الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supèrieur et de la Recherche Scientifique

جـــامعـــة محمد الصديق بن يحـيـــــى جيجـل

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Moléculaire et Cellulaire

كليـة عـــلوم الطـبيعـة و الحـــياة
قســـم: البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biologie Moléculaire et cellulaire

Thème

Approche protéomique en clinique

Membres de Jury

Président : Mme.Abbes A
Examinateur: Mme. Benseghier S
Encadreur : Dr. Aissaoui S

Présenté par :

Yahi Besma
Belhimer Khadidja

Année Universitaire : 2018-2019

Numéro d'ordre (bibliothèque) :……..…

Remerciements

El hamdou l'illah avant tout, Naturellement, nous remercions notre promoteur, Madame S. AISSAOUI, pour sa disponibilité au quotidien, ses précieux conseils et ses encouragements. Qui nous a pris à mener bien ce travail.

Nos remerciements vont aussi aux membres de jury pour nous avoir honorés en acceptant de juger notre modeste travail.

Nous remercions toutes les personnes du département de biologie moléculaire et cellulaire, permanentes ou non, pour leurs conseils, aide, et soutien, sans oublier l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation.

En fin, un grand MERCI s'adresse à nos collèges qui nous ont gratifiés d'un entourage de travail bien plaisant, et qui n'ont ménagé aucun effort pour nous encourager.

