



HAL
open science

Présent et futur de la Protéomique clinique

Sylvain Lehmann, A. Dupuy, K. Peoc'H, Stephane Roche, B. Baudin, J.-L. Beaudoux, M. Quillard, F. Berger, G. Briand, S. Chwetzoff, et al.

► **To cite this version:**

Sylvain Lehmann, A. Dupuy, K. Peoc'H, Stephane Roche, B. Baudin, et al.. Présent et futur de la Protéomique clinique. *Annales de Biologie Clinique*, 2007, 65 (5), pp.463-471. 10.1684/abc.2007.0149 . hal-00179241

HAL Id: hal-00179241

<https://hal.science/hal-00179241>

Submitted on 18 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Présent et futur de la Protéomique clinique

Bilan d'activité du Groupe de travail « Protéomique clinique » de la SFBC 2004-2006

Present possibilities and future development of Clinical Proteomics

S. Lehmann
A. Dupuy
K. Peoc'h
S. Roche
B. Baudin
M. Quillard
F. Berger
G. Briand
S. Chwetzoff
G. Dine
P. Gonzalo
B. Dastugue
M. Sève
G. Siest
J.-L. Beaudoux

Résumé. Cet article de synthèse se penche sur une nouvelle discipline biologique et médicale, la « protéomique clinique ». Cette approche « post-génomique » vise à utiliser l'étude du protéome, c'est-à-dire de l'ensemble des peptides et protéines présents dans un échantillon biologique, pour donner une information diagnostique, pronostique ou de suivi thérapeutique des pathologies humaines. Cette nouvelle discipline est en plein développement car elle présente d'importantes perspectives pour les pathologies complexes ou pour la détection précoce de pathologies telles que les cancers. Les éléments de cette revue résultent du travail d'un groupe thématique de la SFBC (Société française de biologie clinique) de 2004 à 2006 dont l'objectif était d'évaluer l'état actuel de la « protéomique clinique » et de s'interroger sur son développement et son application future pour les biologistes. Il s'agit donc d'un état des lieux assez large décrivant les approches déjà accessibles dans les laboratoires d'analyses biologiques (dosages multiplex...) et les outils disponibles en recherche clinique et en protéomique « fondamentale », sans oublier les aspects bioinformatiques nécessaires à l'utilisation des données générées.

Mots clés : *protéomique, multiplex, biomarqueur*

Abstract. This review focuses on "clinical proteomics" which represents an emerging discipline in biomedical research. "Clinical proteomics" relies on the analysis of the proteome, i.e. the entire set of peptides and proteins present in a biological sample, to provide relevant data for diagnosis, prognosis or therapeutic strategies of human pathologies. This new type of approach has tremendous potential for the diagnosis of complex pathologies or for the early detection of cancers. This article reports the conclusions of a workgroup of the French Society for Clinical Biology (SFBC) 2004-2006 which evaluated the status, the impact and the future development of proteomics in the clinical field. It provides therefore a broad view going from the methods already present in the clinical laboratories (multiplex technologies...), to the tools for clinical and basis research including bioinformatics.

Key words: *proteomics, multiplex, biomarker*

Article reçu le 21 avril 2007,
accepté le 3 juillet 2007

Cet article rapporte les travaux du groupe de travail « Protéomique clinique » de la Société française de biologie clinique (SFBC) 2004-2006. L'objectif général de ce groupe de travail était de faire un état des lieux assez large

de la « protéomique clinique » afin de définir ses composantes actuelles et de prévoir son développement et ses applications futures pour les biologistes médicaux.

Rappelons tout d'abord que la « protéomique » se situe au premier plan des approches dites « post-génomiques » comprenant également « métabolomique », « lipidomique », « interactomique » [1]... Le terme générique de

Tirés à part : S. Lehmann
<s-lehmann@chu-montpellier.fr>

protéomique désigne l'étude du « protéome » qui comprend l'ensemble des peptides et protéines présents dans une cellule, un tissu, ou un prélèvement biologique, à un instant donné, et dans un environnement donné. Le champ plus spécifique de la « protéomique clinique » concerne l'étude du protéome à la recherche d'une part, de marqueurs diagnostiques, pronostiques et de suivi thérapeutique des pathologies humaines et, d'autre part, d'acteurs physiopathologiques pouvant servir de cible thérapeutique [2].

Trois niveaux différents d'approche protéomique peuvent être définis (*tableau 1*). En premier lieu on retrouve la protéomique « fondamentale » qui fait appel à des outils complexes ou coûteux, généralement de faible débit, tels que l'électrophorèse bidimensionnelle (2D) ou la plupart des applications de spectrométrie de masse (MALDI-TOF, Q-TOF, FT-ICR...) (*tableau 2*). Ces approches sont surtout utilisées pour la caractérisation de peptides et de protéines avec leurs modifications post-traductionnelles. On assiste ces dernières années à des évolutions technologiques importantes faisant passer certaines de ces technologies vers le haut débit. Ceci définit un deuxième groupe d'approche protéomique dans le domaine de la « recherche clinique » focalisé sur la découverte de nouveaux biomarqueurs. C'est le cas en particulier d'approches couplant préfractionnement chromatographique et spectrométrie de masse pour l'obtention rapide de profils protéiques [3]. L'intérêt de ces technologies réside dans la découverte, individuelle ou combinée, de biomarqueurs à partir d'échantillons biologiques complexes. Ces profils pourraient être utilisés directement comme marqueur. Alternativement, des approches plus classiques permettant la mesure simultanée de multiples paramètres (multiplexage) pourront être celles qui représenteront l'essentiel de la « protéomique clinique » pratiquée dans les laboratoires d'analyses (*tableau 1*) [4].

