

## 6. Approche Protéomique différentielle quantitative

Il s'agit d'étudier l'expression des protéines de tissus ou d'organismes entre deux conditions différentes et de déterminer les variations d'expression protéique de manière qualitative et quantitative.

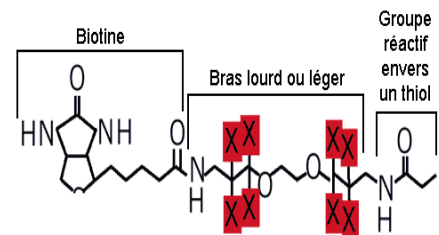
### a. La technique ICAT

La technique de marqueurs d'**affinité contenant un isotope d'identification** ("*Isotope Coded Affinity Tags*" - ICAT) permet de comparer l'abondance relative des protéines entre 2 échantillons (exemple : condition normale vs. condition pathologique).

Le groupement thiol -SH des cystéines des protéines réagit avec l'iodoacétamide des réactifs ICAT.

soit légers : X = hydrogène, réactif d0-ICAT

soit lourds : X = deutérium, réactif d8-ICAT



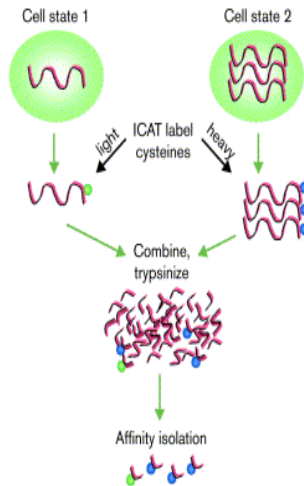
Chaque échantillon est marqué par un seul type de réactif.

Les 2 échantillons sont mélangés et les protéines de ce mélange sont hydrolysées par la trypsine.

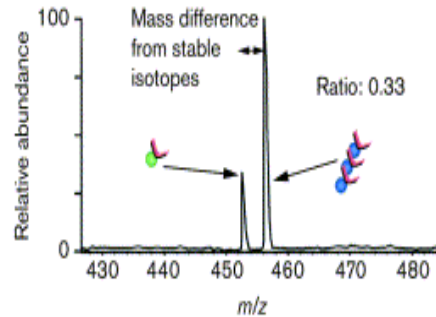
Les peptides sont séparés par chromatographie d'affinité sur avidine par l'intermédiaire du groupement biotine porté par les réactifs.

### a. La technique ICAT

Les peptides sont séparés par chromatographie d'affinité sur avidine par l'intermédiaire du groupement biotine.



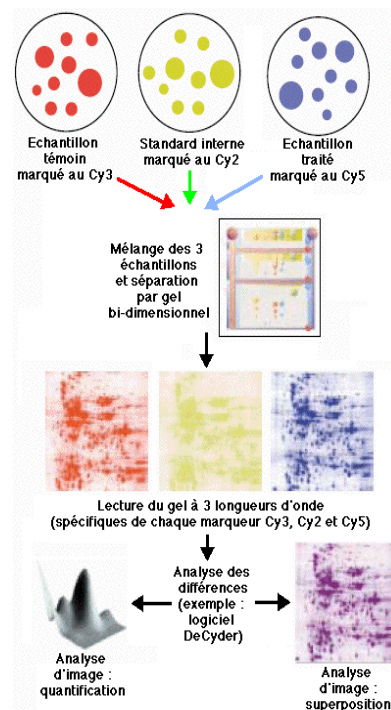
### Quantitate relative protein levels by measuring peak ratios



- Les peptides identiques sont élués ensemble puisqu'ils ne diffèrent que par la présence de l'isotope.
- Les peptides identiques sont analysés ensemble par spectrométrie de masse, ce qui permet de **quantifier leur abondance relative** et d'identifier les protéines.

### b. La technique 2D-DIGE

- Cette technique est basée sur le marquage direct des lysines des protéines de 3 échantillons distincts par des fluorophores **cyanine** (voir figure)
- A la différence de la technique ICAT, la quantification repose sur l'**analyse d'images** et non sur une comparaison des **quantités relatives** de protéines entre les échantillons.



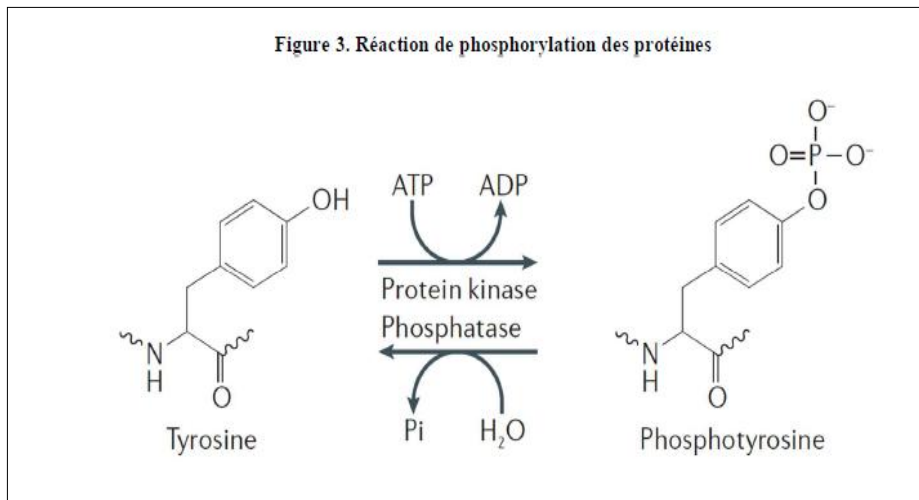
## 7. Protéomique pour la recherche des modifications post-traductionnelles

Les protéines subissent de nombreuses modifications covalentes pendant et après leurs synthèses, celles-ci étant regroupées sous le nom de modifications post-traductionnelles (MPT). Ces MPT ont des rôles dans la régulation de l'activité protéique, l'adressage à différents compartiments, l'ancrage aux membranes, dans certaines cascades de signalisation et dans la reconnaissance par les systèmes de dégradation protéique. La méthode de choix pour la détection de ces modifications est la spectrométrie de masse. En effet, cette méthode permet la détection de façon spécifique, sensible et hautement résolutive de ces structures mais aussi la quantification relative ou absolue de celle-ci.

Ces modifications post-traductionnelles provoquent des changements des propriétés physico-chimiques de la protéine. Une variation du point isoélectrique et de la masse est observée. Ces variations vont avoir des conséquences lors de l'analyse par les techniques d'électrophorèse 2D où la formation de traînée pendant la migration de la protéine peut être observée. De même, lors de l'analyse en spectrométrie de masse, le spectre obtenu pour cette protéine sera aussi modifié. Ces différences de propriétés identifiées et répertoriées peuvent alors être utilisées pour caractériser ces modifications post-traductionnelles.