B et Kh

© Ladie Lynn
http://ladielynn.com

Dédicaces

A ma mère,

A mon père,

A mon mariee

A mes frères, Ames sœurs, A toutes ma famille,

A mes collèges, A mes amis,

A mon Binôme Khadidja belhimer

Besma

© Ladie Lynn
http://ladielynn.com

Dédicaces

A ma mère,

A mon père,

A mes frères, A mes sœurs, A toutes ma famille,

A mes collèges, A mes amis,

A mon Binôme Yahi Besma

Khadidja

© Ladie Lynn
http://ladielynn.com

Liste des abréviations ..... **iv**

Liste des figures ..... **vi**

Liste des tableaux ..... **viii**

Introduction **1**

Etude bibliographique

Chapitre I : Protéomique

I. 1. Définitions 3

I .1.1. Protéines 3

I.1.2. Protéome 4

I.1.3. Protéomique 5

I.2. Types de protéomique 6

I.2.1. protéomique différentielle 6

I.2.2. protéomique descriptive 7

I.2.3. protéomique structurale 7

I.2.4. protéomique fonctionnelle 8

I.2.5. Analyse des modifications post traductionnelles 8

I.3. Principe d'une analyse protéomique 9

I .3.1. Préparation d'échantillons biologiques 9

I .3.2. Fractionnement d'extrait protéique 9

I .3.3. Séparation

I.3.3.1. Electrophorèse bidimensionnelle 9

a. Électrofocalisation 10

b. SDS PAGE 11

I.3. 3. 2. Visualisation des spots protéiques 12

I. 3. 3.3. Traitement informatique des images 2D-PAGE 12

I. 3. 3.4. Chromatographie liquide 12

I.3.4. Identification des protéines par spectrométrie de masse 13

I.3.4.1. Définition de la technique.....13

I.3.5. Analyse bioinformatique 15

I.4. Amélioration de technique et haut débit.....15

I.4. 1. Amélioration de la protéomique basée sur la 2DPAGE 15

I.4. 1. 1. Des évolutions Concernant l'extraction protéique 15

I.4. 1. 2. Des évolutions Concernant la technologie 2D-PAGE.....16

I.4. 1. 3. Des évolutions Concernant les colorants……16

I.4. 2. Vers une protéomique sans électrophorèse.....17

A. Approche AMT 17

B. SELDI-ToF ……. 18

C. Marquage isotopique ICAT.....19

D. Technologie SILAC… 20

Chapitre II: Applications de protéomique en clinique

II.1. Définition de protéomique clinique.....21

II.2. Biomarqueurs 21

II.2.1. Définition des biomarqueurs et leurs principales caractéristiques 21

II.2.2.Techniques appliquées pour l'étude différentes types des biomarqueurs. 22

II.2.3. Biomarqueurs protéomique 23

II.2.4. Validation clinique d'un biomarqueur 23

II.3. Fluides biologiques.....25

II.3.1. Définition.....25

II.3.2. Caractérisations des fluides 25

II.3.3. Types de fluides.....25

II .4. Applications de la protéomique clinique.....30

II .4.1. Applications médicales.....30

II.4.1.1. Etude de l'efficacité et de la toxicité des agents thérapeutiques 30

II.4.1.2. Application aux différents types de pathologies humaines 31

Chapitre III : Exemple d'une étude protéomique en clinique

III.1. Etude du profil protéomique de follicules ovariens 40

III.2. Etapes d'étude du profil protéomique de follicules ovariens.....40

III.2.1. .Isolement, culture et sélection de follicules 40

III.2.2. Analyse protéomique 40

III.3. Résultats et discussion 43

IV. Conclusion 46

V. Références bibliographiques 47

1 ou 2D	1 ou 2-dimensional
2DE	Two dimensional electrophoresis
2D PAGE	Electrophorèse bidimensionnelle polyacrylamide gel électrophorèses
AD	Alzheimer disease
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide Ribo Nucléique
ARNm	ARN messager
AMT	Accurate Mass and Time
CDK	Cyclin dependent kinases
CsA	Cyclosporine A
DBI	Inhibitor of diazepam binding
DCM	Dilated cardiomyopathy
ESI	Electrospray Ionization
ESI-MS/MS	Electrospray ionization tandem mass spectrometry
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HIV	Human immunodeficiency virus
HPLC	High performance liquid chromatography
ICAT	Isotope Coded Affinity Tags
IEF	Isoelectric focalisation
IPG	Immobilized pH gradient
kDa	Kilo dalton
LC	Liquid chromatography

LC-MS/MS Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry

LCR Liquide céphalorachidien

MALDI-TOF/TOF Matrix Assisted Laser Désorption Ionisation - Time of Flight / Time of Flight

MCJ Maladie de Creutzfeldt-Jakob

MS Mass Spectrometry

MS/MS Tandem mass spectrometry

MudPIT Multidimensional Protein Identification Technology

nanoLC-MS Nano liquid chromatography mass spectrometry

ng Nanogramme

NSAID Non steroidal anti-inflammatory drugs

PAGE PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

PCR Polymerase Chain Reaction

pH Potentiel hydrogène

SELDI-TOF Surfaced-enhanced laser desorption/ionization time of- flight

SILAC Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture

SDS Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE Sodium sodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SNC Système nerveux central

TPE Total protein extraction

VG vésicule germinative

Figure. 1. Biosynthèse des protéines **4**

Figure .2. L'ensemble des protéines **5**

Figure.3. Du gène à la protéine et leurs méthodes d'analyse **6**

Figure.4. Représentation du principe de séparation par de la 2D SDS-PAGE **10**

Figure. 5. Représentation du principe d'un gel 1D SDS-PAGE **11**

Figure. 6. Structure de base d'un spectromètre de masse de type MS **13**

Figure.7. Représentation schématique des différentes parties composant un spectromètre de masse en tandem ou MS/MS **14**

Figure .8. Déroulement d'une analyse protéomique basée sur la spectrométride masse **14**

Figure.9. L'Approche AMT **18**

Figure.10. Technologie SELDI-TOF **19**

Figure.11. Principe de l'ICAT **29**

Figure.12. Principe du SILAC **20**

Figure.13. De la découverte à la validation d'un candidat biomarqueur **24**

Figure.14. Différences entre le sang total, le sérum et le plasma **26**

Figure.15. Diagramme circulaire représentant la distribution différentielle des protéines majoritaires dans le sérum **26**

Figure. 16. Intervalle de concentration de 70 protéines du plasma **27**

Figure.17. Distribution des protéines représentant (A) 90% et (B) de 91-99% de la quantité totale de protéines du plasma **27**

Figure. 18. Circulation du liquide céphalorachidien **28**

Figure.19. Diagramme circulaire représentant la distribution différentielle des protéines majoritaires dans le LCR **29**

Figure. 20. Composition de l'urine **29**

Figure.21. Diagramme de la progression tumorale **32**

Figure.22. Quelques exemples d'approches proteomiques utilisées lors de l'identification de marqueurs tumoraux **33**

Figure.23. Représentation schématique des étapes de la sélection des marqueurs **.....37**

Figure.24. Exemple représentatif de l'approche protéomique pour l'étude du cancer du côlon.....**38**

Figure. 25. Schéma du principe de la migration IEF.....**41**

Figure .26. Schéma représente le principe de la digestion trypsique **42**

Figure.27. Spectre MS avec la sélection automatique des 8 précurseurs les plus abondants.....**42**

Figure.28. Analyse des protéines identifiées aux trois étapes.....**44**

Tableau

Tableau .1. Comparaison des techniques de découverte des biomarqueurs usuelles **23**