Après ces premières observations et pour couvrir l'ensemble de la protéomique clinique, le travail de réflexion du groupe a porté sur six thèmes :

1. État des lieux des approches de protéomique clinique (type multiplexage en phase liquide ou solide) actuellement disponibles dans les laboratoires d'analyses biologiques.
 2. Évaluation de l'intérêt et de la place des technologies de recherche en haut débit de marqueurs de protéomique clinique (type « profiling » SELDI/ClinProt).
 3. Évaluation de la place et de l'intérêt de la technologie d'électrophorèse bidimensionnelle.
 4. Bilan des méthodes d'identification des protéines, en particulier de type spectrométrie de masse.
 5. Procédures pré-analytiques et protéomique.
 6. Analyse des données protéomiques et bio-informatique.
- Certaines de ces questions se sont révélées particulièrement importantes et d'actualité pour les biologistes et feront assurément l'objet de réflexions et de travaux ultérieurs.

Réflexions et conclusions du groupe sur les six thèmes définis

État des lieux des approches de protéomique clinique actuellement disponibles dans les laboratoires d'analyses de biologie médicale

Ce thème est particulièrement important pour les laboratoires d'analyses et pour l'avenir de la protéomique clinique. Les approches décrites ci-dessous permettent principalement la mesure simultanée de plusieurs paramètres, tous pertinents dans un cadre « clinico-protéomique » donné, c'est-à-dire sous la forme de panels regroupant des biomarqueurs d'intérêt.

Analyseurs miniaturisés multiparamètres

Il s'agit d'analyseurs déjà utilisés depuis quelques années, souvent transportables, utilisables en urgence et/ou de façon délocalisée pour mesurer en une fois un petit nombre de biomarqueurs. Ils reposent sur le développement de la miniaturisation et des micro- ou nanotechnologies (micro-fluidique...) comme le système Triage® (Biosite) [5] (*figure 1A*). Ces approches sont en fait à la limite de la protéomique clinique mais sont intéressantes conceptuellement, car elles préfigurent le devenir possible de ce domaine où de nombreux paramètres pourraient être déterminés rapidement, localement, et avec un faible volume d'échantillon. De même, il est possible que le rendu des résultats de ce type d'analyseurs soit à terme représenté par des indices (scores) indiquant une probabilité plus ou moins grande de la présence d'une pathologie (infarctus, AVC...). Il est essentiel que le biologiste, par exemple par l'intermédiaire de la SFBC, participe et valide de tels scores.

Multiplexage

On assiste au développement récent d'analyseurs de type multiplex, réellement multi-paramètres, c'est-à-dire capables de détecter plusieurs molécules simultanément dans un seul milieu réactionnel et dans une même unité de temps. Le multiplexage est basé sur des technologies novatrices développées depuis quelques années pour les laboratoires de recherche, dans la lignée des « puces » développées pour l'analyse du transcriptome. Il s'agit de mesurer en multiplex des marqueurs biologiques déjà connus en réalisant une économie significative de coût, de temps et de volumes d'échantillons biologiques. L'aspect « protéomique » avec sa notion d'exhaustivité réside ici dans la possibilité d'établir de véritables profils d'expression protéique à visée diagnostique, thérapeutique ou pronostique.

Les analyseurs multiplex disponibles dans les laboratoires cliniques font appel principalement à deux types de technologies, soit sur des surfaces de type « puce » [6], soit des billes en phase liquide [7] (*figure 1B et C*).

Tableau 1. Trois niveaux différents d'approche protéomique.

Niveau	Exemples	Avantages	Inconvénients
Protéomique « fondamentale »	MALDI-TOF Q-TOF, MS ⁿ , FT-ICR, 2D...	Précision, sensibilité, Analyse des modifications post-traductionnelles	Faible débit Coût équipements Technique manuelle
Recherche clinique	LC-2D SELDI, ClinProt, Protéine « array »	Haut débit Automatisé Adapté à la recherche de biomarqueurs	Coût total des analyses Sensibilité
Protéomique clinique	Multiplex sur puce ou liquide Analyse en micro-fluidique	Adapté à la validation de bio-marqueurs et à la biologie délocalisée	Limité à des marqueurs déjà identifiés

Tableau 2. Approches protéomiques.

Abréviation	Signification	Description succincte
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionisation – Time of flight Désorption et ionisation laser assistées par une matrice – temps de vol	Technique de séparation de peptides et de protéines selon leur masse. Les molécules sont déposées sur une cible. Un laser UV permet l'ionisation et la désorption par l'intermédiaire d'une matrice adjuvante. La séparation se fait par la mesure du temps de déplacement (vol) des molécules dans un tube sous vide
Q-TOF Ion Trap-TOF	Quadripôle – Temps de vol Trappe ionique - Temps de vol	Variante sophistiquée de spectromètres de masse constitués de 2 spectromètres de masse en tandem, le premier permettant une sélection d'un ion de masse donnée (quadripôle ou trappe d'ions) et le second permettant de connaître sa séquence en aminoacide
LC-MS/MS	Chromatographie liquide - spectrométrie de masse (MS) / MS	Technique combinant une séparation des protéines par chromatographie liquide (LC) haute performance avant de les analyser par deux techniques spectrométriques de masse successives
FT-ICR	Fourier Transform - Ion Cyclotron Resonance Résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier	Cette technique de spectrométrie de masse est la mesure de la masse d'un ion par la mesure du courant qu'il induit lors de son déplacement dans un champ magnétique. Cette technique permet d'obtenir une très grande précision de masse, de l'ordre de 1 ppm. Cette technologie peut être associée à une LC, LC-MS ou un MALDI
Profil type SELDI-TOF / ClinProt	Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization TOF et ClinProt Magnetic chromatographic beads and MALDI-TOF	Technique combinant la fixation de protéines d'un milieu biologique complexe sur différentes surfaces (SELDI) ou bille (ClinProt) selon leur affinité biochimique (ionique...) ou biologique (ligand...) et leur analyse ultérieure par spectrométrie de masse type MALDI-TOF

