-il. *Revue du Rhumatisme* 78 (2011) S173-S177.
- 33. CARMEN PALII, LAURA MITROFAN, JEAN MONTREUIL, VLAD ARTENIE.** L'approche proteomique et ses applications. *Anale Ţcientifice, Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Secția Génétique Biologie Moléculaire ; TOM VIII*, 2007.
- 34. ROXO-ROSA M, DAVEZAC N, BENSALEM N, MAJUMDER M, HEDA GD, SIMAS A, PENQUE D, AMARAL MD, LUKACS GL, EDELMAN A:** Proteomics techniques for cystic brosis research. *J Cyst Fibros* 2004, *3 Suppl 2*:85-89.
- 35. DAVEZAC N, TONDELIER D, LIPECKA J, FANEN P, DEMAUGRE F, DEBSKI J, DADLEZ M, SCHRATTENHOLZ A, CAHILL MA, EDELMAN A:** Global proteomic approach unmasks involvement of keratins 8 and 18 in the delivery of cystic - brosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/deltaF508-CFTR to the plasma membrane. *Proteomics* 2004, *4(12)*:3833-3844.
- 36. ALEKSANDER EDELMAN.** La protéomique au service de la mucoviscidose: l'identification d'une nouvelle cible thérapeutique pour la mutation ΔF508 CFTR. *Inserm U845, Université Paris Descartes, Paris, France* (aleksander.edelman@inserm.fr). Consulté le 12 / 10 / 2016.
- 37. J. INGRAND.** La spectrométrie de masse et ses principales applications en biologie médicale. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* (2012) **27**, 47-53.
- 38. LI XZ, LIVERMORE DM, NIKAIDO H.** Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* : Resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**:1732-41.
- 39. JEAN-MARIE PAGESA, LAURA MONLEZUNB, ISABELLE BROUTINB, ANNE DAVIN-REGLIA.** Les mécanismes d'efflux et la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Francophone Des Laboratoires - Septembre-Octobre 2011 - N°435*.
- 40. NAKAJIMA A, SUGIMOTO Y, YONEYAMA H, et AL.** High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiol Immunol* 2002 ; **46**:391-5.

- 41. NADIA HIDRIA.** Identification d'Acinetobacter spp. au laboratoire. *Revue Francophone Des Laboratoires - Avril 2012 - N° 441.*
- 42. CARBONELLE E, NASSIF X.** Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *Med Sci 2011; 27:882-8.*
- 43. AICHER L, MEIER G, NORCROSS AJ, JAKUBOWSKI J, VARELA MC, CORDIER A, STEINER S.** Decrease in kidney calbindin-D 28kDa as a possible mechanism mediating cyclosporine A- and FK-506-induced calciuria and tubular mineralization. *Biochem Pharmacol. 1997; 53: 723-731.*
- 44. WITZMANN FA, RICHARDSON MR.** Two-dimensional gels for toxicological drug discovery applications. *Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2006; 2: 103-111.*
- 45. MERRICK BA, BRUNO ME.** Genomic and proteomic profiling for biomarkers and signature profiles of toxicity. *Curr Opin Mol Ther. 2004; 6: 600-607.*
- 46. K. VIDO; D. SPECTOR; G. LAGNIEL; S. LOPEZ; M.B. TOLEDANO; J. LABARRE.** A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry. March. 16, 2001; 276 (11): 8469-8474.*
- 47. J. LACOMBE, J. SOLASSOL, M. COELHO, M. OZSAHINF, D. AZRIA.** Intérêt des marqueurs sanguins dans la prédition de la toxicité radio-induite. *Cancer / Radiothérapie 15 (2011) 390–393.*
- 48. MENARD C, JOHANN D, LOWENTHAL M, MUANZA T, SPROULL M, ROSS S, et AL.** Discovering clinical biomarkers of ionizing radiation exposure with serum proteomic analysis. *Cancer Res 2006; 66:1844–50.*
- 49. MACKAY IR.** Autoimmune diseases of the liver, autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis: unfinished business. *Hepatol Res 2007; 37(suppl. 3):S357-64.*
- 50. DUCLOS-VALLEE JC, BALLOT E, HUGUET S, JOHANET CURRENT TREND.** Autoimmune hepatitis. *Gastroenterol Clin Biol 2005; 29:1236-43.*
- 51. TODA G, IKEDA Y, KASHIWAGI M, IWAMORI M, OKA H.** Hepatocyte plasma membrane glycosphingolipid reactive with sera from patients with autoimmune chronic active hepatitis: its identification as sulfatide. *Hepatology 1990; 12:664-70.*
- 52. TAHIRI F, LE NAOUR F, HUGUET S, LAI-KUEN R, SAMUEL D, JOHANET C, et AL.** Identification of plasma membrane auto-antigens in auto-immune hepatitis type 1 using a proteomics tool. *Hepatology 2008;47:937-48.*
- 53. SOSTARIC E, GEORGIOU AS, WONG CH, WATSON PF, HOLT WV, FAZELI.** A Global Profiling of Surface Plasma Membrane Proteome of Oviductal Epithelial Cells. *J Proteome Res 2006; 5:3029-37.*