Tableau .2 . Concentration des principaux constituants de la sueur **30**

Tableau.3. Protéines différentiellement exprimées dans le cadre des cancers mammaires et caractérisées par différentes approches protéomiques **35**

Introduction

L'approche protéomique en clinique est une approche post génomique qui intéresse à l'étude du protéome, c'est-à-dire à l'ensemble des protéines constituant un organisme vivant dans sa globalité, un tissu, une cellule ou un compartiment cellulaire (ex: les protéines nucléaires, les protéines mitochondriales ,les protéines membranaires…) (Lehmann S.et al.,2007; Miguet L., 2006), met l'accent sur une description dynamique de la régulation cellulaire en décelant des événements moléculaires associés au développement de maladies (Deseny D.et al., 2009),elle vise aussi à établir l'identité, la quantité et la fonction de ces protéines, et à en déterminer l'expression en fonction des conditions environnementales (Miguet L., 2006). Elle est focalisée sur la découverte de nouveaux biomarqueurs, pour donner une information diagnostique, pronostique ou de suivi thérapeutique des pathologies humaines (Lehmann S. et al., 2007).

L'approche protéomique est composée de plusieurs étapes dans une première étape mettant en jeu la préparation d'échantillon (Fouillen L., 2009). L'électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer avec une haute résolution l'ensemble des protéines obtenues à partir d'extraits tissulaires ou cellulaires. L'identification des protéines séparées et la mise en évidence de leurs modifications post-traductionnelles peuvent ensuite être réalisées grâce à la spectrométrie de masse, applicable à des quantités infimes de protéines séparées. Enfin, l'utilisation de la bioinformatique permet une étude quantitative du niveau des protéines et la constitution de banques de données (Hondermarck H., 2001).

Le développement très rapide des méthodes de l'analyse protéomique s'oriente vers la mise au point de méthodes de séparation en HPLC ou en électrophorèse capillaire (en alternative à l'électrophorèse en 2D) couplées à la spectrométrie de masse, ou vers l'utilisation de biopuces à protéines. Certaines approches proposent d'ailleurs une stratégie en deux temps avec le fractionnement d'un mélange protéique à l'aide de biopuces suivi d'une analyse de chaque fraction en spectrométrie de masse (Porquet D.et al., 2004).

De nombreuses applications de la protéomique en biologie clinique sont en cours de développement, elles correspondent à des études à visée diagnostique ou à visée thérapeutique sur des agents pathogènes ainsi qu'à l'établissement d'outils diagnostiques (Porquet D.et al., 2004), dans le domaine de la santé, la protéomique s'est rapidement imposée comme un outil puissant à même de répondre à de multiples problématiques de recherche et de questions biologiques dans différents maladies, soit les maladies auto-immunes, pathologies cancéreuses, pathologies rénales, pathologies du système nerveux central (Solassol J.et al.,

2005; Thervet E., 2005; Ernoult E., 2011), aussi, l'utilisation de la protéomique dans le domaine de la biologie de la reproduction (Pineau C.et al., 2006).

L'objectif de ce mémoire donne un aperçu sur l'approche protéomique en clinique, décrire les principales techniques, outils de la protéomique et leur développement, et aussi améliorer nos connaissances sur quelques applications de protéomique dans le domaine de santé, biologie de la reproduction.

Chapitre I

Protéomique

La protéomique qui constitue l'analyse du protéome, regroupe plusieurs champs d'investigation qui ont un même objectif : obtenir une vision globale et intégrée des processus biologiques par l'étude globale des protéines d'une cellule plutôt que de chacune individuellement. Ceci inclut non seulement une identification des protéines exprimées mais aussi l'élucidation de leur fonction et de leur localisation, les interactions protéines-protéines ainsi que l'étude des modifications post-traductionnelles. La difficulté première de l'analyse d'un protéome est la nature même de l'échantillon étudié, qui est un mélange complexe de protéines. Ainsi, historiquement, l'analyse protéomique s'est appuyée sur la technique de séparation protéique la plus discriminante disponible, qui à l'époque était l'électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE) (Scheele G.A., 1975). Développée en 1970 cette technique permet de séparer efficacement les différentes protéines d'un extrait biologique. Dès ses premières applications, en 1975, elle mettait en évidence sa forte capacité résolutive s'illustrant par une carte protéique où s'individualisaient près de 1100 protéines majeures d'Escherichia coli (O'Farrell P.H., 1975) ou bien plusieurs centaines à partir de tissus de souris (Klose J., 1975). Dans le but de pouvoir identifier ces protéines, la première technique utilisée fut un séquençage protéique par dégradation d'Edman, technique fiable et automatisable mais lente et assez peu sensible (KiHan K. et al., 1977). Elle est désormais supplantée par une technologie plus rapide et beaucoup plus sensible, automatisable et adaptable à l'analyse haut-débit, la spectrométrie de masse qui est issue de l'analyse chimique. Elle permet d'obtenir la masse d'ions moléculaires, avec une précision inférieure au Dalton, et donc de discriminer des molécules de masses moléculaires même très proches (Tanaka K.et al., 1988 ; Fenn J.B. et al., 1989; Brosson D., 2006).