Le principe général des « biopuces » (*biochips*) est de déposer/adsorber sur une surface de taille minimale, généralement en silice traitée, des microgouttes (ou spots) de réactifs (anticorps, protéines...). Ces surfaces permettent alors, après incubation avec un échantillon, de réaliser la mesure de marqueurs d'intérêt (protéines plasmatiques, anticorps...). Chaque spot permet la capture d'un biomarqueur, généralement révélé par un réactif secondaire (anticorps...), lui-même marqué le plus souvent par un composé fluorescent. Ainsi, sur une petite surface, on peut réaliser des dizaines de réactions de type Elisa (*figure 1B*). La lecture est souvent effectuée avec une caméra de type CCD (*charge-coupled device*). Ces « puces à protéines » sont principalement disponibles en recherche fondamentale et dans l'industrie pour la détection d'ensembles de protéines telles que des cytokines et facteurs de croissance, des protéines impliquées dans des voies de signalisation, dans l'apoptose, etc. Certaines puces comprennent plus de 5 000 spots de protéines recombinantes pour la recherche d'auto-anticorps, pour l'étude de la spécificité

d'enzymes telles que des phosphatases, ou pour des études d'interaction protéine-protéine et ligand-protéine. L'industrie est particulièrement utilisatrice de ce type de produit pour la recherche et la validation de molécules à visée thérapeutique. Le passage de ces approches « précliniques » vers la clinique n'a vu le jour que récemment.

Le système sur billes quant à lui repose sur une approche de capture/détection comparable, mais la lecture est faite par une technique de type cytométrie en flux, dans laquelle un premier laser détecte le type de billes, et un second assure la quantification (technologie Luminex[®]). Le multiplexage est obtenu par la possibilité de mélanger jusqu'à 100 types de billes différentes dans un échantillon de volume réduit. Lors de la lecture, chaque type de bille sera reconnu et lu individuellement.

Ces technologies permettent donc théoriquement de détecter de multiples paramètres, rapidement et dans un faible volume d'échantillon, répondant ainsi aux exigences de la protéomique clinique. Plusieurs sociétés ont commencé à

revue générale

proposer l'utilisation de ces technologies pour mesurer des ensembles de paramètres cohérents ou « panels ». Fort de ce constat, notre groupe s'est penché sur les différents aspects de ces technologies en se limitant à la partie « protéique » de leur utilisation. Il faut en effet noter, pour la technologie Luminex[®] mais aussi pour certaines biopuces, que ces systèmes permettent également la détection d'acides nucléiques pour de nombreuses applications dans le domaine génomique.

Malgré le nombre important de sociétés proposant des panels pour la recherche fondamentale ou l'industrie, peu de systèmes sont disponibles pour les laboratoires clini-

ques. En France, pour les puces, seule la société Radox dispose d'analyseur à « biochips » : le système Evidence[®] automatisé et à haut débit et le système Investigator[®], qui utilise les mêmes puces, mais dont l'utilisation n'est pas automatisée. Pour la technologie Luminex par contre, le choix d'analyseurs est plus étoffé avec notamment les systèmes xMAP[®] (Luminex), Bio-Plex[®] (Bio-Rad), QUANTA Plex[®] (Inova/Menarini), Athena Multi-Lyte[®] (Zeus/InGen), LiquiChip[®] (Qiagen) et FIDIS-Caris[®] (Biomedical Diagnostics). Différentes sociétés vendent juste des kits de détection basés sur cette technologie (Cliniscience, Euromedex, R&D Systems...) [4].