## La phosphorylation

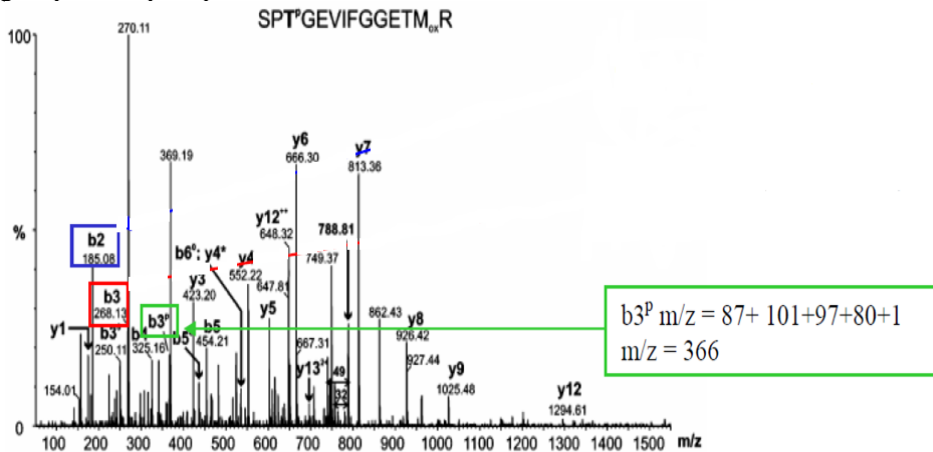
- La phosphorylation des protéines est l'une des modifications post traductionnelles les plus importantes et les plus étudiées.
- Elle joue un rôle essentiel dans la régulation de nombreux processus cellulaires, tels que le cycle cellulaire, la croissance, l'apoptose et les voies de transduction du signal
- Chez les eucaryotes, la phosphorylation cible la chaîne latérale des acides aminés sérine, thréonine et tyrosine.
- C'est une modification réversible médiée par des kinases et des phosphatases, qui phosphorylent et déphosphorylent les résidus cibles, respectivement



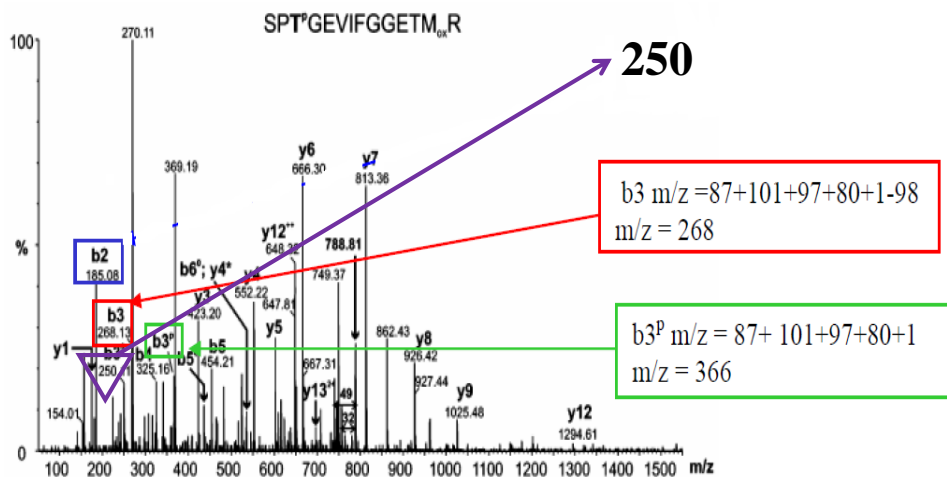
**L'identification des sites de phosphorylation**, qui peuvent se trouver sur une **Sérine**, une **Thréonine** ou une **Tyrosine** au niveau de la séquence primaire d'une protéine permettrait de déterminer leur signification fonctionnelle dans un processus donné, ou en réponse à un signal intra- ou extracellulaire.

La spectrométrie de masse est indispensable pour étudier ces sites de phosphot°. **La méthode consiste à calculer l'écart du rapport m/z entre deux ions correspondant au même peptide sur un spectre MS puisqu'une phosphorylation correspond à une augmentation du rapport m/z de 80 Da.** Cependant la détermination du site exact de phosphorylation, est parfois difficile en MS/MS.

La figure ci dessous présente le spectre ESI-Q-TOF MS/MS d'un peptide issu de la digestion trypsique de p CP43 (PhotoSystème II de la feuille d'épinard) .  
L'ion b3à m/z 366 (encadré en vert) correspond à la somme des masses des résidus des acides aminés Sérine, Proline et Thréonine plus la masse d'un groupement phosphate et celle d'un H<sup>+</sup>.



Sur le même spectre on trouve également l'ion b3 phosphorylé ayant perdu un acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) à m/z 268 (encadré en rouge), et l'ion b3 phosphorylé ayant perdu un acide phosphorique et une molécule d'eau à m/z 250.



D'autre part, l'ion b2 à m/z 185.08 (encadré en bleu) correspond à la somme des résidus sérine, proline et d'un H<sup>+</sup>.

L'ion b3 est phosphorylé mais l'ion b2 n'est pas phosphorylé donc la phosphorylation porte sur la thréonine 3 (101 Da). Alors le peptide correspondant à la protéine CP43 est phosphorylé sur la thrionine 3.

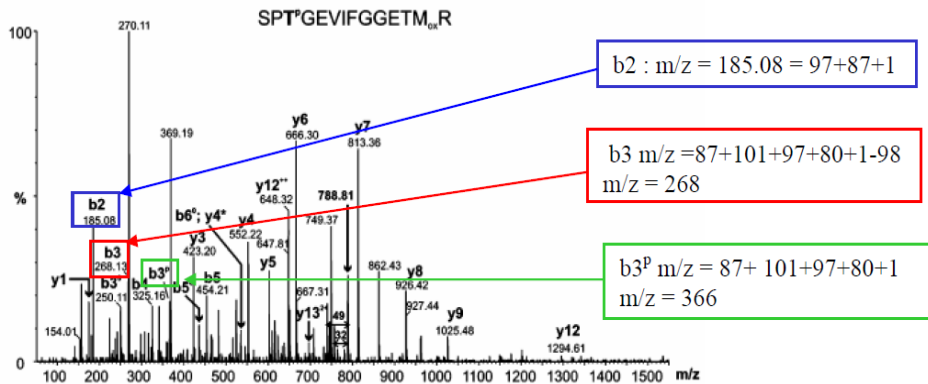


Figure VI-1 : spectre ESI-Q-TOF MS/MS du peptide dont la séquence est présenté sur la figure.

Par contre, dans certains cas en MS/MS, cette méthode ne permet pas de déterminer le site exact de phosphorylation. En effet, la perte d'un acide phosphorique sur un peptide phosphorylé correspond à perte de 18 unités de masse (+80-98). Ceci peut également correspondre à la perte d'une molécule d'eau. Comment savoir alors à quoi correspond cette diminution de 18 du rapport m/z ?

Le spectre MALDI MS/MS du peptide N-terminal de la protéine CP43, illustre bien ce problème.

L'ion **b3** à m/z de 255 (encadré en bleu) correspond à la somme des masses des trois premiers résidus plus un H<sup>+</sup> avec une diminution du m/z de 18.

Cependant, en l'absence d'un pic correspondant au m/z 353 (=273+80), la diminution du rapport m/z de 18 correspond soit à la perte d'un acide phosphorique soit à la perte d'une molécule d'eau.

