**L’analyse protéomique**

***La protéomique d’expression***

Dans cette branche de l’analyse protéomique, on cherche à identifier les gènes exprimés dans une condition donnée, mais aussi à déterminer les quantités de chaque protéine présentes dans l’objet biologique étudié, en prenant autant que possible en compte les différents variants de protéines provenant par exemple de modifications post-traductionnelles. En corollaire, la détermination de la nature et de la localisation des modifications post-traductionnelles est une part importante de cette discipline.

*Électrophorèse bidimensionnelle et spectrométrie de masse*

Dans sa version classique, la protéomique d’expression couple l’électrophorèse bidimensionnelle à la spectrométrie de masse. L’électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer plusieurs centaines de formes protéiques, et en particulier un grand nombre de variants post-traductionnels, avec une dimension quantitative et une capacité unique de séparer des protéines entières. La spectrométrie de masse apporte quant à elle sa capacité à caractériser les protéines ainsi séparées avec force détails, comme l’identification de modifications post-traductionnelles atypiques, et bien sûr la détermination de leur site. Si cette technique a fait ses preuves, elle a aussi montré ses limites en termes de spectre d’analyse, par exemple des protéines minoritaires et membranaires, ou en termes de débit d’analyse et de miniaturisation. Ces limites provenant essentiellement de l’électrophorèse bidimensionnelle.

*Chromatographie et spectrométrie de masse*

Parmi eux, les schémas fondés sur la séparation chromatographique des protéines méritent d’être cités. Pour des raisons de miniaturisation, ces techniques ne sont pas implantées sous forme de colonne chromatographique, mais sous forme de surfaces d’adsorption planes ou de billes.

Dans la technologie SELDI (surface enhanced laser desorption-ionization), ce qui est retenu sur la surface chromatograpique est analysé en spectrométrie de masse. Le principe consiste donc à déposer un échantillon complexe sur la surface chromatographique, puis à éluer partiellement cet échantillon jusqu’à ce que soit adsorbé un nombre de protéines compatibles avec la résolution du spectromètre de masse. Ce système est utilisé en analyse comparative pour analyser des marqueurs présents dans un échantillon par rapport à un autre. En variant le type de support chromatographique et le schéma d’élution partielle, il est souvent possible de mettre en évidence des marqueurs différentiels. Du fait de sa miniaturisation et de sa simplicité, cette technique est bien adaptée à l’analyse d’échantillons de petite taille comme des biopsies cliniques. Elle pâtit cependant de la difficulté à réaliser une analyse poussée des marqueurs ainsi mis en évidence, et est plutôt adaptée à l’analyse des protéines de petite taille. De plus, du fait même du principe de l’analyse, les pertes en termes de nombre de marqueurs présomptifs sont considérables. Dans d’autres cas, ce sont les éluats successifs de l’échantillon complexe adsorbé sur la bille chromatographique qui sont analysés, ce qui permet une meilleure prise en compte de la complexité de l’échantillon. De plus, l’utilisation de techniques de digestion et d’analyse des peptides est facilitée, ce qui permet une caractérisation détaillée des marqueurs d’intérêt. Ces caractéristiques positives sont contrebalancées par une analyse plus laborieuse, et par le fait que nombre de protéines ne sont pas éluables des supports chromatographiques par un système compatible avec les étapes ultérieures fondées sur la spectrométrie de masse.

Du fait des problèmes rencontrés dans les analyses reposant sur la séparation de protéines entières, ce sont directement les peptides issus du clivage en masse des protéines cellulaires qui sont analysés dans le schéma appelé MUDPIT (multidimensional protein identification technology). Comme il est rare qu’une protéine, quelle qu’elle soit, ne donne pas au moins un peptide apparaissant dans le spectromètre de masse, cette technique est très performante en termes de spectre des protéines analysées, ainsi qu’en termes de détermination de modifications post-traductionnelles. En revanche, elle ne permet pas d’accéder aux quantités des protéines, et encore moins aux quantités relatives des différents variants de protéines. Afin de pallier ce grave défaut, tout en gardant les capacités des techniques fondées sur l’analyse directe des peptides, la technique dite ICAT (isotope coded affinity tag) a été proposée et validée.

Cependant, il faut souligner que ces techniques fondées sur l’analyse des peptides de digestion n’analysent que quelques peptides par protéine. Malgré ses performances impressionnantes, la technique MUDPIT est ainsi incapable de détecter une proportion importante (jusqu’à 50 %) des protéines visualisées par l’approche classique électrophorèse bidimensionnelle-spectrométrie de masse. À l’heure actuelle, aucune technique ni combinaison de techniques ne peut donc prétendre à l’exhaustivité, en particulier en ce qui concerne la détermination des modifications post-traductionnelles. Une analyse par électrophorèse bidimensionnelle concerne au mieux 2 000 formes protéiques, et une analyse MUDPIT 20 000 peptides, chiffres à mettre en regard des 20 000 formes protéiques et des 200 000 peptides tryptiques prédits pour une cellule humaine.

