

INTRODUCTION A LA PROTEOMIQUE DIFFERENTIELLE ET CLINIQUE

PLAN:

- I-** Définitions
- II-** Les stratégies de protéomique différentielle
- III-** La protéomique clinique
- IV-** Applications cliniques des méthodes de Protéomique

I- Définitions:

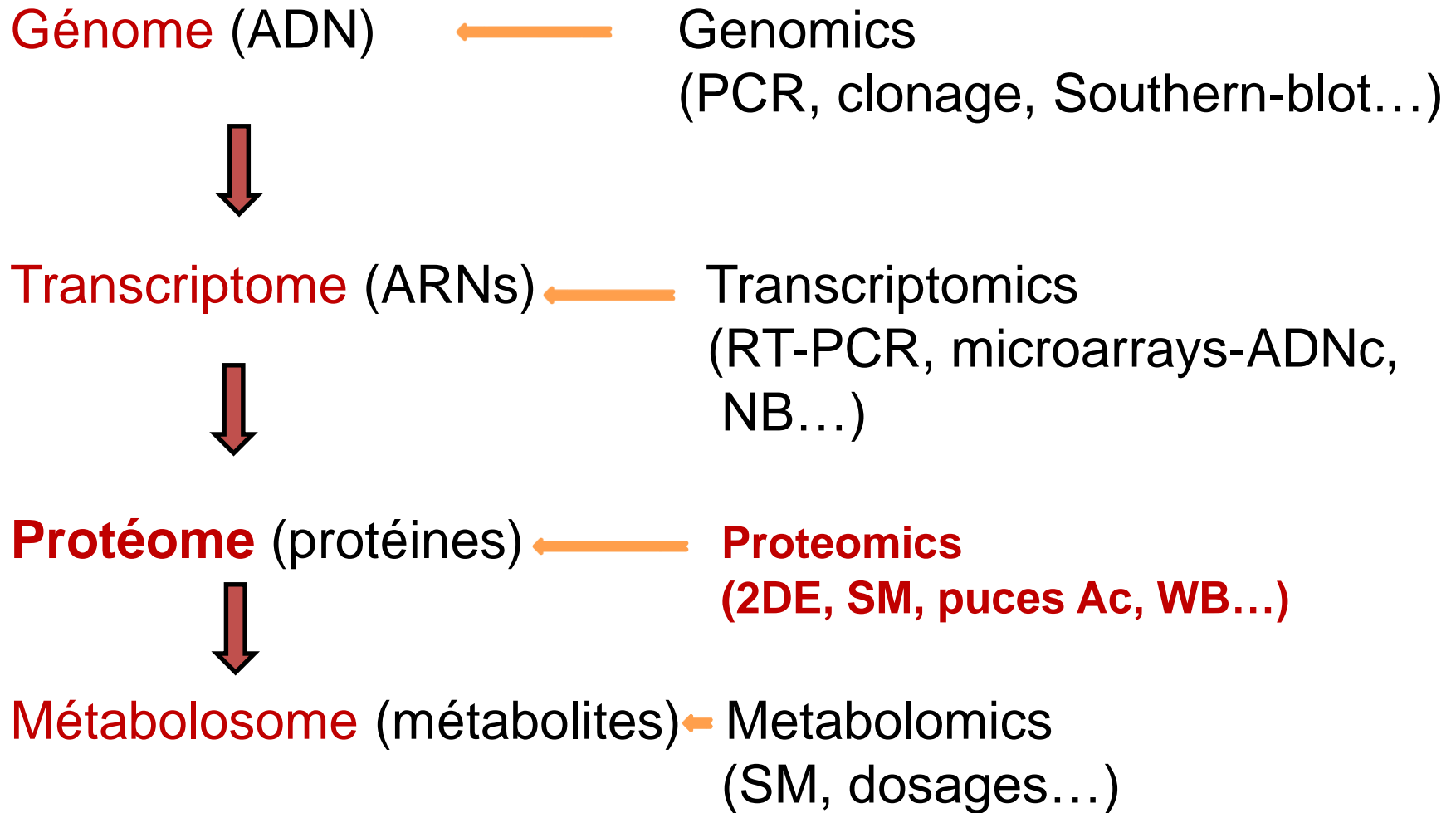
Protéome: ensemble des protéines exprimées par un génome dans une cellule ou un tissu.

Protéomique clinique: approche « post-génomique » visant à utiliser l'étude du protéome, pour donner une information diagnostique, pronostique ou de suivi thérapeutique des pathologies humaines (discipline en plein essor).

Signature moléculaire de la pathologie: Profil d'expression protéique permettant de détecter les pathologies et ainsi la prise en charge thérapeutique des patients.

Biomarqueur: terme défini suite à 1 atelier du NIH (National Institute of Health) en 1998. Caractéristique mesurée objectivement et évaluée comme indicateur de processus physiologique ou pathologique, ou de l'action de médicaments.

L'ERE POST- GENOMIQUE: LA PROTEOMIQUE



II- Stratégies de protéomique différentielle

Protéomique différentielle : recherche des différences d'expression de protéines isolées à partir de fluides biologiques, de cellules ou de tissu d'un sujet malade par rapport à un sujet sain.