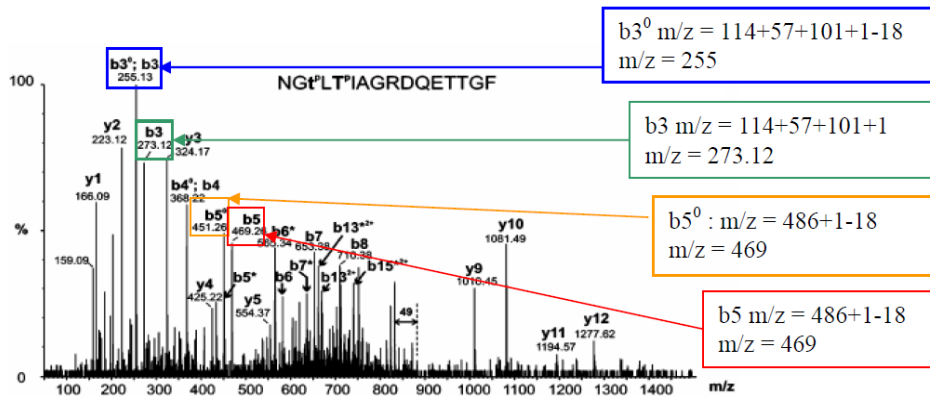
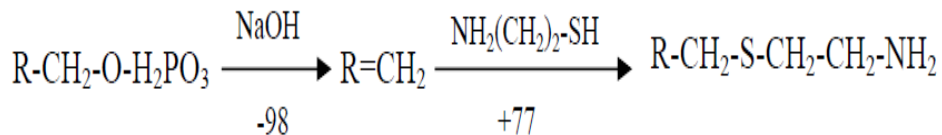


Figure VI-2 : spectre MALDI MS/MS du peptide dont la séquence est présentée sur la figure.

Afin d'explorer ce problème

**une autre méthode : est l'utilisation de la  $\beta$ -élimination** et addition de Michael pour résoudre les problèmes **d'identification des sites de phosphorylation**



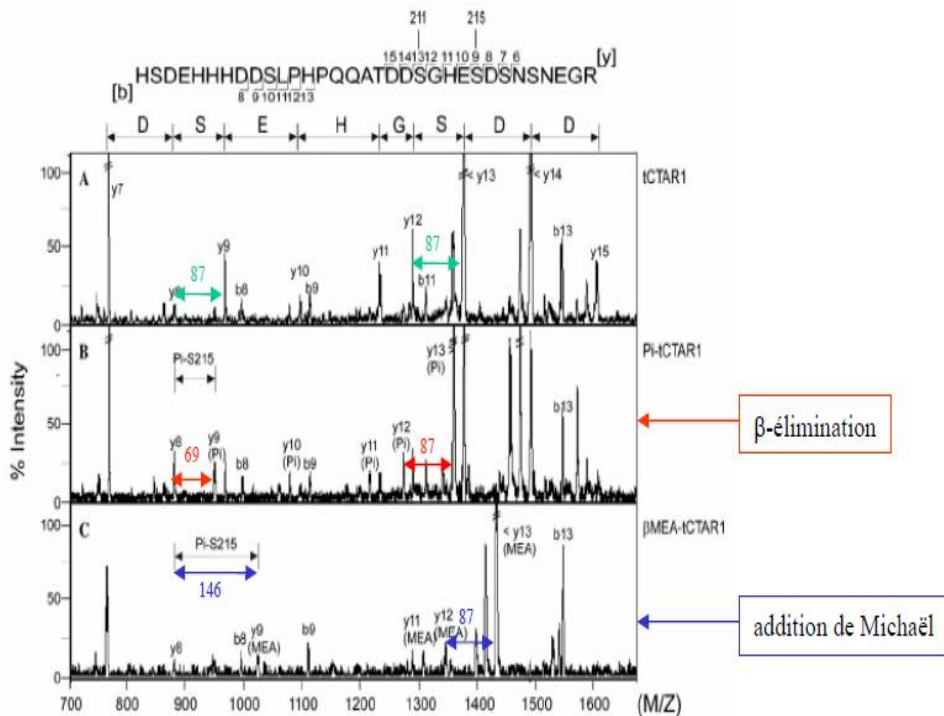
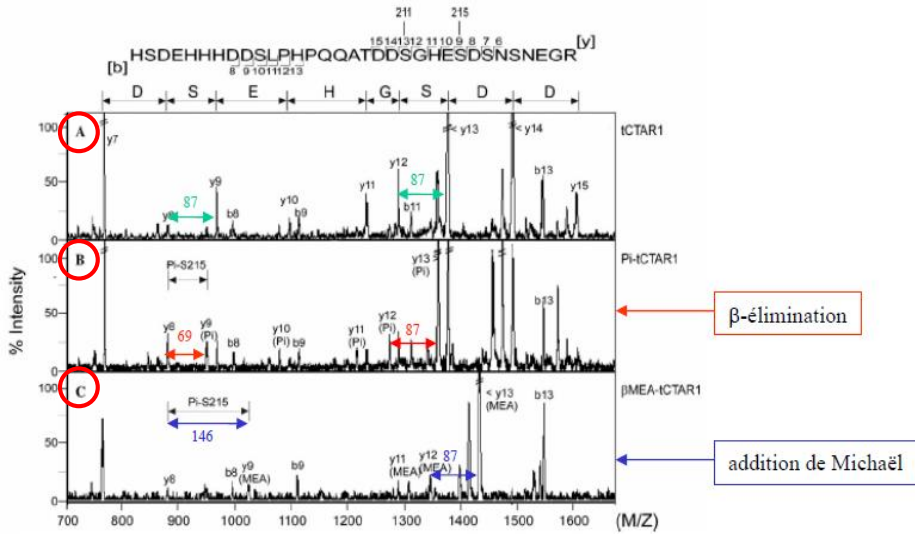
L'intérêt de cette méthode, est appliqué sur un phosphopeptide présentant **deux sites** de phosphorylation possibles.



**le cadre A**, présentant le spectre MS/MS du peptide non phosphorylé, qu'on a une différence de  $m/z$  de 87 correspondant au résidu sérine.

**le cadre B**, les peptides sont soumis à la  $\beta$ -élimination et seuls les ions phosphorylés présentent une différence de masse 69 ( $=87+80-98$ ) car il y a perte d'acide phosphorique.

**le cadre C**, les peptides sont soumis à l'addition de Michaël et seuls les ions qui étaient phosphorylés ont subi la  $\beta$ -élimination et présentent une différence de masse de 146 ( $=69+77$ ).



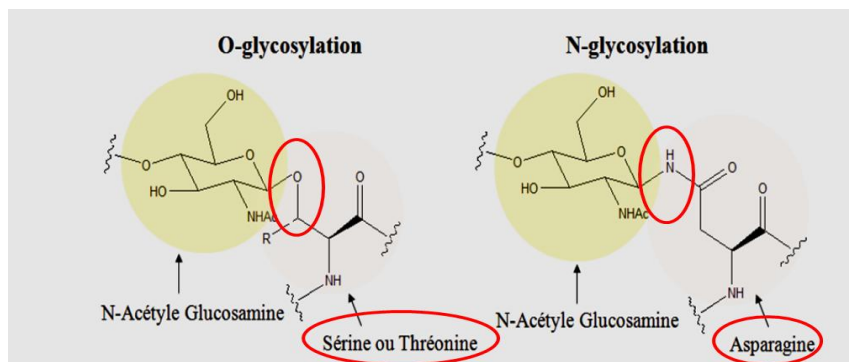
Ainsi cette méthode permet de différencier la perte d'eau de la perte d'un acide phosphorique puisque l'addition de Michaël se produit sur les résidus qui étaient phosphorylés et qui ont subi la  $\beta$ -élimination.