**La protéomique d’interactions**

Dans cette branche de l’analyse protéomique, l’enjeu est de déterminer les interactions physiques entre les protéines d’une même cellule, et les éventuelles variations de la composition de ces complexes multiprotéiques dans différentes situations biologiques. Pour cela, deux grandes techniques sont utilisées.

*L’approche double-hybride*

La première approche est celle du double-hybride. Cette technique est maintenant bien établie, et ses défauts, en particulier en termes de spécificité des interactions mises en évidence, sont bien connus. Des progrès récents ont cependant été enregistrés, en utilisant notamment des séquences correspondant à des domaines de protéines, et non à des protéines entières. Le gain de spécificité permet d’envisager des déterminations d’interactions protéine-protéine à l’échelle de cellules entières. Cependant, cette technique ne permet de déterminer que des interactions binaires entre protéines. De plus, l’influence des modifications post-traductionnelles est sous-évaluée, dans la mesure où seules celles présentes chez l’hôte servant à réaliser les expériences de double-hybride (généralement la levure) peuvent être prises en compte.

*La technique TAP-TAG*

Ces limites n’existent pas dans l’autre technique utilisée en protéomique d’interaction, le TAP-TAG (tandem affinity purification by tag). Dans cette approche, ce sont les complexes présents dans la cellule d’intérêt qui sont extraits puis analysés. De ce fait, l’influence des modifications post-traductionnelles est prise en compte. En revanche, la difficulté de cette approche est de deux ordres. Le premier est de diminuer les interactions non spécifiques. Ce problème majeur des techniques d’affinité (immunoprécipitation par exemple) a été résolu par la structure de l’étiquette d’affinité et le schéma de purification en tandem. En revanche, le deuxième problème, celui de l’extraction des complexes, reste non résolu. En effet, des interactions protéine-protéines labiles, qui sont détectables dans la cellule par la technique du double hybride, peuvent ne pas survivre au processus d’extraction utilisé. A contrario, le processus de lyse cellulaire peut aussi induire des interactions artéfactuelles. Cependant, cette technique permet de déterminer des complexes protéiques à l’échelle de cellules entières.

**Applications thérapeutiques de l’analyse protéomique**

Du fait de la redoutable complexité du monde des protéines, les techniques d’analyse protéomique, que celle-ci soit d’expression ou d’interaction, ne peuvent pas relever le défi de l’exhaustivité. En revanche, comme le niveau d’analyse est très proche de la réalité de la physiologie cellulaire, des analyses relativement partielles peuvent donner des résultats pertinents. Dans le cadre de cet article, l’accent sera mis sur des applications potentielles en thérapeutique.

*Recherche de marqueurs diagnostiques*

Un des domaines où l’analyse protéomique présente un fort potentiel est celui des marqueurs de diagnostic et de pronostic. En effet, des marqueurs secondaires peuvent avoir un très bon potentiel prédictif. En conséquence, les limitations de la protéomique d’expression dans l’analyse des protéines mineures ne sont pas rédhibitoires. Un exemple de recherche de marqueur diagnostique par analyse protéomique est celui d’une mise en évidence, dans le liquide céphalorachidien, de la protéine 14-3-3 σ comme marqueur de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Cette protéine est en fait une protéine abondante dans le cerveau, et sa présence en forte quantité dans le liquide céphalorachidien signe une destruction cérébrale d’un type particulier, caractéristique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob et de l’encéphalite herpétique.

*Compréhension moléculaire des maladies*

Du fait de sa généralité, l’approche protéomique peut être utilisée pour augmenter la compréhension des maladies en vue d’un meilleur traitement ou, au moins, d’un meilleur diagnostic. Dans ce cadre, le fait que l’analyse protéomique ne suppose pas d’hypothèses mécanistiques permet une approche sans a priori. En revanche, de nombreuses maladies font intervenir des protéines faiblement abondantes (par exemple les proto- ou anti-oncogènes) ou membranaires (comme dans la mucoviscidose), souvent difficiles à mettre en évidence. De plus, des mutations ponctuelles, difficiles à détecter en analyse protéomique, peuvent jouer un rôle crucial dans l’étiologie de certains cancers.