- 54. BALLOT E, BRUNEEL A, LABAS V, JOHANET C.** Identification of rat targets of anti-soluble liver antigen autoantibodies by serologic proteome analysis. *Clin Chem* 2003; **49**:634-43.
- 55. E. BALLOT, F. LE NAOURD, S. HUGUET, F. TAHIRI, D. SAMUEL, C. JOHANET, J.-C. DUCLOS-VALLEE.** Proteomics and autoimmune hepatitis: Techniques and results. *Immuno-analyse et biologie spécialisée (2008)* **23**, 289-310.
- 56. HUGUET S, VINH J, JOHANET C, SAMUEL D, GIGOU M, ZAMFIR O, et AL.** Identification by proteomic tool of atypical antiliver/ kidney microsome autoantibodies targets in de novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 2007; **1109**:345-57.
- 57. N. LION, M. PRUDENT , D. CRETTEAZ , J.-D. TISSOT.** Protéomique et médecine transfusionnelle. *Transfusion Clinique et Biologique* **18** (2011) 79-96.
- 58. LOW TY, SEOW TK, CHUNG MC.** Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* 2002; **2**:1229-39.
- 59. KAKHNIASHVILI DG, BULLA JR LA, GOODMAN SR.** The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2004; **3**:501-9.
- 60. GOODMAN SR, KURDIA A, AMMANN L, KAKHNIASHVILI D, DAESCU O.** The human red blood cell proteome and interactome. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; **232**:1391–408.
- 61. D'ALESSANDRO A, RIGHETTI PG, ZOLLA L.** The red blood cell proteome and interactome: an update. *J Proteome Res* 2010; **9**:144-63.
- 62. GHATPANDE SS, CHOUDHARY PK, QUINN CT, GOODMAN SR.** Pharmacoproteomic study of hydroxyurea-induced modifications in the sickle red blood cell membrane proteome. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; **233**:1510-7.
- 63. GHATPANDE SS, CHOUDHARY PK, QUINN CT, GOODMAN SR.** In vivo pharmaco-proteomic analysis of hydroxyurea induced changes in the sickle red blood cell membrane proteome. *J Proteomics* 2010; **73**: 619-26.
- 64. D'AMICI GM, RINALDUCCI S, ZOLLA L.** Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. *J Proteome Res* 2007; **6**:3242-55.
- 65. MAJEK P, REICHELTOVA Z, STIKAROVA J, SUTTNAR J, SOBOTKOVA A, DYR JE.** Proteome changes in platelets activated by arachidonic acid, collagen, and thrombin. *Proteome Sci* 2010; **8**:56.