De plus, cette méthode permet de déterminer le site exact de phosphorylation.

Dans l'exemple suivant, la sérine 2 est phosphorylée tandis que la sérine 6 n'est pas phosphorylée.

### La glycosylation

**Une glycosylation** correspond à un ajout d'oses au cours de la biosynthèse de protéines. Cette addition d'oligosaccharides a un rôle primordial dans la maturation des protéines et dans leurs fonctions. On distinguera les N-glycosylations, impliquant des asparagines, des O-glycosylations sur sérines et thréonines

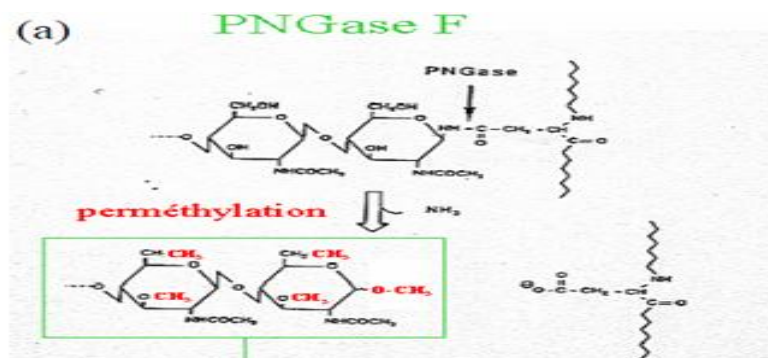


## La N-glycosylation

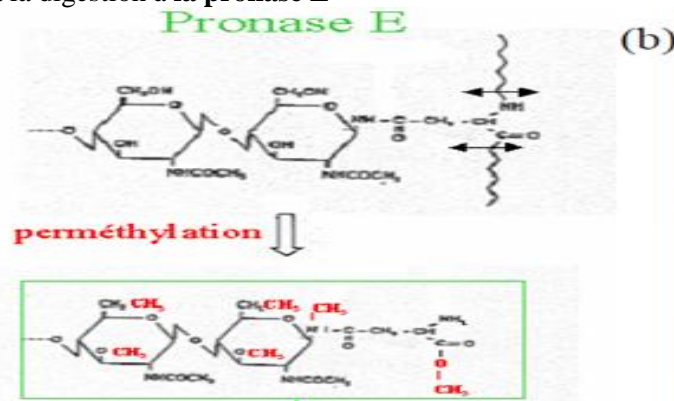
Les N-glycosylations sont des modifications co- et post-traductionnelles. Elles ont lieu pendant la traduction dans le réticulum endoplasmique puis continuent dans l'appareil de Golgi. Ce motif commence généralement par une N-acétylglucosamine et est lié aux protéines par le biais d'une asparagine. Une séquence consensus du type **N-X-S/T** (où X peut-être n'importe quel acide aminé sauf une proline) est admise. Les N-glycosylations possèdent une plus grande variabilité c'est pourquoi leur étude est parfois complexe et nécessite l'utilisation de méthodes d'enrichissements couplée à différentes méthodes de fragmentation

La technique classique d'étude des liaisons N-glycosydiques chez les eucaryotes est de:

➤ Digérer les peptides par la peptide-N-glycosidase F (PNGase F), qui clive la liaison N-glycosidique entre l'asparagine et le N-acétylglucosamine.

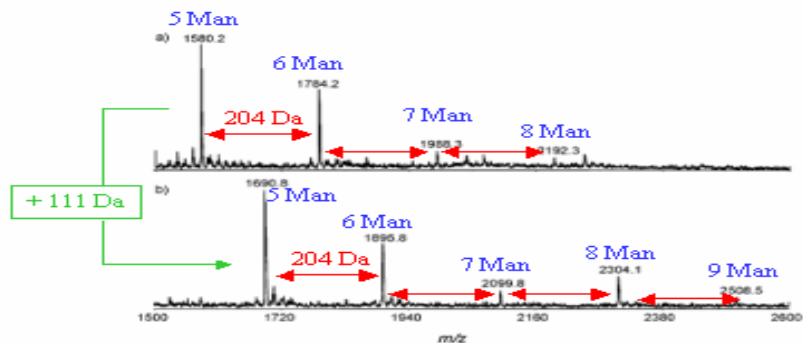


Mais cette enzyme **la PNGase F** est spécifique des eucaryotes et ne peut pas être utilisée chez les bactéries, C'est pourquoi il a été développé une autre technique de digestion par la **Pronase E**. Cette enzyme protéolytique est non spécifique, Elle digère l'ensemble des liaisons peptidique et peut donc être utilisée pour l'étude des glycoprotéines. Alors en soumettre tous les échantillons à la digestion à **la pronase E**



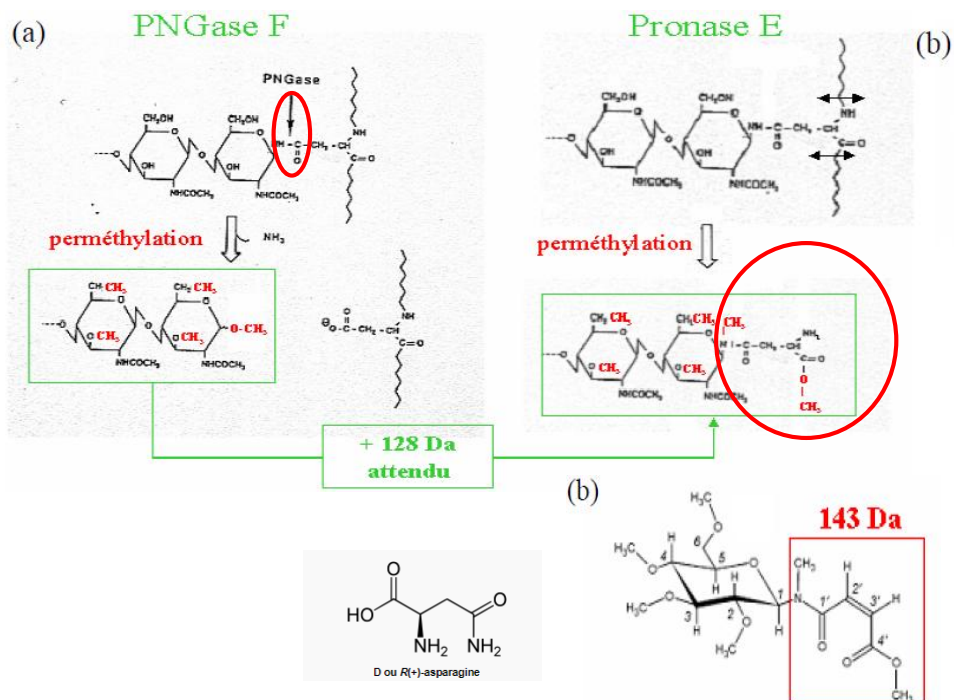
- Une perméthylation des polysaccharides ainsi obtenue (La perméthylation permet d'avoir des informations sur la structure des molécules étudiées et augmente la sensibilité de l'analyse en MS)
- Enfin une analyse des molécules obtenues par (MS).