Ces limites de l’analyse protéomique constituent un obstacle à la détection de cibles primaires susceptibles de donner lieu à des développements médicamenteux. En revanche, l’analyse protéomique est souvent capable de fournir une description moléculaire phénotypique des maladies. L’étude des phénomènes de transdifférenciation épithéliale dans certains cancers de la vessie en est un excellent exemple. Dans cette étude, l’analyse protéomique a permis de mettre en évidence une expression déréglée de certaines isoformes de kératines, véritables marqueurs pouvant ensuite être étudiés en détail par des techniques immunocytochimiques, par exemple pour une délimitation précise de la tumeur au sein du tissu.

L’étude des maladies virales peut également bénéficier des apports de l’analyse protéomique. Cette approche est en particulier bien adaptée à l’étude des mécanismes mis en place par les virus pour détourner la machinerie cellulaire à leur profit. Au-delà de la compréhension fondamentale, ce type d’étude pourrait permettre d’identifier des cibles cellulaires susceptibles d’être utilisées pour un traitement des affections virales.

*Compréhension moléculaire des relations hôte-pathogène*

Un cas particulier est représenté par l’étude des agents pathogènes et de la réponse immunitaire induite. Dans ce cadre, les études protéomiques sont particulièrement attractives dans plusieurs domaines. L’un d’entre eux est représenté par l’étude comparative des protéomes d’agents infectieux, en particulier bactériens ou parasitaires, pour identifier des corrélations entre protéome et virulence, permettant par la suite de définir des cibles thérapeutiques potentielles.

L’étude de la réponse immune induite au cours des infections est également un domaine où l’apport de l’analyse protéomique est intéressant. Il est ainsi possible de déterminer, par une approche protéomique, la nature des protéines de l’agent pathogène induisant une réponse immunitaire. Ces protéines représentent ensuite des cibles de choix pour le développement de stratégies vaccinales. Il est évident que, dans de telles études, la représentativité de l’étude protéomique constitue un facteur clé de pertinence. Dans le cas des protéomes bactériens, leur relative simplicité favorise les études les plus complètes par les techniques classiques d’analyse protéomique.

*Études toxicologiques*

Le type d’étude mentionné précédemment s’intéresse à la partie la plus en amont de la recherche pharmaceutique, qui va de la description de la maladie à la conception des molécules bioactives. L’analyse protéomique peut également être utilisée avec profit dans la partie située en aval, en particulier pour les études toxicologiques visant à comprendre les effets secondaires des molécules bioactives. Dans ce cadre, l’absence d’hypothèse préconçue et le spectre relativement étendu de l’analyse protéomique sont des avantages certains. Un bon exemple est fourni par l’étude des effets secondaires de la ciclosporine A , où l’analyse protéomique a permis de découvrir des aspects mécanistiques de la néphrotoxicité de ce médicament. En revanche, ces analyses toxicologiques supposent la réalisation de grandes séries expérimentales, ce qui nécessite une analyse informatisée des résultats et fait ressentir la faiblesse des outils de bioinformatique.

*Conclusions et perspectives*

Dans le champ d’application de la recherche thérapeutique, les limitations technologiques de l’analyse protéomique se font clairement sentir. Outre les difficultés liées à la gestion de très grands ensembles de données, communes à toutes les analyses à grande échelle, la protéomique d’expression fait ressortir des obstacles liés à l’hétérogénéité des protéines, sur le plan physicochimique comme sur le plan de la dynamique d’expression. En effet, le rapport quantitatif entre les protéines les moins abondantes et les plus abondantes dans une cellule dépasse 106, et atteint 1012 dans le sérum. Si le défi analytique reste immense, il est évident que tout progrès permettant d’accroître le spectre d’analyse aura des retentissements immédiats sur les performances de l’analyse protéomique, que ce soit en recherche à visée fondamentale ou thérapeutique.

Par ailleurs, il devrait être particulièrement intéressant de suivre les applications thérapeutiques de la protéomique d’interaction. S’il devient possible de cribler les diagrammes d’interactions protéine-protéine avec un investissement compatible avec les séries expérimentales importantes requises par la recherche thérapeutique, ce type d’analyse pourrait apporter des informations extrêmement pertinentes dans de nombreux domaines. En effet, s’il a été amplement démontré que les abondances relatives des protéines sont perturbées dans les processus pathologiques, il est légitime de penser que les interactions protéines-protéines peuvent l’être aussi, et être très sensibles à des phénomènes subtils comme des séries de mutations ponctuelles sur plusieurs protéines, difficiles à détecter en protéomique d’expression. La complémentarité entre ces deux branches de l’analyse protéomique apparaît donc évidente. La recherche thérapeutique, qui étudie souvent des phénomènes complexes dans des organismes complexes, devrait être un des principaux bénéficiaires de cette complémentarité. Elle seule permettra de prendre en compte la complexité biologique des protéines, défi bien supérieur à celui représenté par la complexité des génomes.