- 66. TUCKER KL, KAISER WJ, BERGERON AL, HU H, DONG JF, TAN TH, et AL.** Proteomic analysis of resting and thrombin-stimulated platelets reveals the translocation and functional relevance of HIP-55 in platelets. *Proteomics* 2009; **9**:4340-54.
- 67. THIELE T, STEIL L, GEBHARD S, SCHARF C, HAMMER E, BRIGULLA M, et AL.** Profiling of alterations in platelet proteins during storage of platelet concentrates. *Transfusion* 2007; **47**:1221-33.
- 68. THON JN, SCHUBERT P, DEVINE DV.** Platelet storage lesion: a new understanding from a proteomic perspective. *Transfus Med Rev* 2008; **22**: 268-79.
- 69. KULKARNI S, KANNAN M, ATREYA CD.** Omic approaches to quality biomarkers for stored platelets: are we there yet? *Transfus Med Rev* 2010; **24**:211-7.
- 70. DEAN WL, LEE MJ, CUMMINS TD, SCHULTZ DJ, POWELLDW.** Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb Haemost* 2009; **102**:711-8.
- 71. GLENISTER KM, PAYNE KA, SPARROWRL.** Proteomic analysis of supernatant from pooled buffy-coat platelet concentrates throughout 7-day storage. *Transfusion* 2008; **48**:99-107.
- 72. CLIFTON JG, HUANG F, KOVAC S, YANG X, HIXSON DC, JOSIC D.** Proteomic characterization of plasma-derived clotting factor VIII-von Willebrand factor concentrates. *Electrophoresis* 2009; **30**:3636-46.
- 73. CLIFTON J, HUANG F, GASO-SOKAC D, BRILLIANT K, HIXSON D, JOSIC D.** Use of proteomics for validation of the isolation process of clotting factor IX from human plasma. *J Proteomics* 2010; **73**:678-88.
- 74. BASILICO F, NARDINI I, MORI F, BRAMBILLA E, BENAZZI L, DE PALMA A, et AL.** Characterization of factor VIII pharmaceutical preparations by means of MudPIT proteomic approach. *J PharmBiomed Anal* 2010; **53**:50-7.
- 75. AUBRY M.A. , AUSSAGUES Y. , BERGE A. , BRUNEL L. , CABEAU J. , CHEVALIER S. , CHICANNE G. , DUBREUIL B. , FRIRY C. , MORELLO E. , SAMSON A. , TRINCHERO N. , ZELAZNY E.** La protéomique : ses techniques d'études analytiques et quantitatives et ses applications. *DESS Expression Génique et Protéines Recombinantes, Université Paul Sabatier, Toulouse, France. Consulté le 22/09/2016.*
- 76. C. MATHELIN, C. TOMASETTO, A. CROMER, M.-C.RIO.** Proteomics and breast cancer. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 34 (2006) 1161-1169.
- 77. SOLETORMOS G, NIELSEN D, SCHIOLER V, MOURIDSEN H, DOMBERNOWSKY P.** Monitoring different stages of breast cancer using tumour markers CA 15-3, CEA and TPA. *Eur J Cancer* 2004; **40**(4):481-6.

- 78. LUMACHI F, BASSO SM, BRANDES AA, PAGANO D, ERMANI M.** Relationship between tumor markers CEA and CA 15-3, TNM staging, estrogen receptor rate and MIB-1 index in patients with pT1-2 breast cancer. *Anticancer Res* 2004; **24(5B)**:3221-4.
- 79. VERCOUTTER-EDOUART AS, LEMOINE J, LE BOURHIS X, LOUIS H, BOILLY B, NURCOMBE V, et AL.** Proteomic analysis reveals that 14-3-3 sigma is down-regulated in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; **61**:76-80.
- 80. HERMEKING H.** The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 931-43.
- 81. DOLLÉ L, EL-YAZIDI I, ADRIAENSENS E, NURCOMBE V, HONDERMARCK H.** Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 2003; **22**:5592-601.
- 82. DRYNDA S, RINGEL B, KEKOW M, et AL.** Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract* 2004; **200**:165-71.
- 83. ZHENG X, WU SL, HINCAPIE M, et AL.** Study of the human plasma proteome of rheumatoid arthritis. *J Chromatogr A* 2009; **1216**:3538-45.
- 84. SENY D, FILLET M, MEUWIS MA, et AL.** Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum* 2005; **52**:3801-12.
- 85. LIU W, LI X, DING F, et AL.** Using SELDI-TOF MS to identify serum biomarkers of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2008; **37**:94-102.
- 86. ATHAN BAILLET, CANDICE TROCME, PHILIPPE GAUDIN.** Analyse protéomique en rhumatologie : implication dans la prise en charge des rhumatismes inflammatoires. *Revue du Rhumatisme* 78 (2011) S187-S190.
- 87. BAILLET A, TROCME C, BERTHIER S, et AL.** Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2010; **49**:671-82.
- 88. HU S, WANG J, MEIJER J, et AL.** Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007; **56**:3588-600.
- 89. RYU OH, ATKINSON JC, HOEHN GT, et AL.** Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; **45**:1077-86.
- 90. GABELLE A, et AL.** Les marqueurs biologiques protéiques du liquide céphalorachidien : caractéristiques et implications cliniques dans les démences. *Revue neurologique* (2008), doi:10.1016/j.neurol.2008.05.004.