Stratégies d'étude en gel ou off gel.

A- Stratégies en gel:

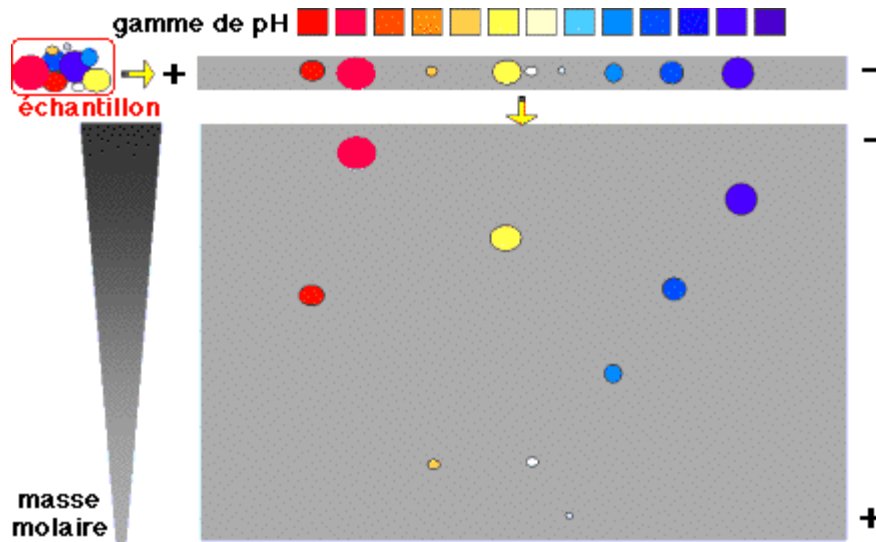
- a- Electrophorèse bidimensionnelle /SM
- b- 2D-DIGE

B- Stratégies off gel:

- a- SELDI-TOF
- b- iTRAQ
- c- CLINPROT

A- Stratégies en gel

a- Electrophorèse bidimensionnelle (2-DE)



1^{ère} dimension: IEF ou Isoélectrofocalisation ou séparation en fonction du point isoélectrique

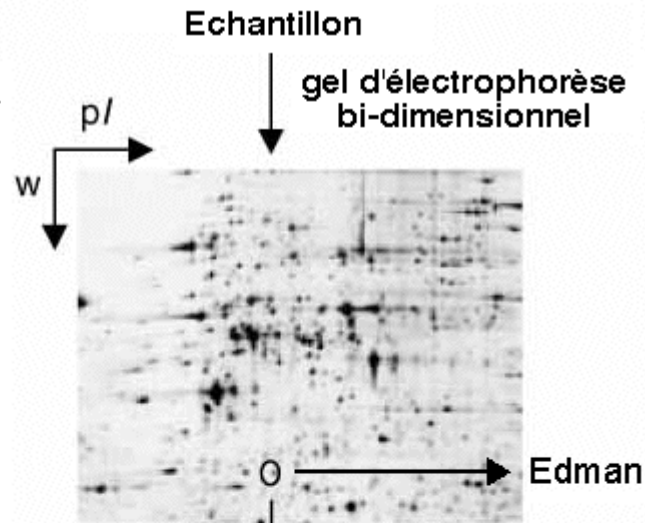
2^{ème} dimension: SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis: séparation en fonction du poids moléculaire.

Source: [Piercenet](#)

Deux électrophorèses perpendiculaires l'une par rapport à l'autre. Technique particulièrement résolutive car les paramètres de la séparation sont indépendants. Plusieurs centaines de chaînes polypeptidiques sont séparées sous forme de spots sur un gel.

QUANTIFICATION

IDENTIFICATION



Récupération d'un spot

Digestion par la trypsine

Mélange de peptides

MALDI-TOF/MS

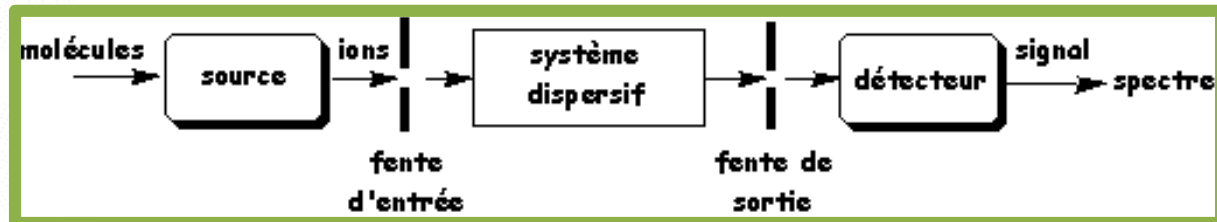
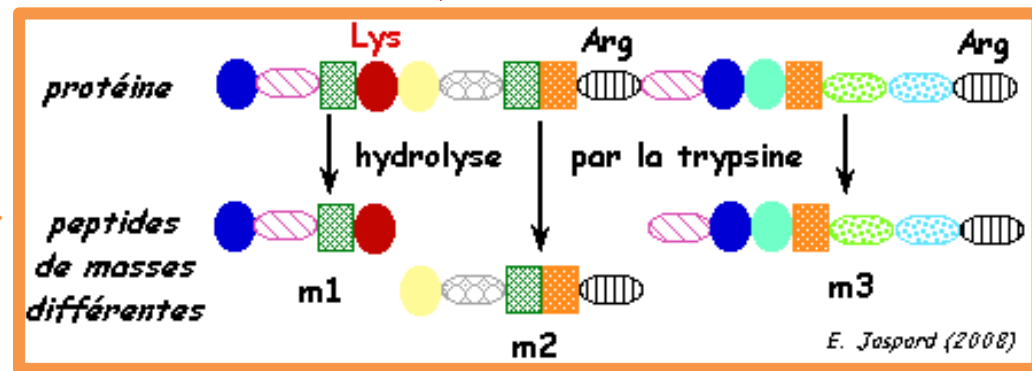
ESI-MS/MS