I.1. Définitions

I.1.1. Protéines

Une protéine est une macromolécule, formée d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés, qui résulte de la traduction d'un ARN messager lui-même issu de la transcription de l'ADN, la synthèse d'une protéine résulte donc directement de l'information génétique fournie par l'organisme (Fouillen L., 2009 ; Wilkins M.R. et al., 2006), la structure d'une protéine influe sur sa fonction, qui peut concerner des phénomènes biologiques tels que la catalyse, le transport, la communication, la signalisation ou encore la reconnaissance. D'autre part l'état physiologique des cellules et des tissus conditionne le type de protéines exprimées, leur abondance, leur état de modification post-transcriptionnelle en particulier les protéines dites

de ménage et souvent exprimées à haut niveau. Finalement, seulement 500 à 1 000 protéines sont caractéristiques d'un type cellulaire, donc si on considère qu'il y a environ 250 cellules hautement différenciées dans le corps humain, environ 100 000 protéines pourraient s'avérer intéressantes (Perrot A., 2017; Baudin B., 2015; DeRoux N., 2003) (Fig.1).

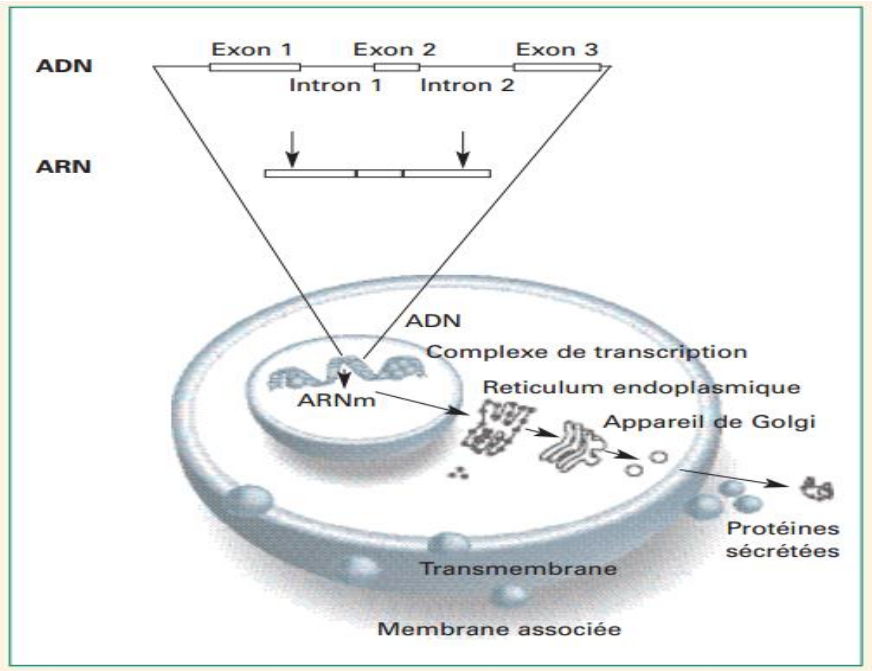

Figure1. Biosynthèse des protéines (Deroux N., 2003).

I.1.2. Protéome

Le mot protéome est apparu dans la littérature scientifique en 1995. Elle est défini comme étant l'ensemble des protéines présentes dans un échantillon biologique donné (liquide physiologique, tissus, organes, etc.) dans une situation physiologique ou pathologique donnée (Liuu S., 2014; Baillet A. et al., 2011 ; Pineau C., 2006). Par exemple, le protéome du foie sera différent avant ou après la prise d'un repas et il sera également dépendant de l'état de la fonction hépatique (fibrose, hépatite, etc.)(Gras D., 2005; Liotta L.A. et al., 2001). La diversité du protéome résulte premièrement de celle du génome à laquelle s'ajoute celle liée aux modifications des ARN (ARNm) et enfin, surtout aux modifications post-traductionnelles des protéines (clivage, glycosylation, phosphorylation, etc.). Alors que l'homme possède environ 30 000 gènes différents, le protéome est, quant à lui, constitué de plusieurs millions de protéines différentes. Son étude pourrait se révéler particulièrement utile dans des buts de diagnostic, de pronostic, de suivi, de détection des cibles thérapeutiques et dans la compréhension des processus pathogéniques (Baudin B. et Bruneel A., 2004). Notons que la

protéomique présente certains avantages par rapport aux approches génomiques, en particulier, l'information sur les taux d'ARNm n'est pas suffisante pour étudier et analyser la régulation de l'expression d'un gène dans la cellule (Baudin B., 2015; Gras D., 2005) (Fig.2).