Si l'on compare les spectres après digestion à la PNGase F et à la Pronase E on constate que l'on a une différence de masse de 111 Da pour un même résidu.

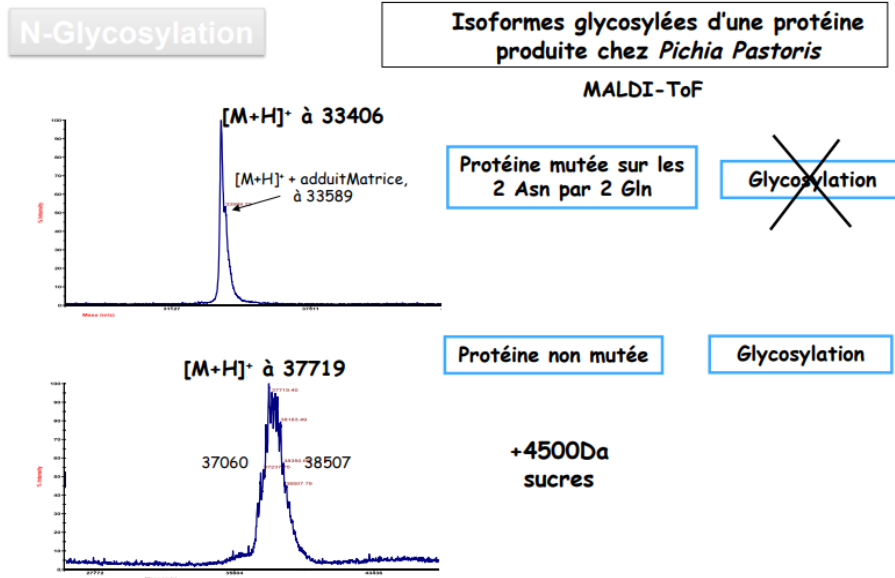


En théorie, après perméthylation, on s'attendait à

- Une différence de 128 Da entre les deux digestions sur le même résidu.
- En MS/MS, on obtient une différence de masse de 143 Da alors qu'on s'attendait à une différence de 160 Da (résidu asparagine). Cela signifie que le traitement à la pronase E induit un réarrangement au niveau du résidu asparagine.
- Il a été démontré que la différence de 17 Da correspond à la perte ou au gain d'ammoniaque (NH<sub>3</sub>) du résidu asparagine.
- Le gain de 111 Da en MALDI-TOF ou la perte de 143 Da en MS/MS, peuvent donc être utilisés comme marqueurs pour la présence de N-glycosylation



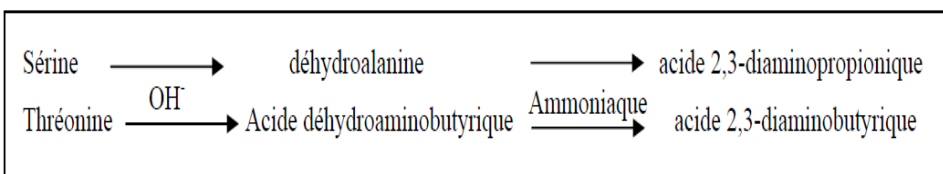
La détection des mutation par spectrométrie de masse en l'absence de la glycosylation.



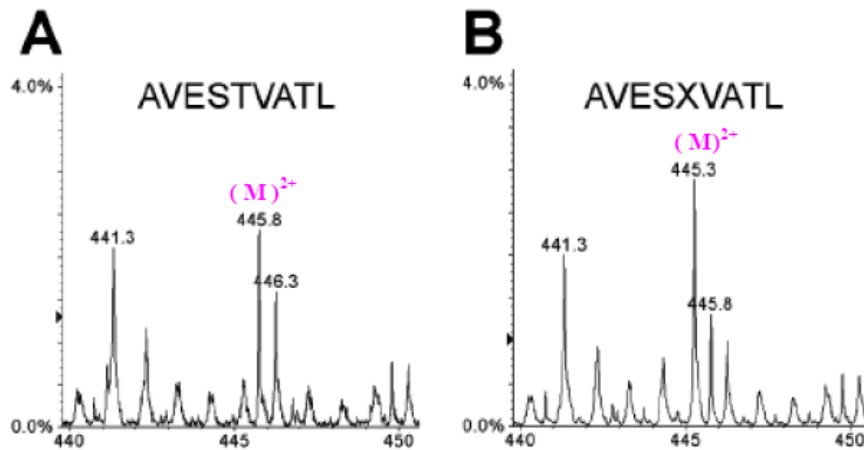
La méthode d'étude des sites de glycosylation consiste à

- séparer les différents sucres des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE)
- puis à réaliser une  $\beta$ -élimination alcaline des sucres, en rajoutant un nucléophile (ammoniaque,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ).

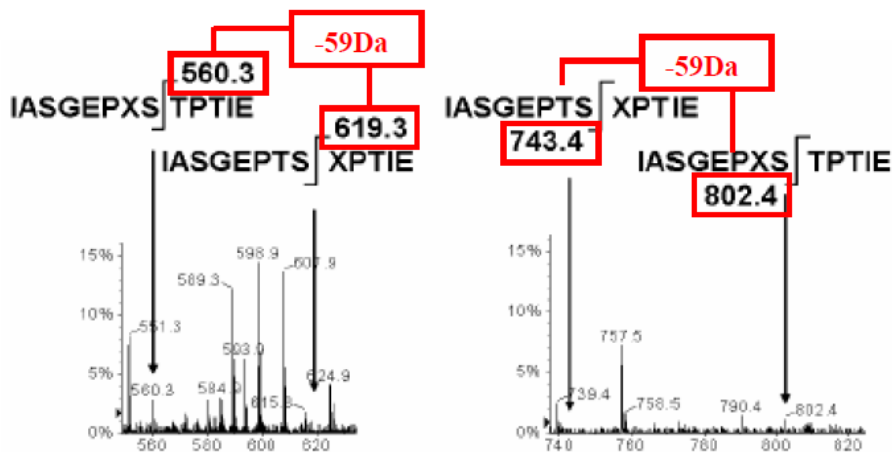
La différence de masse permet alors de détecter les glycoprotéines par MS et fournit ainsi un tag stable qui reste intact durant le séquençage en MS/MS



En comparant des spectres avant et après traitement à l'ammoniaque, on observe une différence de masse de 1Da due à la substitution d'un hydroxyle par un groupe amine.



Une autre approche est d'utiliser du 2-aminoethanethiol (AET) à la place de l'ammoniaque. Ceci va donc générer une  $\beta$ -méthylaminoéthylcystéine à la place de la **thréonine** et on observera donc au niveau du spectre une différence de masse de 59 Da correspondant au résidu thréonine



Tous ces méthodes (digestion par la pronase E, perméthylation,  $\beta$ -élimination, etc...) nous permettent d'obtenir un marqueur de masse caractéristique des N ou O-glycosylations et qui reste stable durant les analyses de spectrométrie de masse.