Carte peptidique massique

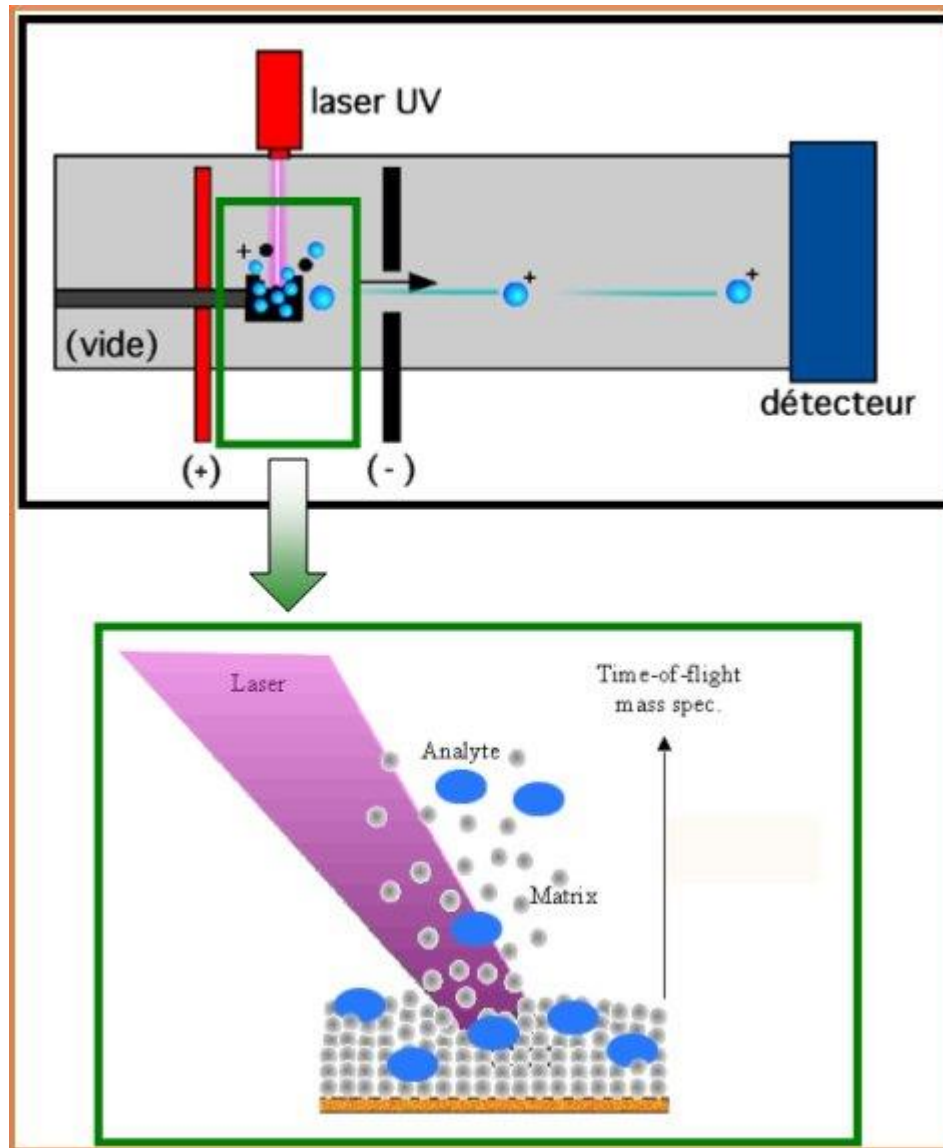
Séquences peptidiques

Séquence de la protéine

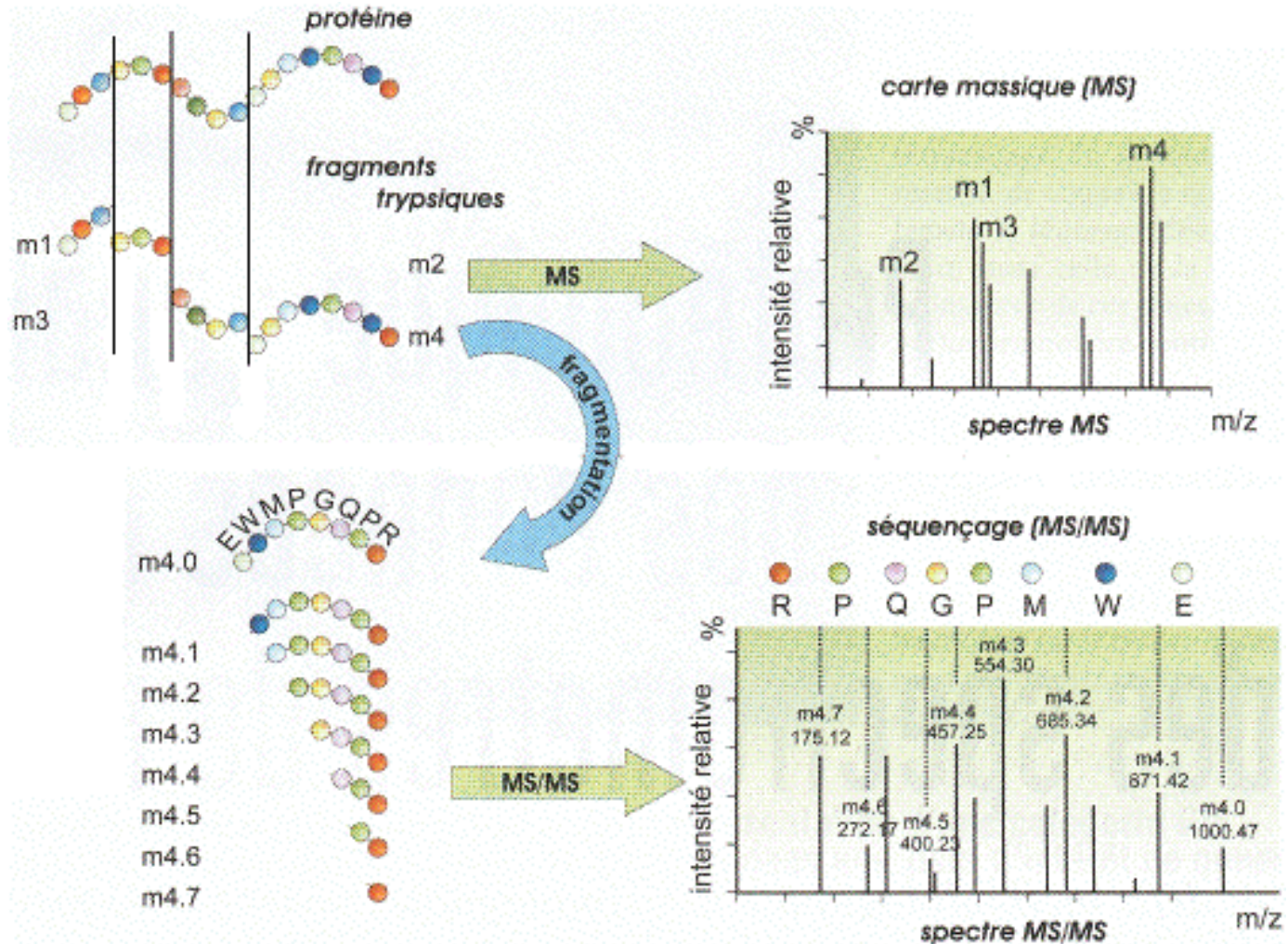
Après coloration et analyse différentielle, le spot protéique est découpé du gel puis digéré à la trypsine dans le gel même



Principe du MALDI-TOF



Principe de la MS et du séquençage MS-MS



Source : Vandenbrouck *et al.* (2005)