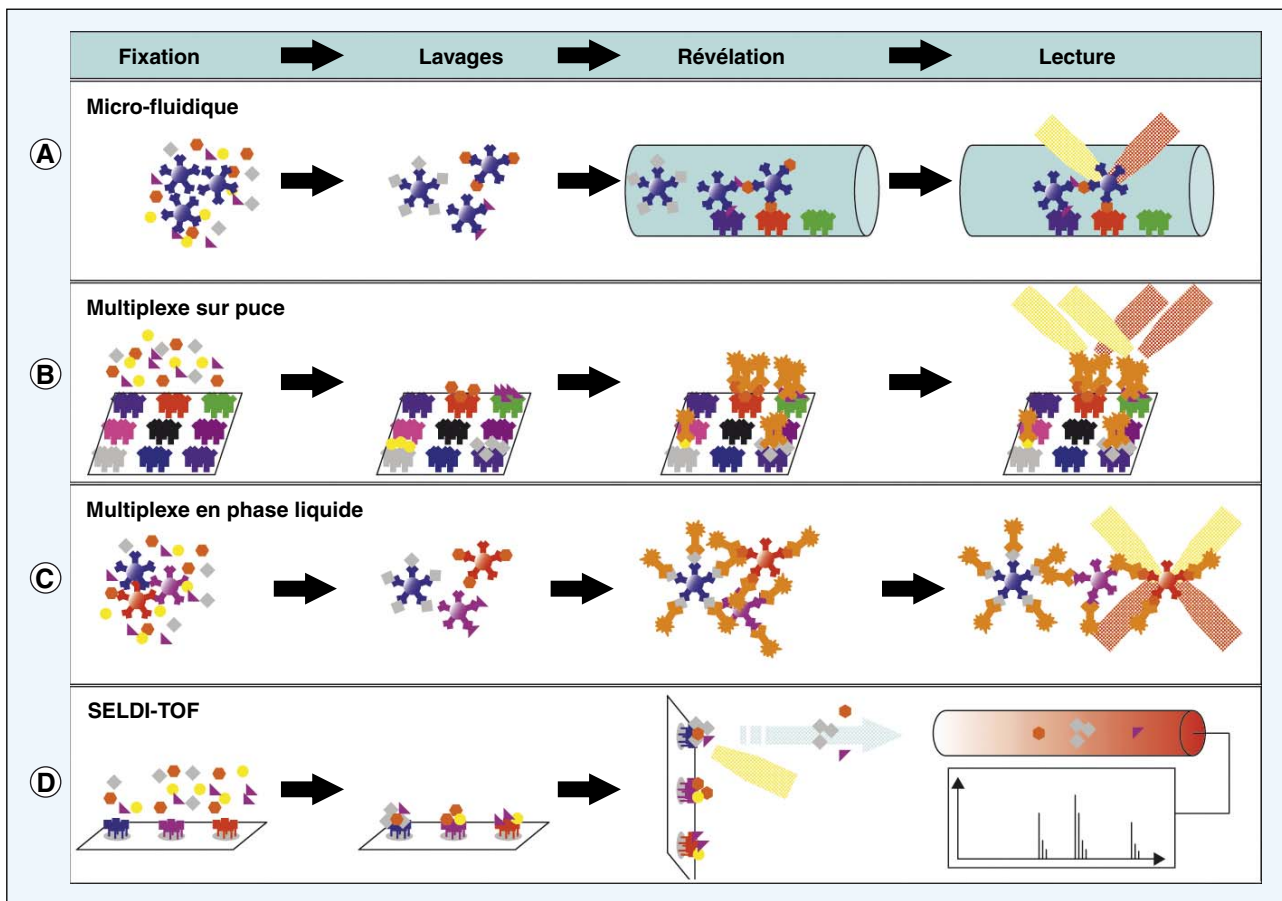


Figure 1. Schéma de principe de différentes méthodes d'analyse protéomiques. Dans les technologies immuno-chromatographiques communément appelées dans leur version miniaturisée : « micro-fluidiques », **(A)** les molécules d'intérêt (protéines, peptides...) sont capturées par des anticorps fixés à des billes (colorées...). Ces complexes sont entraînés par un système micro-fluidique dans des capillaires où sont immobilisés, à une position donnée, d'autres anticorps reconnaissant également la molécule à doser. Les billes sont arrêtées à ces positions et les complexes sont alors visibles dans une fenêtre prévue à cet effet. Dans les approches multiplex sur puce **(B)** ou en milieu liquide **(C)**, les molécules d'intérêt sont capturées par des anticorps (ou par un autre type de ligand tel que des antigènes spécifiques). Ces anticorps sont fixés à des positions précises sur une surface **(B)** ou liés à des billes de couleurs différentes **(C)**. Après rinçage, un second anticorps fluorescent, ou associé à une activité enzymatique, va lier la molécule à doser réalisant ainsi une réaction « sandwich ». La révélation se fait comme pour un Elisa classique **(B)** (la position sur la puce donnant une valeur pour chacun des paramètres analysés), ou comme une analyse de cytométrie en flux **(C)** (avec deux lasers, l'un lisant le type de bille, l'autre la quantité de second anticorps). Le SELDI-TOF **(D)** est basé sur la capture de molécules par une surface de type chromatographique (hydrophobe, ionique, affinité...). La révélation des molécules retenues repose sur l'utilisation d'un spectromètre de masse en temps de vol (TOF) donnant ainsi un profil des peptides et protéines retenus.

Analyse critique des systèmes multiplex

En premier lieu nous avons passé en revue les différents panels protéiques disponibles. Sur les sites et brochures des différentes sociétés, de très nombreux panels sont mentionnés : marqueurs tumoraux, cardiaques, bilans hormonaux, allergènes, dépistage des drogues, AVC, anémie, maladies infectieuses, marqueurs osseux, cytokines... En fait, la plupart des panels annoncés ces deux dernières années ne sont pas encore disponibles commercialement. De notre analyse préliminaire, il ressort une grande attente des biologistes du groupe de travail concernant le choix des paramètres et la pertinence des panels proposés. En effet, certains paramètres ne sont pas ou plus d'actualité, des marqueurs récents sont manquants et il y a un manque de cohérence global des panels. Une explication repose peut-être sur le fait que ces panels sont générés par chaque société en fonction des réactifs disponibles. D'autre part, la mise au point de ces dosages pose des problèmes techniques pour garantir une qualité analytique de niveau « clinique ». En effet, il s'agit généralement de combiner la capture simultanée de nombreuses protéines par des anticorps fixés au support et leur détection par un mélange de nombreux anticorps secondaires marqués. On imagine aisément les difficultés d'optimisation des conditions de capture et les problèmes liés au manque de spécificité de certains réactifs.

L'un des types de panels qui semble le plus abouti et le plus représenté parmi les sociétés concerne le domaine des cytokines. On y retrouve généralement de nombreuses interleukines (IL-1, 2, 4, 6, 8...), différents facteurs de croissance et cytokines (FGF, PDGF, IGF, IFN, TNF...). On remarquera tout d'abord qu'aucun biomarqueur de ces panels n'est reconnu dans la nomenclature et qu'il reste à démontrer l'intérêt clinique de nombre d'entre eux. Il est possible que leur présence sur le marché soit la conséquence de la disponibilité de tels panels dans leur version « recherche ».