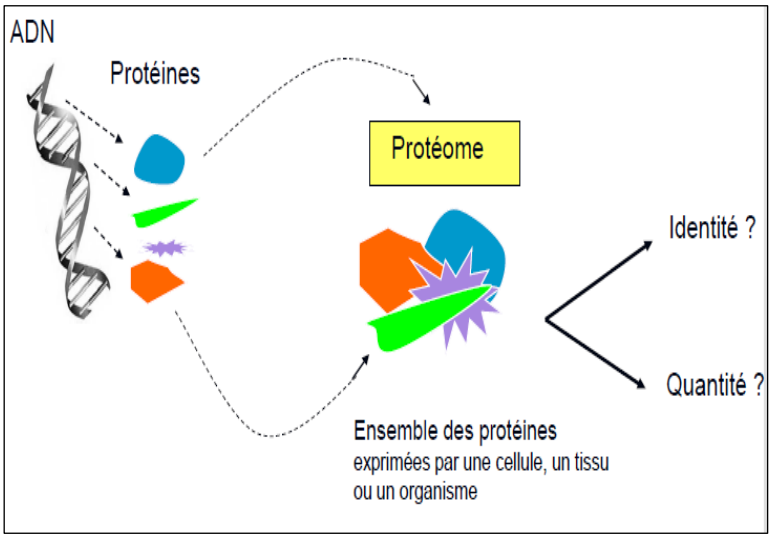

Figure 2. L'ensemble des protéines

I.1.3. Protéomique

La protéomique a été définie en 1998 comme la caractérisation des processus biologiques et le déchiffrage des mécanismes contrôlant l'expression génique par la détermination quantitative de l'expression des gènes au niveau protéique, le mot protéomique est un mot hybride associant protéine et le suffixe « ome » désignant un ensemble ou un système, comme l'ensemble des peptides et protéines codées par un génome à un instant donné et dans un environnement spécifique (Baudina B., 2011), depuis le concept a été étendu à l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un organite, d'un tissu ou d'un organisme entier (Liuu S., 2014; Lopez F. et al., 2005). La protéomique fait partie des approches dites post-génomiques (Com E. et Hondermarck H., 2007; Paladini D. et al., 2006), comme l'analyse des métabolites métabolomique, des interactions protéiques interactomique ou encore des lipides lipidomique. Contrairement au génome, le protéome d'une cellule ou d'un tissu est hautement dynamique puisqu'il évolue en fonction de son environnement (température, potentiel redox, stimuli émis par d'autres cellules… au niveau cellulaire ; stress, médication… au niveau d'un organisme) ou de la condition pathologique à un génome correspond une infinité de protéomes en évolution constante. Ces paramètres extérieurs influencent la complexité du protéome par la régulation au niveau transcriptionnel de l'expression des gènes et en modulant les modifications post traductionnelles des protéines , de plus l'analyse de la

totalité des protéines d'un milieu biologique est une gageure analytique en raison de la grande diversité des protéines (masse moléculaire de quelques acides aminés à plus de 500 kD, point isoélectrique, et surtout une vaste gamme de concentrations protéiques (Trocmé C. et al., 2011; Pineau C., 2006; Edelman A., 2005).