b- Technique de la 2D-DIGE 2 Dimensional- Differential In GEL Electrophoresis

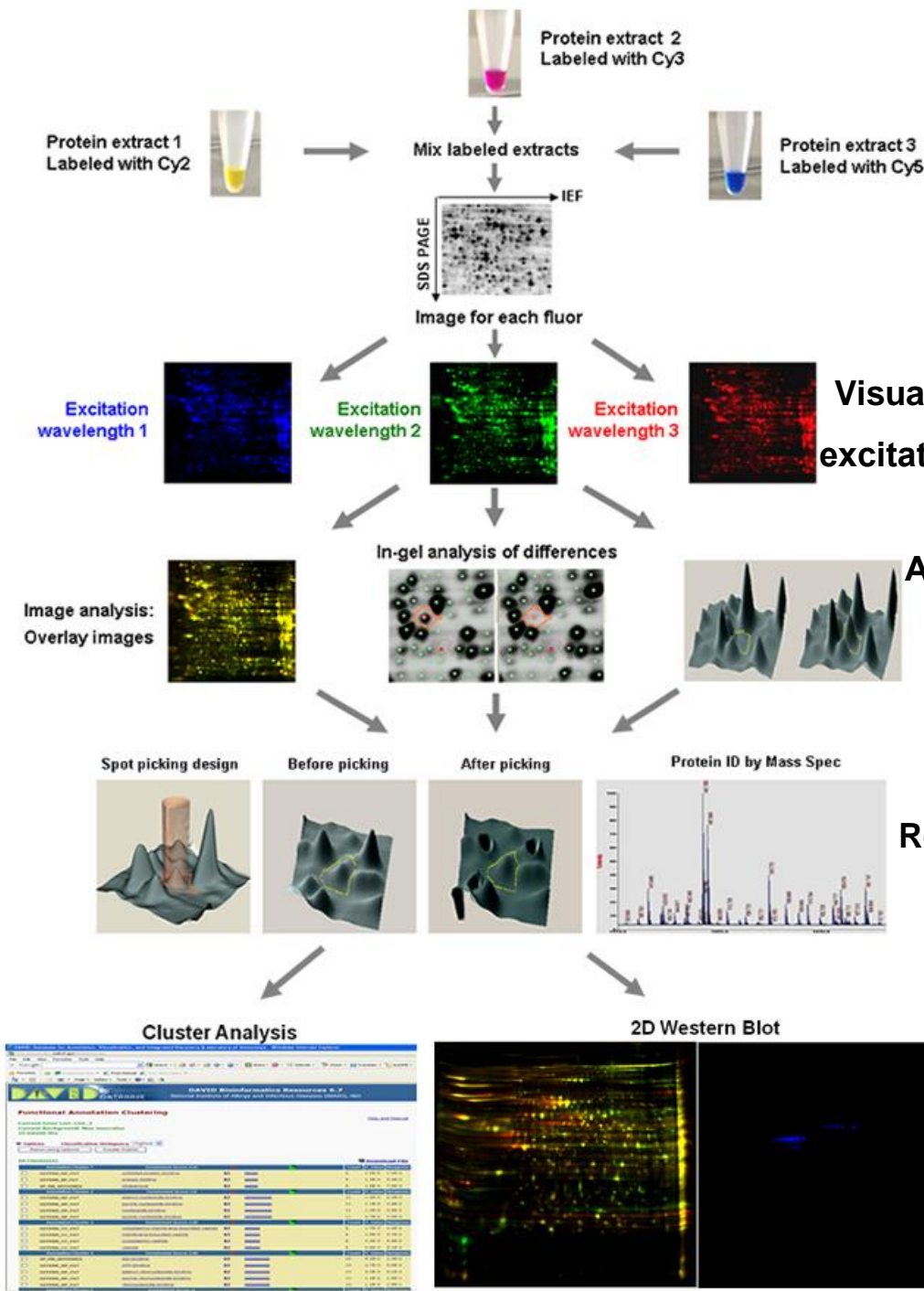
Migration des 3 échantillons marqués aux différents fluorochromes dans le même gel

Visualisation des protéines de chaque échantillon par excitation à la longueur d'onde de chaque fluorochrome

Analyse informatique différentielle de l'expression des protéines par superposition des images obtenues aux différentes longueurs d'onde

Représentation graphique des spots avant et après Découpage puis identification par MS

Etude statistique et confirmation possible du résultat par WB