Conclusion et perspective

→ *Les difficultés à la fois technologiques et analytiques retardent l'avènement de ces systèmes en biologie clinique*

Le groupe de travail souligne le passage délicat de ces méthodes multiplex des unités de recherche aux laboratoires de diagnostic. Ceci restera vrai tant que les fournisseurs ne prendront pas conscience de l'importance des phases de validation de leurs techniques : évaluer l'influence des facteurs pré-analytiques (voir thème 5), des interférences, des réactions croisées potentielles ; évaluer les performances analytiques des systèmes (imprécision, justesse, valeurs usuelles...), les comparer aux méthodes déjà utilisées en diagnostic et fournir des documents complets aux futurs utilisateurs. Pour l'instant, l'impression

qui se dégage est celle d'un développement « hâtif ». Il est en effet associé à un transfert des opérations de validation sur les utilisateurs (y compris pour ce qui est de la validation de l'intérêt en biologie clinique d'un panel donné). Ceci est difficilement acceptable en phase « commerciale », avec, qui plus est, des systèmes de coût élevés. L'ensemble des difficultés relatives explique probablement la faible pénétration actuelle de ces équipements dans les laboratoires hospitaliers, contrastant avec une bonne implantation dans les unités de recherche.

→ *Le groupe souligne la nécessité d'agir en amont de l'industrie pour concevoir et/ou obtenir des panels cliniquement pertinents*

Devant l'insuffisance de pertinence clinique des panels proposés, une question a été débattue au fil des réunions : est-ce le rôle d'un groupe tel que le nôtre de proposer des panels cliniquement pertinents ? D'un côté, nous pouvons considérer que c'est la mission des industriels mais pas celle des biologistes de concevoir des produits commerciaux ; de l'autre, il est certain que cela pourrait éviter des mois d'errements à valider dans nos laboratoires les panels mal conçus et insuffisamment évalués par nos partenaires industriels. On peut souligner que cette démarche se rapproche du concept de puce à façon.

→ *En conclusion, il faut clairement montrer que les dosages multiplex ont un intérêt pour le biologiste (coût, qualités analytiques, intérêt physiopathologique...), pour le clinicien (aide au diagnostic, suivi, recherche clinique) et pour le patient (bénéfice direct/indirect, diminution des prélèvements...).*

Intérêt et place des technologies de recherche en haut débit de marqueurs de protéomique clinique (type « profiling » SELDI-Ciphergen ou ClinProt-Brucker)

Il est apparu récemment des technologies permettant d'acquérir des données sur un grand nombre d'échantillons (haut débit), donnant lieu à une approche de protéomique différentielle. Il s'agit ici de mettre en évidence des peptides/protéines dont l'expression est modulée dans une pathologie donnée et qui pourront alors servir de biomarqueurs. Nous sommes ici dans une situation qui s'apparente plus à une « recherche clinique », mais il n'est pas exclu que de telles technologies soient un jour directement utilisées à des fins de diagnostic/pronostic/suivi et donc intéressent les laboratoires d'analyses biomédicales.

La première approche répondant à ces critères est appelée « Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry » ou SELDI-TOF® (Ciphergen - Biorad). Décrit pour la première fois en 1993, il s'agit d'un système permettant dans une première phase de retenir des protéines sur une petite surface chromato-

graphique (type échange ionique, hydrophobe...). Les peptides/protéines retenus sont ensuite analysés par spectrométrie de masse en temps de vol (MS-TOF) générant un profil représenté par une série de pics de nature inconnue mais qui peuvent être analysés par des outils statistiques et bio-informatiques. Il est apparu récemment une approche similaire au SELDI-TOF, la technologie ClinProt® (Brucker Daltonics) dans laquelle la capture se fait grâce à des billes magnétiques plutôt que sur surface plane. Dans l'attente d'études comparatives, notre groupe de travail n'a pas pour l'instant de recommandation sur l'intérêt d'une approche plutôt qu'une autre. Quoi qu'il en soit, ces approches permettent l'étude du profil d'expression protéique d'une grande variété d'échantillons biologiques complexes comme le sérum, le plasma, l'ascite, les urines et les lysats cellulaires. Le SELDI-TOF a été utilisé dans de nombreuses études pour identifier des biomarqueurs dans des pathologies diverses et en particulier dans les cancers, ce qui lui a valu une très grande notoriété initiale. Cependant, l'application de ces découvertes à la clinique se fait attendre et il semble dans un certain nombre de cas que les résultats initiaux en termes de sensibilité et de spécificité diagnostiques de ces nouveaux biomarqueurs potentiels ne soient à revoir à la baisse.

Si l'intérêt de telles approches pour les phases de découverte et de validation de biomarqueurs est évident et leur présence au sein de « plateformes » de protéomique clinique justifiée, on peut se poser la question de leur pertinence dans les laboratoires d'analyses biologiques. Notons que, d'un point de vue pratique, leur utilisation routinière s'apparente à celle de trousse Elisa avec une succession d'étapes de distribution, d'incubation et de lavage (figure 1C).

→ *Notre groupe de travail constate que, malgré les annonces faites, il n'y a pas encore d'application clinique disponible sur ces appareils et donc que l'investissement dans ces technologies est plus du domaine des plateformes de protéomique clinique pour la recherche et la validation de nouveaux marqueurs.*

Évaluation de la place et de l'intérêt de la technologie d'électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle (2D) est la technologie la plus classiquement utilisée en protéomique. Cette approche repose sur la séparation en gel des protéines, en fonction de deux caractéristiques biochimiques : leur point isoélectrique et leur masse moléculaire. Après séparation, les protéines sont repérées (coloration, fluorescence...) et une approche de protéomique différentielle peut être réalisée à la recherche de biomarqueurs potentiels. L'identification des protéines présentes dans les gels fait appel principalement à la spectrométrie de masse (MALDI-TOF, LC-MS/MS...) (tableau 2) [8]. Cette tech-

nique ancienne d'analyse protéique a bénéficié récemment d'améliorations importantes (gels pré-coulés, identification facilitée...), mais elle reste une technique lourde qui permet difficilement l'analyse rapide de nombreux échantillons. En fait, elle ne semble pas avoir d'application directe pour le diagnostic, ou alors réduite à la détection d'isoformes protéiques (haptoglobine, protéine 14-3-3...) dont la détermination pourrait être cliniquement intéressante.