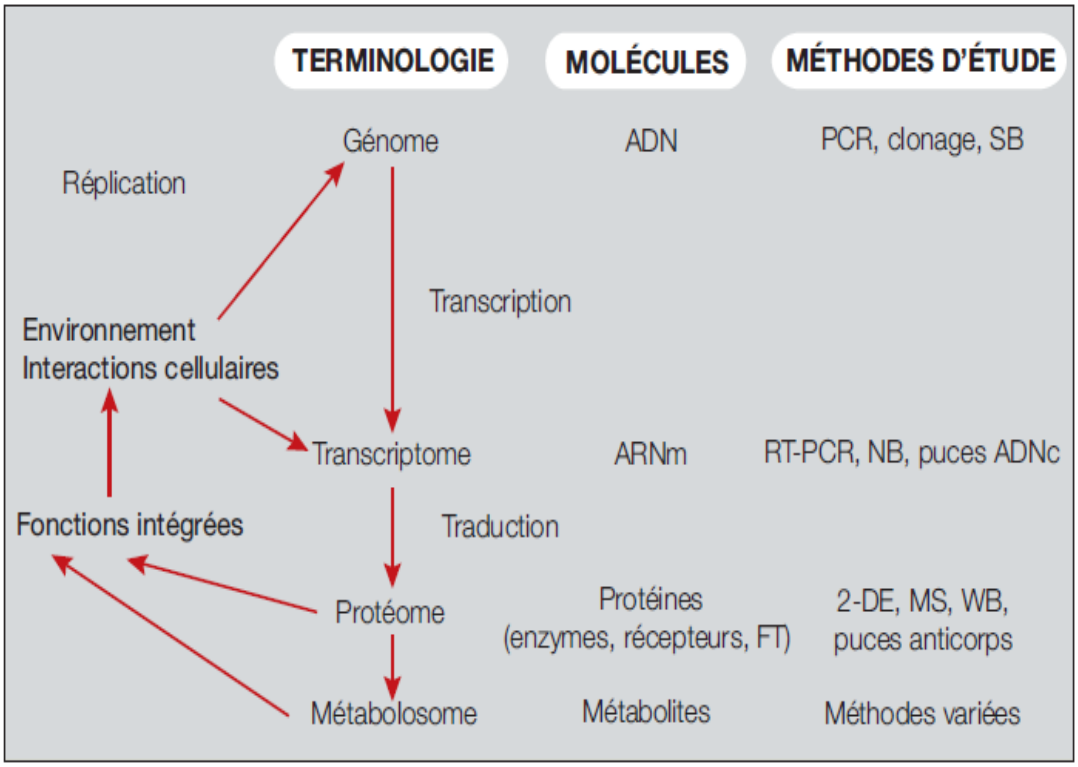

Figure 3. Du gène à la protéine et leurs méthodes d'analyse. PCR (Polymerase Chain Reaction) ; RT-PCR (Reversed Transcriptase - PCR) ; SB, NB et WB (Southern, Northern et Western-blot, respectivement) ; 2-DE (Electrophorèse bi-dimensionnelle) ; MS (Spectrométrie de Masse) ; FT (Facteur de Transcription) (Baudin B., 2011).

I.2. Types de protéomique

I.2.1. Protéomique différentielle

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 (Pineau C., 2006), il permettent d'établir une liste de protéines dont l'expression est variable : absence, sous- ou surexpression entre les deux conditions. Par exemple, ceci permet de définir des variations d'expression de protéines en fonction du stade de développement (Florens L. et al., 2002), en réponse à la présence de drogue ou à un stress environnemental, de façon générale cette approche permet d'éclairer sur les variations des

mécanismes physiologiques de la cellule en réponse directe à une situation donnée (Yin Z. et al., 2004; Hondermarck H., 2006; Brosson D., 2006).

I.2.2. Protéomique descriptive

La protéomique descriptive permettre de fournir une image de l'ensemble des protéines exprimées pour une cellule, un tissu ou un organisme donné (Solassol J. et al., 2011; Florens L. et al., 2002), et d'obtenir une vision globale des protéines exprimées par un type cellulaire pour des conditions données, mais elle peut aussi être appliquée non pas à une cellule entière mais à un compartiment cellulaire, ce qui constitue un sous-protéome c'est-à-dire l'ensemble des protéines contenues dans une fraction cellulaire (membrane, noyau, organelles, cytosol) ,tout compartiment de la cellule pouvant être purifié sans être altéré, peut être l'objet de ce type d'étude. En plus de fournir une image des protéines présentes dans un organite donné, ces études apportent une information sur la localisation des protéines identifiées, ce qui constitue une approche intéressante pour permettre l'attribution de fonction à des protéines hypothétiques. A contraire, l'identification de protéines à fonction connue, associées à certains organites permet de mieux comprendre le rôle de ceux-ci dans la biologie de la cellule, la protéomique descriptive permettent d'avoir, dans un contexte de post-génomique, un retour critique sur l'annotation des génomes séquencés. Ils permettent de valider l'existence d'un gène prédit et d'identifier des séquences codantes non prédites par l'annotation des génomes (Oshiro G. et al., 2002). Ils permettent aussi de résoudre certains problèmes de prédiction bioinformatique tels que le choix des limites des séquences codantes (notamment le choix de la méthionine initiatrice), ainsi que la prédiction d'éventuels séquences introniques (Brosson D., 2006).