Caractéristiques:

Migration de 3 échantillons

Utilisation de fluorochromes

Utilisation d'un standard interne

Avantages:

Reproductibilité

Résolution, sensibilité

Analyse quantitative

Pratiquement ...

Cuve de la 1^{ère}
dimension



Matériel
de la 2^{ème}
dimension



Scanner
Typhoon

Chaîne entièrement disponible à partir de janvier 2004

Types d'échantillons à analyser :
comparaison d'états
time course



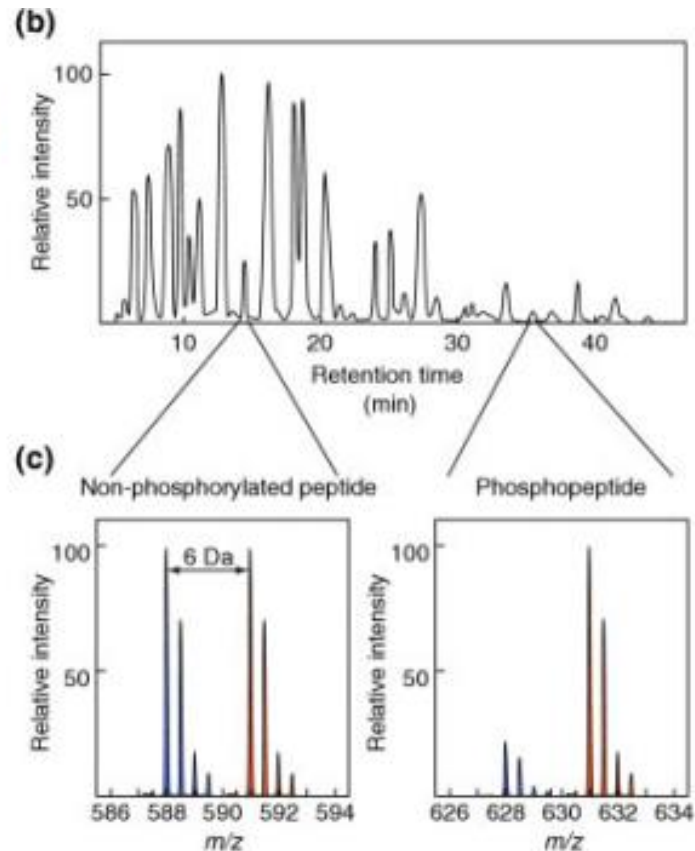
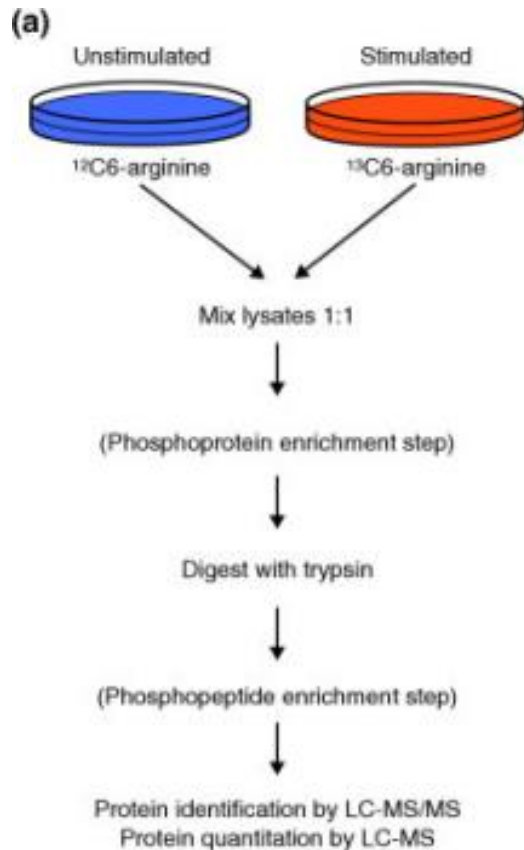
Les limites des méthodes d'étude en gel:

- ✓ Les protéines de point isoélectrique extrême
- ✓ Les protéines de haut poids moléculaire
- ✓ Les protéines hydrophobes (membrane plasmique)
- ✓ la reproductibilité.

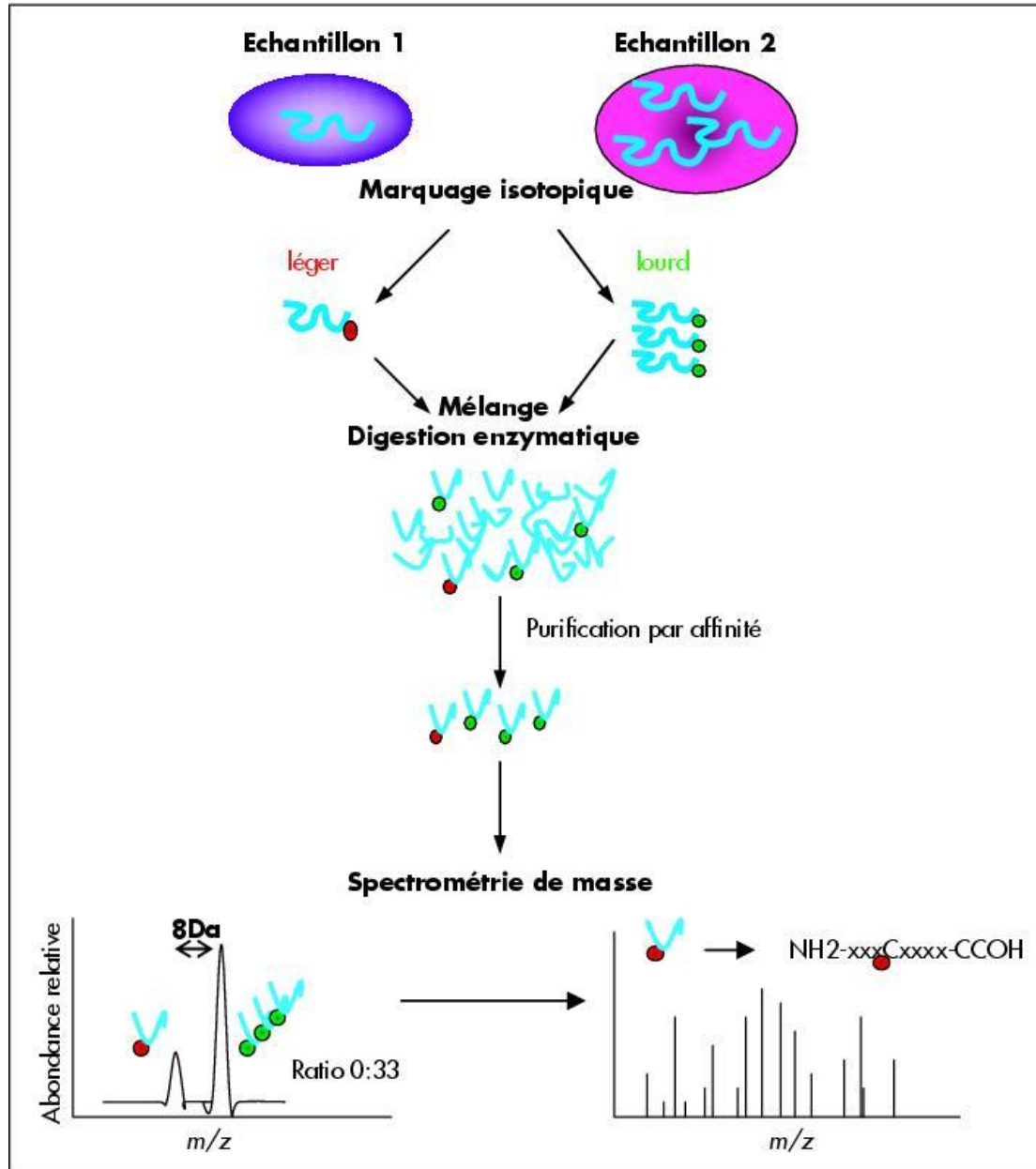
B- Les stratégies off gel

- ✓ MuDPIT (MultiDimensional Protein Identification Technology)
 - 1^{ère} dimension: échange cationique fort,
 - 2^{ème} dimension: phase inverse. Couplage à la LC-MS-MS.
- ✓ SELDI-TOF
- ✓ iTRAQ
- ✓ ClinProt
- ✓ SILAC