### Les Modifications post-traductionnelles : Acétylation et Méthylation

Le principe de la localisation des acétylations et méthylations repose sur l'analyse d'ions issus de la fragmentation de peptides en ESI/MS avec un analyseur à haute résolution.

L'analyse des ions observés sur les spectres par des banques de données comme **SwissProt** permet l'identification des modifications.

Un incrément de masse de **14 Da** est révélateur d'une **méthylation** ( $\text{CH}_3$ ) sur les résidus Arg et Lys ; + **42 Da** indique une **acétylation** ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) à la place de l'hydrogène de la chaîne latérale de la Lys et de l'Arg.



Les modifications post-traductionnelles induisent un changement de masse qui peut-être mesuré par SM

La SM permet de :

- détecter des peptides ou protéines modifiées
- identifier la nature de la modification
- localiser la modification sur l'axe polypeptidique
- Différence de masse parfois insuffisante comme preuve (ex: 80 Da, phosphorylation ou sulfatation), besoin de vérifier par d'autres approches biochimiques (immuno-enzymo)

## **8. Protéomique clinique et recherches de biomarqueurs**

**La protéomique clinique** concerne l'étude du protéome pour la recherche de marqueurs diagnostiques, pronostiques et de suivi thérapeutique des pathologies humaines. L'étude du protéome permet également d'éclairer les cliniciens sur de potentielles cibles thérapeutiques.

Ce type d'étude nécessite souvent l'analyse d'un grand nombre d'échantillons et le suivi d'abondance de plusieurs centaines, voire de milliers, de protéines par échantillon. On assiste, ces dernières années, à des évolutions technologiques dans le domaine de la protéomique clinique focalisées sur la découverte de nouveaux biomarqueurs. L'intérêt de ces technologies réside dans la découverte de biomarqueurs à partir d'échantillons biologiques complexes.

De façon très générale, les principaux domaines d'application de la protéomique en biologie clinique peuvent être regroupés de la façon suivante:

### **1) Etudes à visée diagnostique ou thérapeutique (cibles vaccinales) sur des agents pathogènes**

Ce type d'études permet de caractériser différentes souches d'agents pathogènes, d'identifier plus précisément des protéines impliquées, soit dans la pathogénicité de ces souches, soit dans les interactions hôtes-pathogènes, et d'évaluer différents types de mécanisme de résistance.

### **2) Evaluation et développement de nouveaux médicaments**

Cela correspond à des possibilités d'évaluer de nouvelles cibles pharmacologiques, d'étudier l'efficacité d'un médicament et également d'explorer sa toxicité potentielle.

### **3) Constitution d'outils diagnostiques**

Il s'agit là d'un champ d'investigation extrêmement étendu. En effet, la capacité à établir et à comparer des profils protéiques doit contribuer à la mise en évidence et au développement de biomarqueurs spécifiques de pathologies. C'est le cas par exemple, pour les maladies auto-immunes, les pathologies cancéreuses, les pathologies rénales (protéomique « urinaire »), et les pathologies du système nerveux central, tout particulièrement les pathologies neurodégénératives (protéomique « rachidienne » à partir de LCR).

## Qu'est ce qu'un biomarqueur?

Les biomarqueurs peuvent être définis comme des paramètres biologiques (caractéristiques génétiques, protéines, métabolites) qui permettent de caractériser un état physiologique, un état pathologique, l'évolution d'une maladie ou la réponse à un traitement. Lorsque le paramètre utilisé est le résultat d'un dosage ou d'une mesure à partir d'un échantillon biologique, le terme de biomarqueur est utilisé, autrement dit on peut considérer un biomarqueur comme un changement observable et /ou mesurable aux niveaux moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition d'un individu à une ou plusieurs substances chimiques.

## Les types de biomarqueurs

Les biomarqueurs peuvent être classés en 4 groupes :

- 1. Les biomarqueurs pronostiques** (diagnostiques) : permettant de séparer une population suivant des caractéristiques évolutives propres.
- 2. Les biomarqueurs prédictifs** : permettent d'estimer le succès du traitement mis en place.
- 3. Les biomarqueurs pharmacodynamiques** : permettant de suivre la réponse à une intervention thérapeutique.
- 4. Les biomarqueurs de substituions** : permettant d'évaluer l'efficacité d'un traitement en l'absence de données cliniques

## **Les critères d'un biomarqueur**

Pour qu'un biomarqueur biologique soit désigné comme utile pour la pratique clinique courante :

- Il doit être facilement détectable dans un liquide biologique.
- La modification de la concentration du biomarqueur doit être prédictive du risque de survenue d'un phénotype bien défini.
- Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui expliquent la relation entre le biomarqueur et le phénotype qu'il est censé prédire ou de diagnostiquer sont compris.
- La relation entre la concentration du biomarqueur et l'amplitude du risque (ou la gravité du phénotype) est linéaire.
- Le biomarqueur doit prédire, de manière indépendante des autres facteurs de risque cliniques ou d'autres biomarqueurs, la survenue du phénotype en question.
- La cinétique de modification de la concentration du biomarqueur doit être connue et reproductible pour un phénotype donné ou une intervention thérapeutique

## **L'intérêt clinique d'un biomarqueur**

Plusieurs étapes d'importance croissante président à la démonstration de l'intérêt clinique d'un biomarqueur :

- Démontrer que le biomarqueur est significativement modifié chez les malades par rapport aux témoins non malades.
- Évaluer les propriétés diagnostiques du biomarqueur en les comparant à celles de la méthode de référence.
- Démontrer que les propriétés diagnostiques du biomarqueur augmentent la capacité du médecin à prendre une bonne décision ;

## Recherche de biomarqueurs par l'approche protéomique

La recherche d'un biomarqueurs par analyse protéomique implique 4 étapes importantes:

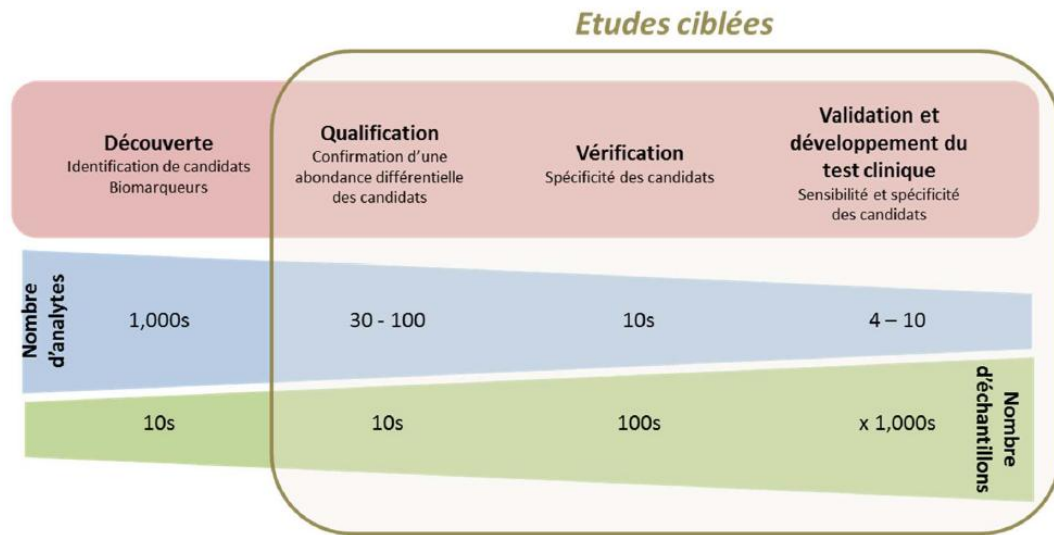
(i) l'étape de découverte des candidats, (ii) l'étape de qualification, (iii) l'étape de vérification et enfin (iv) l'étape de validation des candidats biomarqueurs.