Pour finir, notons qu'apparaissent sur le marché des approches appelées « 2D liquides » [9]. Il s'agit en fait de techniques chromatographiques automatisées mettant en série deux colonnes pour séparer les protéines selon leur charge (et non réellement leur point isoélectrique) et leur masse. De multiples fractions sont ainsi générées pour une étude analytique, voire de protéomique comparative de type profiling. Cette nouvelle approche devra être évaluée dans l'avenir ; elle présente en effet des avantages d'automatisation par rapport à la 2D classique mais l'analyse de chaque échantillon dure plus d'une dizaine d'heures.

→ *Notre groupe considère que la 2D classique n'a pas sa place dans les laboratoires d'analyses biologiques classiques même s'il s'agit d'une approche essentielle de la protéomique.*

Bilan des méthodes d'identification des protéines et en particulier de type spectrométrie de masse

L'identification des protéines à la suite d'une électrophorèse bidimensionnelle ou d'une chromatographie est de nos jours principalement réalisée en spectrométrie de masse. On peut compter en premier lieu sur le *peptide mass fingerprinting* où l'identification repose sur la mesure de masse de fragments peptidiques, générés en particulier par la trypsine à partir de la protéine à identifier ; l'interrogation de banques de données peptidiques permet le plus souvent de donner l'identité de la protéine avec une forte probabilité. Dans ce cas, la technique de MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) est encore souvent utilisée. On peut également réaliser un micro-séquençage par fragmentation des peptides avec des approches MS/MS, Q-TOF (Quadripole-TOF), Ion Trap-TOF ou même avec la très performante FT-ICR (résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier) permettant d'identifier de nombreuses modifications post-traductionnelles (tableau 2). Il est possible, et même souvent nécessaire, de coupler des techniques de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse (LC-MS), en particulier de nano HPLC pour la séparation des ions peptidiques à séquencer. Cela permet de réaliser des profils protéiques extrêmement complets qui ont leur place dans les approches de protéomique différentielle à la recherche de nouveaux biomarqueurs. On constate en fait une amélioration continue de ces techniques, d'où la nécessité d'une veille technolo-

gique les concernant. À titre d'exemple, se développent actuellement des approches de spectrométrie de masse quantitative détectant des peptides spécifiques de protéines d'intérêt [10]. L'une de ces approches dite *Multiple reaction monitoring*, est potentiellement utilisable pour la détection en multiplex de peptides et protéines dans des mélanges biologiques complexes, l'un des buts de la protéomique clinique.

→ *Notre groupe considère que les méthodes d'identification de protéines par spectrométrie de masse sont pour l'instant limitées à des laboratoires spécialisés de protéomique (plateformes) en raison des coûts, de la très haute technicité demandée et de la complexité de l'analyse et de l'interprétation du résultat brut obtenu.*

Procédures préanalytiques et protéomique

Dans la pratique courante des laboratoires d'analyses de biologie médicale, les conditions préanalytiques, liées à la collection, au transport, à la transformation et au stockage des échantillons biologiques influencent parfois de manière importante les résultats des étapes analytiques ultérieures. Les biologistes du groupe de travail ont été confrontés dans leur activité « d'analyse protéomique » à de nombreux exemples dans lesquels les conditions préanalytiques sont cruciales. Ce fut le cas en particulier lors des essais des systèmes multiplex décrits précédemment, pour lesquels l'utilisation de plasma préparé sur tube EDTA ou sur tube hépariné a eu d'importantes conséquences sur les résultats. Notre groupe de travail a ainsi débuté une réflexion centrée sur les procédures préanalytiques et la protéomique. Il faut noter en premier lieu que ce sujet est particulièrement important à l'heure du développement de la protéomique clinique et d'autres instances que la SFBC sont en pleine réflexion à ce sujet. C'est en particulier le cas de l'organisation internationale HUPO (*human proteome organization*) [11] et du réseau « Biomarqueurs d'états pathologiques » formé initialement sous l'égide du Réseau national des génopoles (RNG). Plusieurs membres de notre groupe de travail sont d'ailleurs membres de ce réseau. L'importance du sujet à également conduit l'Institut national du cancer (INCa) et la Haute autorité de santé (HAS) à lancer un appel d'offre tourné vers cette problématique.

À l'issue de ces premières réflexions notre groupe exprime les opinions suivantes :

→ Les variations dues aux procédures préanalytiques déjà observées dans les analyses protéomiques (SELDI, MS...) sont telles qu'il semble illusoire d'utiliser pour la recherche de nouveaux biomarqueurs des échantillons de bibliothèques déjà constituées, pour lesquels l'homogénéité préanalytique ne serait pas garantie (types de prélèvement, de tube, mode de conservation...). Ceci est d'autant plus vrai que les recherches de biomarqueurs par des approches

protéomiques aboutissent presque toujours, dans une phase initiale, à des candidats potentiels, dont l'identification et la validation demandent alors de gros investissements. Il faut donc être particulièrement attentif aux biais potentiels dès le début d'une étude.

→ Il faut uniformiser au maximum les procédures de constitution des échantillothèques de protéomique (tubes, anticoagulants, autres prétraitements, température de conservation...) et en particulier pour les études prospectives, il faut garder une grande homogénéité des conditions préanalytiques à la fois tout au long de l'étude et entre les centres participants.