SILAC: Stable Isotope Labeling with Amino acids In cell Culture



Stratégie de quantification par marquage isotopique (ICAT)



III- La protéomique clinique

1) Nature biochimique des biomarqueurs

marqueurs nucléiques: associés à des mutations de l'ADN, une aneuploïdie, une perte d'hétérozygotie, un ADN viral, une amplification génique... (vus en cours)

marqueurs protéiques: protéines sur ou sous-exprimées, modifiées (PTM), ou ayant 1 activité modulée chez les malades/sujets Sains.

Marqueurs métaboliques: intermédiaires et produits du métabolisme de la cellule que l'on trouve dans l'organisme.

2) Critères d'utilisation d'un biomarqueur

Spécificité: la performance d'un test diagnostique dépend de sa capacité à classer correctement les individus dans les différents sous-groupes cliniques (sujets sains *versus* sujets malades). Le test idéal devrait être totalement négatif chez les sujets sains (100% de spécificité).

Sensibilité: elle est de 100% lorsque le test est totalement positif pour un type de pathologie donné.

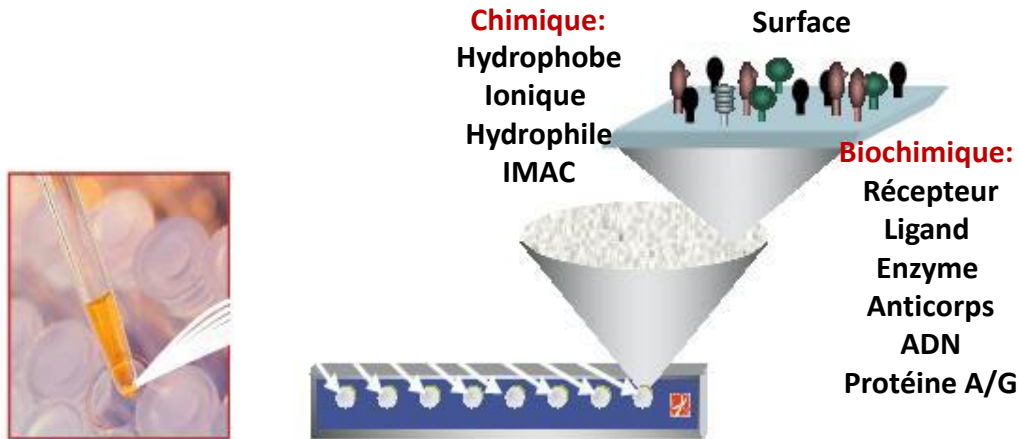
N.B. Peu de biomarqueurs utilisables en clinique car peu remplissent ces 2 critères.

2 bons marqueurs de cancer: PSA (Antigène Prostatique Spécifique) et Thyrocalcitonine.

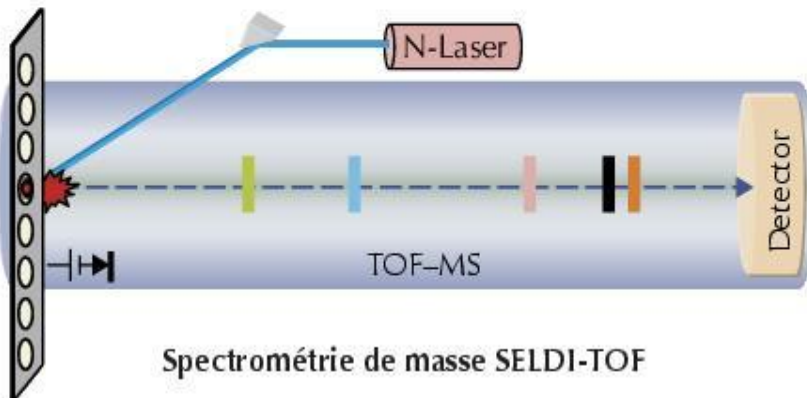
IV- Applications cliniques des méthodes de Protéomique

SELDI: Surface Enhanced Laser Desorption Ionization

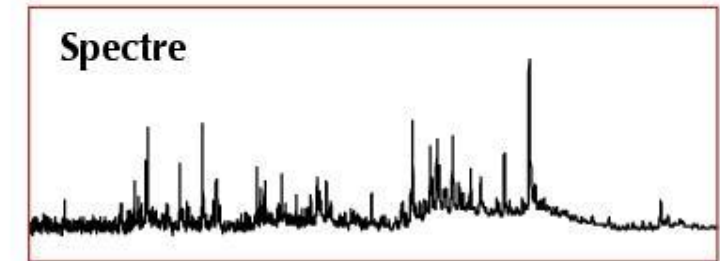
1. Dépôt d'échantillon et lavages sur puce ProteinChip