**L'étape de découverte** vise à identifier des biomarqueurs potentiels, par analyse différentielle semi quantitative (quantification comparative) entre différents états (sain et malade).

**L'étape de qualification** consiste en la vérification d'une abondance différentielle des protéines entre les différentes populations (malades et contrôles).

**L'étape de vérification** consiste en la vérification de la spécificité du biomarqueur à la pathologie étudiée.

**L'étape de validation** consiste à établir la spécificité et la sensibilité des candidats biomarqueurs



***De la découverte à la validation d'un candidat biomarqueur***

La recherche de biomarqueurs diagnostiques, pronostiques ou évolutifs est devenue un enjeu crucial pour la prise en charge des patients atteints de pathologies complexes et en particulier de cancers.

**La protéomique clinique** est une approche permettant l'identification de ces biomarqueurs. Pour ce faire, il existe plusieurs techniques disponibles en protéomique pour la découverte de biomarqueurs: l'électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse (2DE-MS) ou la technologie SELDI-TOF MS (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry). Cependant, même si ces méthodes permettent d'obtenir un profil protéique avec un haut débit d'analyses, elles présentent des inconvénients tels que l'incapacité d'accéder à certaines catégories de protéines ou liées à l'identification des protéines détectées différemment abondantes lors de la comparaison d'échantillon.

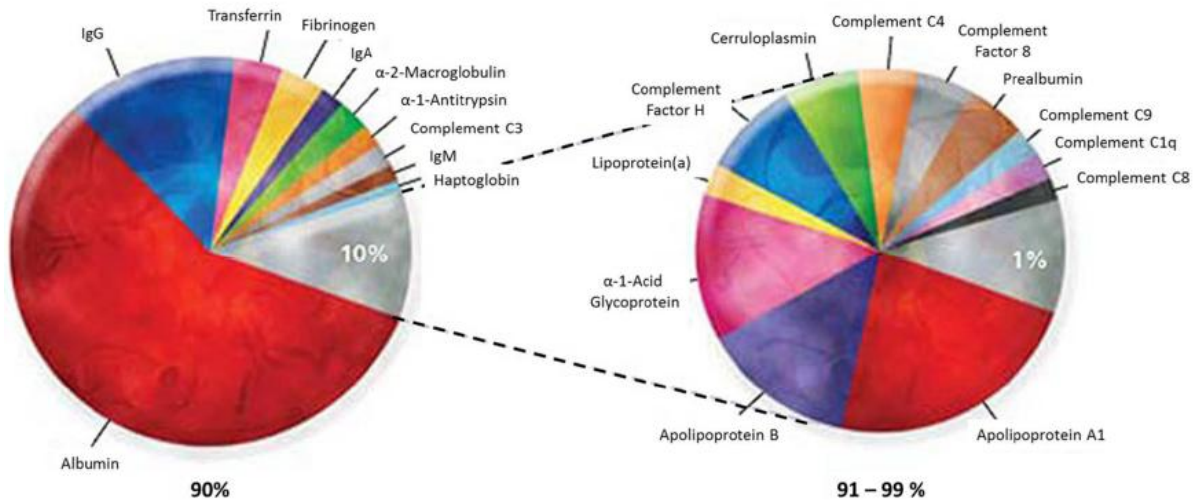
Dans le processus complet de la découverte à la validation de biomarqueurs protéiques, trois obstacles majeurs sont à surmonter:

- (i) la complexité et la gamme dynamique étendue des protéines dans le type d'échantillon étudié (tissus, cellules, plasma, urine, etc.),
- (ii) la concentration présumée très faible de nombreux biomarqueurs spécifiques de maladies
- (iii) la variabilité des individus et des pathologies.

L'extrême complexité des fluides biologiques, tels que le plasma ou l'urine, représente un enjeu majeur pour la protéomique

Dans le cas du plasma, le rapport de concentration entre les protéines les plus abondantes (albumine) et les moins abondantes (cytokines) peut ainsi atteindre une valeur estimée à  $10^{12}$

L'albumine, à elle seule représente 55 % des protéines du plasma et les 9 protéines majoritaires constituent 90 % des protéines plasmatiques, alors qu'une vingtaine de protéines représentent, à elles seules, les 99% du contenu protéique total du plasma



*Distribution des protéines représentant (A) 90% et (B) de 91-99% de la quantité totale de protéines du plasma.*

### **L'accessibilité aux cohortes d'échantillons**

Pour la phase de découverte des candidats biomarqueurs, il est nécessaire, d'analyser plusieurs dizaines **d'échantillons collectés** dans des conditions strictement contrôlées et de minimiser la variabilité entre les patients d'une même population en appariant l'âge, le sexe, les caractéristiques des tumeurs pour les populations pathologiques.



Afin de réduire la gamme dynamique et la complexité de l'échantillon, plusieurs stratégies sont envisageables :

### 1. Déplétion des protéines les plus abondantes

Par des colonnes d'affinité

**La technologie « equalizer » :** enrichissement de l'échantillon par les protéines minoritaires (biomarqueurs), par l'utilisation d'une bibliothèque combinatoire d'hexapeptides (20 aa, il y a 64 millions de combinaisons possibles), les protéines les plus abondantes vont saturer leurs sites rapidement et libérer les protéines minoritaires.

**La technique d'immunodéplétion** qui consiste en la déplétion par immunoaffinité des protéines majoritaires d'un échantillon est réalisée à l'aide d'un mélange d'anticorps spécifiques immobilisés sur une matrice de chromatographie.

### La technologie « Equalizer » :

Une autre stratégie, basée sur le principe d'affinité : les protéines de l'échantillon se lient à une banque combinatoire d'hexapeptides (206 soit 64 millions ligands) greffés sur des billes de polyméthacrylate, pouvant théoriquement sélectionner toutes les protéines. Chaque ligand est présent en quantité identique, permettant de fixer un nombre identique de chacune des protéines du mélange. Sous un ratio billes/échantillon contrôlé, les protéines majoritaires satureront rapidement leur site et sont donc éliminées par lavage, tandis que les protéines moins représentées s'adsorbent sur les billes et se retrouvent plus concentrées dans l'éluat final.

Cette technologie permet d'atténuer les différences de concentrations protéiques au sein des fluides biologiques et ainsi d'identifier un plus grand nombre de protéines

### La technologie IEF-OFFGEL :

La combinaison de deux types de séparations chromatographiques d'affinité : les peptides sont tout d'abord séparés selon **leur charge** sur une colonne sous l'application d'un gradient de sels puis ils sont séparés selon **leur hydrophobicité** sur une deuxième colonne de phase inverse (RP) sous l'application d'un gradient de phase organique.