→ Idéalement, il conviendrait d'utiliser, ou de mettre au point, une méthode de qualification des échantillons collectés avant leur traitement par les techniques de protéomique lourdes et coûteuses. Plusieurs laboratoires travaillent dans ce sens.

→ Les paramètres préanalytiques optimaux en fonction des approches protéomiques restent encore à préciser dans le cadre d'études en cours ou à venir. Il est d'ores et déjà acquis que ces paramètres peuvent différer selon les analytes recherchés et/ou les méthodes analytiques appliquées. On ne peut donc pas proposer un protocole préanalytique protéomique unique, d'autant plus qu'on ne peut pas forcément prédire qu'une banque biologique sera analysée avec telle ou telle méthode dans le futur. À défaut de cela, il faut pouvoir avoir accès rapidement, pour chaque type d'échantillon, aux conditions préanalytiques qui le caractérisent, afin d'éviter au maximum les biais et permettre les transferts d'échantillons de laboratoire à laboratoire. Pour cela nous ressentons la nécessité de disposer d'un codage général des variables liées à ces étapes préanalytiques.

Analyse des données protéomiques, index et algorithmes

Les technologies d'analyse protéomique évoquées dans les paragraphes précédents (2D, LC-MS, SELDI...) génèrent une très grande quantité de données brutes dont le traitement nécessite des moyens bio-informatiques adaptés et maîtrisés, extrêmement puissants et coûteux [12]. Ces outils d'analyse informatique sont souvent intégrés aux appareils (SELDI-TOF) ou fournis séparément sous forme de logiciels de traitement des données (ex. logiciels d'analyse des gels ou des chromatogrammes complexes pour la 2D en gel ou en phase liquide). Il faut mentionner également les indispensables logiciels de traitement des données peptidiques permettant l'interrogation des banques de données accessibles sur Internet et le traitement des informations qui en sont extraites. Ainsi, la bio-informatique constitue un partenaire obligatoire des technologies protéomiques.

La bio-informatique peut permettre, en outre, d'appliquer le concept de protéomique clinique (évaluation globale et simultanée d'un ensemble de protéines participant à un même processus physiopathologique) à des mesures multiples de paramètres biologiques obtenues, soit par des techniques classiques, soit en multiplex. Pour cela, il convient d'appliquer aux données produites avec des moyens routiniers une analyse bio-informatique afin de définir des profils et des index qui permettent ensuite une catégorisation clinique (diagnostique, pronostique...). Conceptuellement, l'idée est que la combinaison de marqueurs peu spécifiques ou sensibles peut produire une information clinique utile. Le concept est ancien et plusieurs exemples historiques existent : ainsi l'indice gamma, rapport calculé de deux dosages dans le LCR et de ces mêmes dosages sanguins permettant d'évaluer une synthèse intrathécale d'immunoglobulines, ou bien encore le rapport IgA/transferrine permettant d'évaluer deux aspects différents du dysfonctionnement hépatique lors des cirrhoses. Mais la nouveauté réside dans la possibilité de combiner désormais un grand nombre de marqueurs par des relations mathématiques complexes. Un exemple démonstratif de cette approche est celui du « Fibrotest[®] » utilisé pour estimer le niveau de fibrose hépatique sur la base du dosage de cinq paramètres biologiques classiques et d'un algorithme protégé par un brevet [13]. De même, des analyseurs au lit du malade (type Triage[®]) peuvent rendre un score de risque calculé avec un algorithme en lieu et place d'un dosage classique.

Notons qu'en utilisant des méthodes d'analyse de type multiplex, qui seront certainement de plus en plus proposées sur le marché, nous risquons d'obtenir une multitude de résultats dont certains correspondront à des paramètres biologiques validés, mais beaucoup d'autres à des paramètres non validés cliniquement... Seule la bio-informatique permettra d'extraire une information pertinente dans cette avalanche de données issues de la protéomique clinique.

→ *Si historiquement la génomique, puis actuellement la protéomique, sont en plein développement pour des applications cliniques, une vraie évolution de notre pratique est à attendre des outils bio-informatiques qui traiteront et mettront en relation toutes ces données.*

→ *Une réflexion et un positionnement des biologistes et de leurs sociétés savantes paraissent nécessaires face au développement probable, dans les prochaines années, d'algorithmes de décision clinique. Doit-on accepter d'utiliser des calculs dont on ignore les caractéristiques ? Quelles sont les conséquences en termes de responsabilité professionnelle pour le biologiste qui rendra ce type de résultat ? Comment le biologiste (ou les sociétés savantes comme la SFBC) peuvent-elles participer à l'établissement de ces algorithmes ? Ces derniers points soulèvent des problèmes éthiques qui devront être abordés.*

Conclusion

L'application de l'analyse protéomique au diagnostic biomédical est une perspective technologique majeure pour nos laboratoires. Le travail réalisé par le groupe SFBC a permis de faire un état des lieux de cet ensemble de techniques et son positionnement actuel en biologie (recherche et clinique). La diffusion de cette nouvelle technologie dans le cadre du diagnostic biologique se fera prioritairement par les techniques multiplex (en phase solide ou liquide). Il convient maintenant de préciser voire d'évaluer : 1) les conditions préanalytiques appliquées aux échantillons biologiques afin de permettre leur analyse par la technologie protéomique ; 2) l'intérêt « bioclinique » des combinaisons de biomarqueurs proposées par les industriels. Ces deux thèmes, associés à une veille technologique et à une réflexion sur les choix de panels protéomiques pertinents pour les applications cliniques, feront l'objet de réflexions supplémentaires au sein de la SFBC.