I.2.3. Protéomique structurale

La protéomique structurale permettre de déterminer la relation entre la structure et la fonction d'une protéine, en particulier par la résolution de sa structure tridimensionnelle. Celle-ci est déterminée par des approches expérimentales, comme la radiocristallographie ou la spectrométrie à résonance magnétique nucléaire. Des travaux proposent des outils permettant de prédire une fonction protéique sur les bases de l'analyse de la comparaison de sa structure tridimensionnelle à celles connues (Jung J.W. et Lee W., 2004), cette structure peut être utilisée pour interroger les réseaux d'interactions protéiques permettant de valider les interactions proposées. Cependant, cette analyse n'est pas compatible avec des études à

grande échelle, malgré le développement de plateformes de cristallisation, des solutions sont proposées pour lever ce problème (Brosson D., 2006; Liu H.L. et Hsu J.P., 2005).

I.2.4. Protéomique fonctionnelle

Le but est de pouvoir élucider les interactions entre protéines, pour établir des réseaux d'interaction, de façon à mieux appréhender leurs fonctions et leurs régulations (Solassol J. et al., 2011), des technologies comme le double hybride ou les biopuces à protéines permettent de résoudre ces questions (Com E. et al., 2007; Service R.F., 2005), une technologie alternative, applicable aux organismes repose sur une stratégie par spectrométrie de masse permettant une analyse a posteriori de ces interactions. La protéine exprimée interagit dans la cellule de manière native avec ses partenaires et dans les bonnes conditions physicochimiques (localisation cellulaire respectée). Les complexes protéiques associés à la protéine marquée sont extraits et analysés par spectrométrie de masse (Hondermarck H., 2006; Brosson D., 2006; Gavin A.C. et al., 2002).

I.2.5. Analyse des modifications post traductionnelles

Une protéine n'est mature et active qu'après plusieurs étapes complexes de modifications post traductionnelles. Pouvoir obtenir des informations sur ces modifications est essentiel pour comprendre les régulations, la localisation et la fonction d'une protéine (Delcourt N., 2007). Actuellement, le grand intérêt porté à l'étude de ces modifications a conduit à envisager leur analyse pour l'ensemble du protéome dans le but d'obtenir une vision globale des régulations cellulaires. On parle donc, par exemple, de glycoprotéomique pour désigner l'analyse de l'ensemble des glycoprotéines de la cellule, et de phosphoprotéomique pour l'étude des protéines phosphorylées. Plusieurs stratégies ont été proposées pour mener ces études. D'une part, des protocoles d'extractions permettent d'enrichir un extrait protéique en protéines porteuses d'un type de modification (Tajiri M. et al., 2005). D'autre part, ces modifications sont appréhendées directement par spectrométrie de masse dont la sensibilité permet d'en déterminer avec précision la nature. Mais cela nécessite le développement de protocoles préparatoires et d'identification spécifiques (Brosson D., 2006; Sagi D. et al., 2005).

I.3. Principe de l'analyse protéomique

I .3.1. Préparation d'échantillons biologiques

La protéomique, plus que toute autre approche nécessite de travailler sur des échantillons biologiques de qualité. L'extraction de protéines à partir d'un mélange complexe (biopsie cellulaire, cellules isolées, liquide physiologique...) est réalisée à l'aide de tampons appropriés et dépend de la nature des protéines (protéines cytosoliques, membranaires, nucléaires...) (Miguet L., 2006), l'objectif étant de maintenir les protéines extraites en solution en préalable à leur séparation. Les tampons d'extraction sont ainsi constitués, sur une base saline (Tris, Hepes), de mélanges d'agents réducteurs, chaotropes, de détergents, voire de solvants organiques, et ceci dans des proportions variables. Ils sont généralement supplémentés d'inhibiteurs de protéases et leur pH est ajusté de manière appropriée. Il n'existe pas de tampon générique pour l'extraction de telle ou telle classe de protéines. Les facteurs pouvant altérer la qualité de l'échantillon sont nombreux. (Rabilloud T. et al., 1997; Pineau C., 2006).

I.3.2. Fractionnement d'extrait protéique

Le fait de fractionner l'extrait protéique est une étape essentielle lorsque l'échantillon est très complexe, comme c'est le cas avec un extrait cellulaire, le fractionnement a pour but la réduction de la complexité des échantillons, ceci permet ainsi d'accéder à un plus grand nombre de protéines pour l'analyse protéomique car il y a une concentration des protéines moins abondante dans les fractions, le fractionnement peut se faire par centrifugation différentielle, par élimination des protéines les plus abondantes, par électrophorèses (Anastácio A., 2014 ; Matondo M ., 2008).