Ainsi, les technologies **DALPC** (Direct Analysis of LargeProtein Complex) et **MudPIT** (multidimensional protein identification technology) ont émergé vers la fin des années 90, combinant ces deux types de phases afin de caractériser des protéomes complexes comme ceux du plasma humain ou encore du liquide céphalo-rachidien humain.

## 2. Enrichissement de l'échantillon en protéines possédant des modifications particulières

Comme les glycosylations sont très abondantes sur les marqueurs de surface cellulaire , ainsi que les protéine sécrétées.

Il y a des études qui ont permis de mettre en évidence une corrélation entre des taux de glycosylations anormaux et certains cas de cancer.

Ce type de protéine peut être enrichie par l'utilisation de la chromatographie d'affinité possédant une phase stationnaire greffée avec la lectine (une protéine reconnaissant une séquence spécifique de résidus glucidique) permettant la séparation des glycoprotéines.

### 3. Enrichissement en protéines issues d'un compartiment cellulaire particulier

Comme les mitochondries ou les membranes, par centrifugation différentielle (composés cellulaires séparés suivant leur taille et leur poids) ou encore, par utilisation de gradients de densité continus ou discontinus. Les gradients de sucrose permettent notamment d'isoler les protéines membranaires.

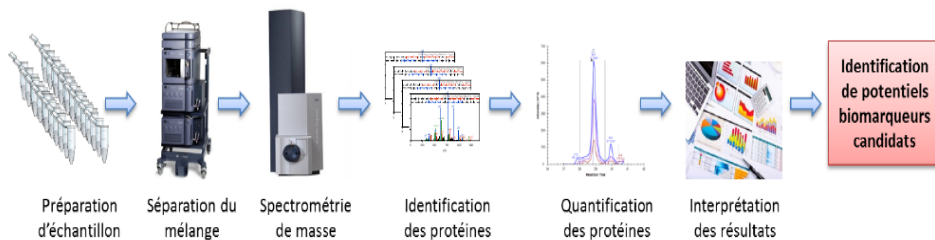
Figure 4 - Figure 4 : Valeurs indicatives des conditions de sédimentation pour quelques constituants

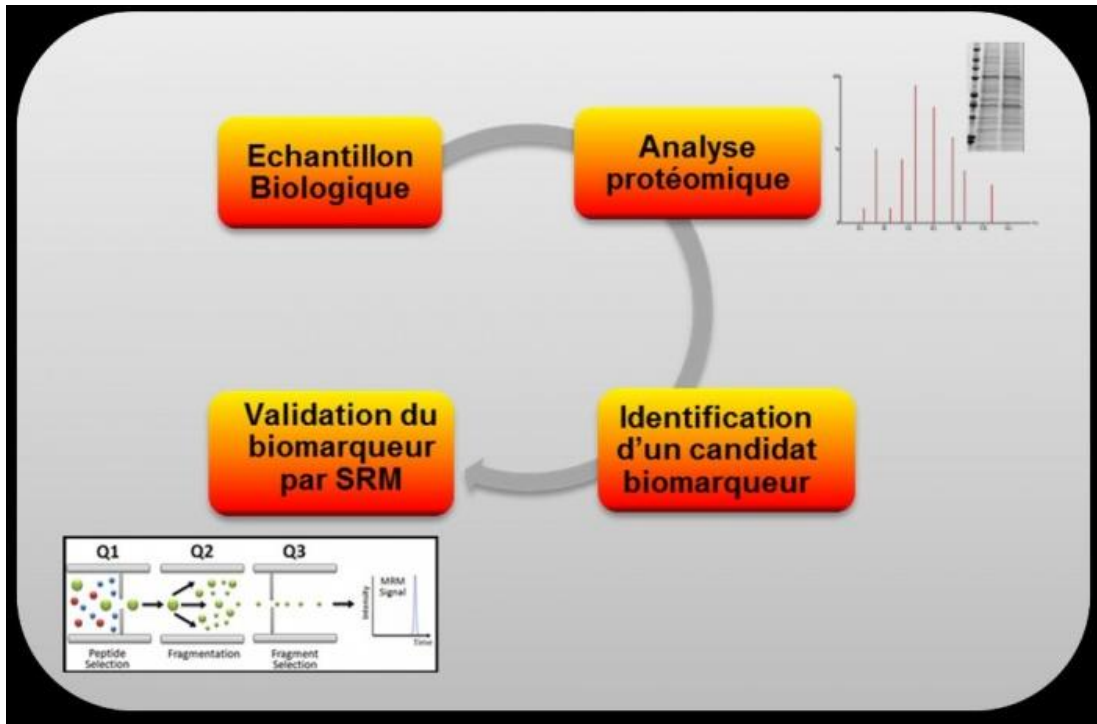
Constituant cellulaire	Conditions de sédimentation
Noyau	10 minutes à 500 g
Mitochondries, lysosomes, peroxysomes	10 minutes à 5 000 g
Réticulum endoplasmique, appareil de Golgi	1 heure à 100 000 g

*Ces valeurs peuvent varier en fonction du matériel utilisé, la composition des membranes pouvant en particulier modifier la densité des constituants. On constate que des constituants différents sédimentent approximativement dans les mêmes conditions. Pour pouvoir les séparer il faut d'autres méthodes, par exemple une centrifugation à l'équilibre sur gradient de saccharose (voir ci-dessous) qui permet de séparer les différents compartiments de l'appareil de Golgi (on parle plutôt de fractions enrichies).*

Après la séparation et le fractionnement de tous les différents types protéiques de la cellule. Les échantillons subissent une analyse protéomique suivant les étapes de la protéomique moderne.

1. Séparation du mélange de chaque fraction par **Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)**, qui permet la séparation des protéines en fonction des différents paramètres.
2. Après le fractionnement on soumet ses fraction a une analyse SM, suivi par le traitement des données
3. Après le traitement des données suivi par une quantification et une étude corrélative et statistique , nous permettent de suggéré la structure et la séquence de NV biomarqueur server a la recherche des NV médicaments pour le traitement des pathologies.





### Exemple de l'identification d'un candidat biomarqueur du lymphome du manteau

Une méthodologie protéomique a été mise au point pour proposer directement par MS des biomarqueurs membranaires exprimés spécifiquement au niveau de la membrane plasmique des lymphocytes B pathologiques. Pour cela, une étude du **protéome membranaire de microparticules** (vésicules de 0.1 à 1µm de diamètre provenant de la membrane plasmique et générées lorsque la cellule est stressée) a été réalisée et nous a permis de montrer que des préparations de microparticules constituent un matériel enrichi en protéines membranaires (Miguet et al. 2006 et 2007). Cette méthodologie a ensuite été appliquée à la **recherche de biomarqueurs du lymphome du manteau**. Une étude protéomique différentielle réalisée à partir de microparticules provenant d'un unique patient atteint soit de leucémie lymphoïde chronique, de lymphome à petites cellules ou de lymphome du manteau a été réalisée. Cette étude différentielle a permis de proposer un candidat biomarqueur potentiel du lymphome du manteau, le CD148 (Miguet et al. 2009), une protéine potentiellement surexprimée dans cette pathologie. La surexpression de cette protéine a d'ores et déjà été validée par des techniques immunologiques (cytométrie de flux) sur environ 200 cas par nos collaborateurs (équipe du Pr. L. Mauvieux, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg).