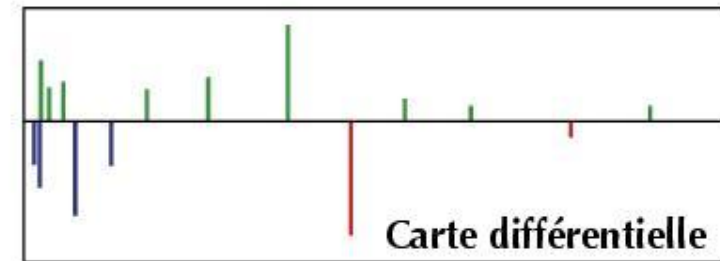
2. Analyse de la puce par le ProteinChip Reader



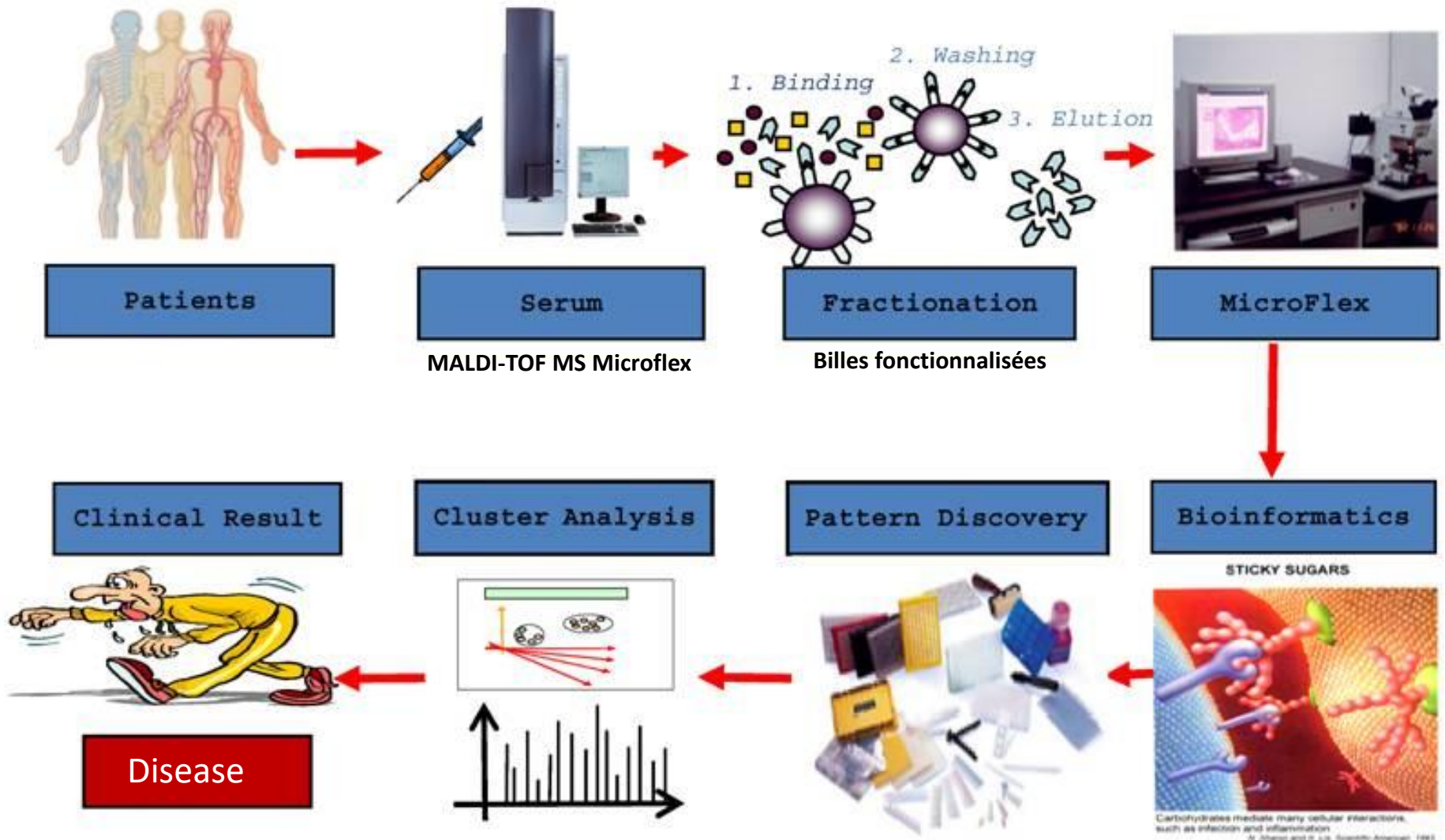
3. Visualisation et analyse des données de profil différentiel en vue de la découverte de biomarqueurs



Gel virtuel



La technique ClinProt



Applications cliniques des méthodes de protéomique

Compréhension moléculaire des processus physiopathologiques

➡ par comparaison des protéomes entre les différentes phases d'une pathologie

Recherche de marqueurs diagnostiques ou pronostiques

Recherche de nouveaux médicaments

➡ par identification de protéines cibles.