Références

1. Kiechle FL, Zhang X. The postgenomic era : implications for the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 2002 ; 126 : 255-62.
2. Vitzthum F, Behrens F, Anderson NL, Shaw JH. Proteomics : from basic research to diagnostic application. A review of requirements & needs. *J Proteome Res* 2005 ; 4 : 1086-97.
3. Reynès C, Roche S, Tiers L, *et al.* Comparison between surface and bead based MALDI profiling technologies using a single bioinformatics algorithm. *Clin Proteomics* 2007 ; sous presse.
4. Dupuy AM, Lehmann S, Cristol JP. Protein biochip systems for the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2005 ; 43 : 1291-302.
5. Apple FS, Christenson RH, Valdes R, *et al.* Simultaneous rapid measurement of whole blood myoglobin, creatine kinase MB, and cardiac troponin I by the triage cardiac panel for detection of myocardial infarction. *Clin Chem* 1999 ; 45 : 199-205.
6. Fitzgerald SP, Lamont JV, McConnell RI, Benchikh el O. Development of a high-throughput automated analyzer using biochip array technology. *Clin Chem* 2005 ; 51 : 1165-76.
7. Shovman O, Gilburd B, Barzilai O, *et al.* Evaluation of the BioPlex 2200 ANA screen : analysis of 510 healthy subjects : incidence of natural/predictive autoantibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2005 ; 1050 : 380-8.
8. Bruneel A, Labas V, Mailloux A, *et al.* Proteomic study of human umbilical vein endothelial cells in culture. *Proteomics* 2003 ; 3 : 714-23.
9. Soldi M, Sarto C, Valsecchi C, *et al.* Proteome profile of human urine with two-dimensional liquid phase fractionation. *Proteomics* 2005 ; 5 : 2641-7.

10. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 2006 ; 312 : 212-7.

11. Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, *et al.* HUPO plasma proteome project specimen collection and handling : towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics* 2005 ; 5 : 3262-77.

12. Fung ET, Weinberger SR, Gavin E, Zhang F. Bioinformatics approaches in clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2005 ; 2 : 847-62.

13. Ngo Y, Munteanu M, Messous D, *et al.* A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2006 ; 52 : 1887-96.

<i>Professeur Baudin Bruno</i> Laboratoire de biochimie A, Hôpital Saint-Antoine, 184, rue du Fbg Saint-Antoine 75571 Paris Cedex 12	☎ 01 49 28 20 13 @ bruno.baudin@sat.aphp.fr
<i>Professeur Beaudeau Jean-Louis</i> Service de biochimie métabolique, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, 83, Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris	☎ 01 42 16 21 87 @ jean-louis.beaudeau@psl.aphp.fr
<i>Professeur Berger François</i> Inserm Unité 318 Pavillon B, CHU Albert Michallon, BP 21738043, Grenoble Cedex 09	☎ 04 76 76 56 25 @ Francois.Berger@ujf-grenoble.fr
<i>Docteur Briand Gilbert</i> Laboratoire de biochimie-biologie moléculaire, CHRU-Site Eurasanté, 59037 Lille Cedex	☎ 03 20 62 68 99 @ g-briand@chru-lille.fr
<i>Docteur Chwetzoff Serge</i> Inserm U, Faculté de Médecine, CHU Saint-Antoine, 27, rue de Chaligny, 75012 Paris	☎ 01 40 01 13 23 @ chwetzoff@lemel.fr
<i>Professeur Dastugue Bernard</i> Faculté de médecine, 28, Place Henri-Dunant - BP 38, 63001 Clermont-Ferrand Cedex	☎ 04 73 17 81 80 @ Bernard.DASTUGUE@inserm.u-clermont1.fr
<i>Professeuse Dine Gérard</i> Laboratoire d'ingénierie en biotechnologies et santé, École centrale de Paris, Grande Voie des Vignes, 92295 Chatenay Malabry	☎ 03 25 49 47 21 @ ibt.ims@wanadoo.fr
<i>Docteur Dupuy Annie</i> Laboratoire de biochimie, Hôpital Lapeyronie, 34295 Montpellier Cedex 5	☎ 04 67 33 79 61 @ am-dupuy@chu-montpellier.fr
<i>Docteur Gonzalo Philippe</i> Institut de biologie et chimie des protéines, UMR 5086-CNRS/Université Lyon 1, IFR 128, 7, passage du Vercors 69367 Lyon Cedex	☎ 04 72 72 26 45 @ p.gonzalo@ibcp.fr
<i>Professeur Lehmann Sylvain et docteur Roche Stéphane</i> Laboratoire de biochimie, Hôpital Saint Eloi, 80 avenue A. Fliche, 3 4295 Montpellier Cedex 5	☎ 04.67.33.71.23 @ s-lehmann@chu-montpellier.fr
<i>Docteur Peoc'h Katell</i> Service de biochimie et biologie moléculaire, Hôpital Lariboisière, 2, rue Ambroise Paré, 75475 Paris Cedex 13	☎ 01 49 95 64 40 @ katell.peoch@lrb.ap-hop-paris.fr
<i>Docteur Quillard Muriel</i> Laboratoire de biochimie médicale, CHU de Rouen, 1, rue de Germont, 76031 Rouen Cedex	☎ 02 32 88 81 19 @ muriel.quillard@chu-rouen.fr
<i>Docteur Seve Michel</i> Centre d'Innovation en biologie, CHU Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 09	☎ 04 76 76 54 84 @ Mseve@chu-grenoble.fr
<i>Professeur Siest Gérard</i> Inserm U525, Equipe 4, Faculté de pharmacie, UHP Nancy 1, 30, rue Lionnois, 54000 Nancy	☎ 03 83 68 21 70 @ Gerard.Siest@pharma.uhp-nancy.fr