- 91.** VANDERSTICHELE H, DE VREESE K, BLENNOW K, ANDREASEN N, SINDIC C, IVANOIU A, et AL. Analytical performance and clinical utility of the InnotestPhospho-Tau181P assay for discrimination between Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Clin Chem Lab Med* 2006; **44**:1472–80.
- 92.** SIPE JD, BENSON MD, BUXBAUM JN, IKEDA S, MERLINI G, SARAIVA MJM, et AL. Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 2012; **19**:167-70.
- 93.** M. COLOMBATA, S. HOLIFANJANIAINA, S. ONIFARASOANIAINA, S. VALLEIXB, H. MAISONNEUVEC, J.E. KAHND. La protéomique, une nouvelle technique pour un typage optimal des amyloses. *La plateforme protéomique de l'université Paris Descartes (3P5). La Revue de médecine interne* xxx (2014) xxx–xxx.
- 94.** COLOMBAT M, HOLIFANJANIAINA S, GUILLONNEAU F, MAL H, HIRSCHI S, REYNAUD-GAUBERT M, et AL. Mass spectrometry-based proteomic analysis: a gooddiagnostic tool for cystic lung light chain deposition disease. *Am J RespirCritCare Med* 2013; **188**:404-5.
- 95.** VRANA JA, GAMEZ JD, MADDEN BJ, THEIS JD, BERGEN 3RD HR, DOGAN A. Classification of amyloidosis by laser microdissection and mass spectrometry-basedproteomic analysis in clinical biopsy specimens. *Blood* 2009; **114**:4957-9.
- 96.** I. EBERINI, I. MILLER, V. ZANCAN, C. BOLEGO, L. PUGLISI, M. GEMEINER, E. GIANAZZA. Proteins of rat serum IV.Time-course of acute-phase protein expression and its modulation by indométhacine. *Electrophoresis* 1999, **20**, 846-853.
- 97.** M. LÜCK, W. SCHRÖDER, B.-R. PAULKE, T. BLUNK, R.H. MÜLLER. Complement activation by model drug carriers for intraveinous application : determination by two-dimensional electrophoresis. *Biomaterials* 1999, **20**, 2063-2068.
- 98.** WANG T, TAMAE D, LEBON T, SHIVELY JE, YEN Y, LI JJ. The role of peroxiredoxin II in radiation-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 2005; **65**:10338-46.
- 99.** SMITH L, QUTOB O, WATSON MB, BEAVIS AW, POTTS D, WELHAM KJ, et AL. Proteomic identification of putative biomarkers of radiotherapy resistance: a possible role for the 26S proteasome? *Neoplasia* 2009; **11**:1194-207.
- 100.** FENG XP, YI H, LI MY, LI XH, YI B, ZHANG PF, et AL. Identification of biomarkers for predicting nasopharyngeal carcinoma response to radiotherapy by proteomics. *Cancer Res* 2010; **70**:3450-62.
- 101.** RAMSAMOOJ P, KASID U, DRITSCHILO A. Differential expression of proteins in radioresistant and radiosensitive human squamous carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1992; **84**:622-8.

- 102.** LIN TY, CHANG JT, WANG HM, CHAN SH, CHIU CC, LIN CY, et AL. Proteomics of the radioresistant phenotype in head-and-neck cancer: Gp96 as a novel prediction marker and sensitizing target for radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; **78**:246-56.
- 103.** WU P, ZHANG H, QI L, TANG Q, TANG Y, XIE Z, et AL. Identification of ERp29 as a biomarker for predicting nasopharyngeal carcinoma response to radiotherapy. *Oncol Rep* 2012; **27**:987-94.
- 104.** SLOVES PJ, DELHAYE S, MOUVEAUX T, WERKMEISTER E, SLOMIANNY C, HOVASSE A, DILEZITOKO ALAYI T, et AL. Toxoplasma Sortilin-like Receptor Regulates Protein Transport and Is Essential for Apical Secretory Organelle Biogenesis and Host Infection. *Cell Host Microbe* (2012) **11**,515-527.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ce qui m'ont instruit dans les princeps de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la sante publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;

En aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

PERMIS D'IMPRIMER

Vu :

Le président de jury

Vu :

Pour le doyen

Vu et *Permis d'imprimer*

Pour le recteur, président de l'assemblée de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar

Et par délégation