I.3.3. Séparation

I.3.3.1. Electrophorèse bidimensionnelle

Bien que de nouvelles technologies de spectrométrie de masse permettent de s'affranchir de la séparation des protéines sur gel, vers une protéomique sans électrophorèse, celle-ci reste encore pour la majorité des études une étape cruciale, la séparation la plus résolutive couramment utilisée est l'électrophorèse bidimensionnelle où les protéines sont séparées dans un premier temps selon leur point isoélectrique lors de l'isoélectrofocalisation

(ou IEF), puis selon leur masse (SDS-PAGE) (Aubry M A., 2000). Cependant, depuis sa mise au point en 1975 par O'Farrell PH, cette technique a connu des apports non négligeables. L'un d'entre eux a été l'utilisation de gel d'isoélectrofocalisation à gradient de pH immobilisé, permettant d'obtenir une bonne reproductibilité entre plusieurs gels (Bjellqvist B. et al., 1982 ; Gorg A. et al., 2000) (Fig.4).

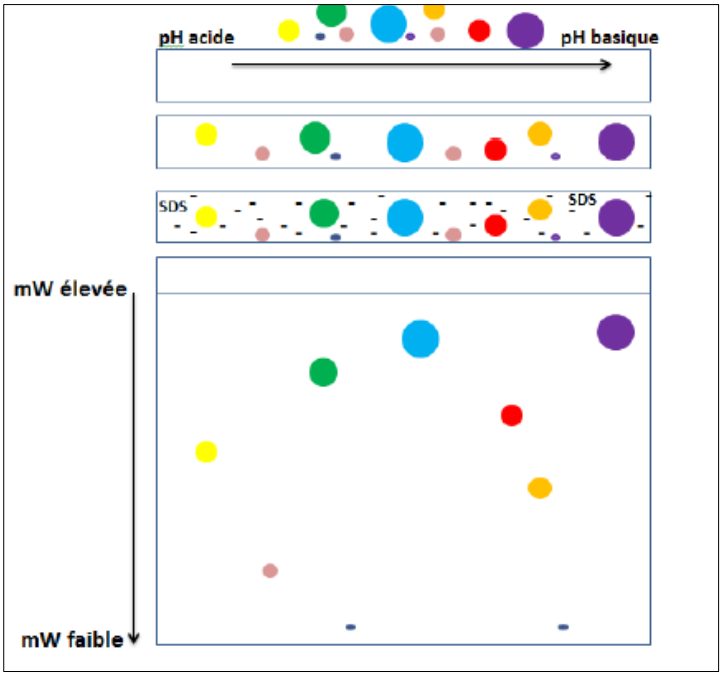

Figure 4. Schéma de la 2D SDS-PAGE (Smine S., 2017).

a) Électrofocalisation

Il s'agit de la séparation basée sur la focalisation isoélectrique, soit le point isoélectrique de la protéine, qui se fait sur une bandelette composé d'un gel de polyacrylamide à gradient de pH fixe strip IPG (Hirtz C., 2005). Dans cette approche les protéines migrent au long de la strip, qui est sous courant, jusqu'à atteindre l'endroit correspondant à leur point isoélectrique où elles restent immobilisées, cette électrolocalisation peut être également réalisée en phase liquide. En phase liquide, des coupelles (en nombre voulu par rapport à la taille de la strip) sont superposé à la strip et la migration se fait par sortie et entrée dans les coupelles mais avec le même principe qu'in gel, cependant à la fin les protéines sont récupérées en phase liquide (Anastácio A., 2014).

b) SDS PAGE

L'électrophorèse se base sur le principe de mobilité de molécules soumises à une charge électrique. Selon les caractéristiques des molécules telles que la charge et leur masse (Fabien B., 2008), la nature du support de migration et les conditions physicochimiques la vitesse de migration varie, permettant ainsi la séparation des différentes molécules, dans cette approche, l'extrait protéique est dans une solution en présence d'un agent dénaturant le SDS qui se lie aux protéines et leur confère, en proportion avec le poids moléculaire, une charge négative. L'extrait protéique est chargé sur un gel composé de polyacrylamide, sous l'influence d'un courant électrique, les complexes SDS-protéines migrent dans le gel en fonction de leur poids moléculaire et se séparent en formant des bandes le long de la piste de migration. Une bande peut contenir une ou plusieurs protéines ayant des masses moléculaires proches (Anastácio A., 2014) (Fig.5).

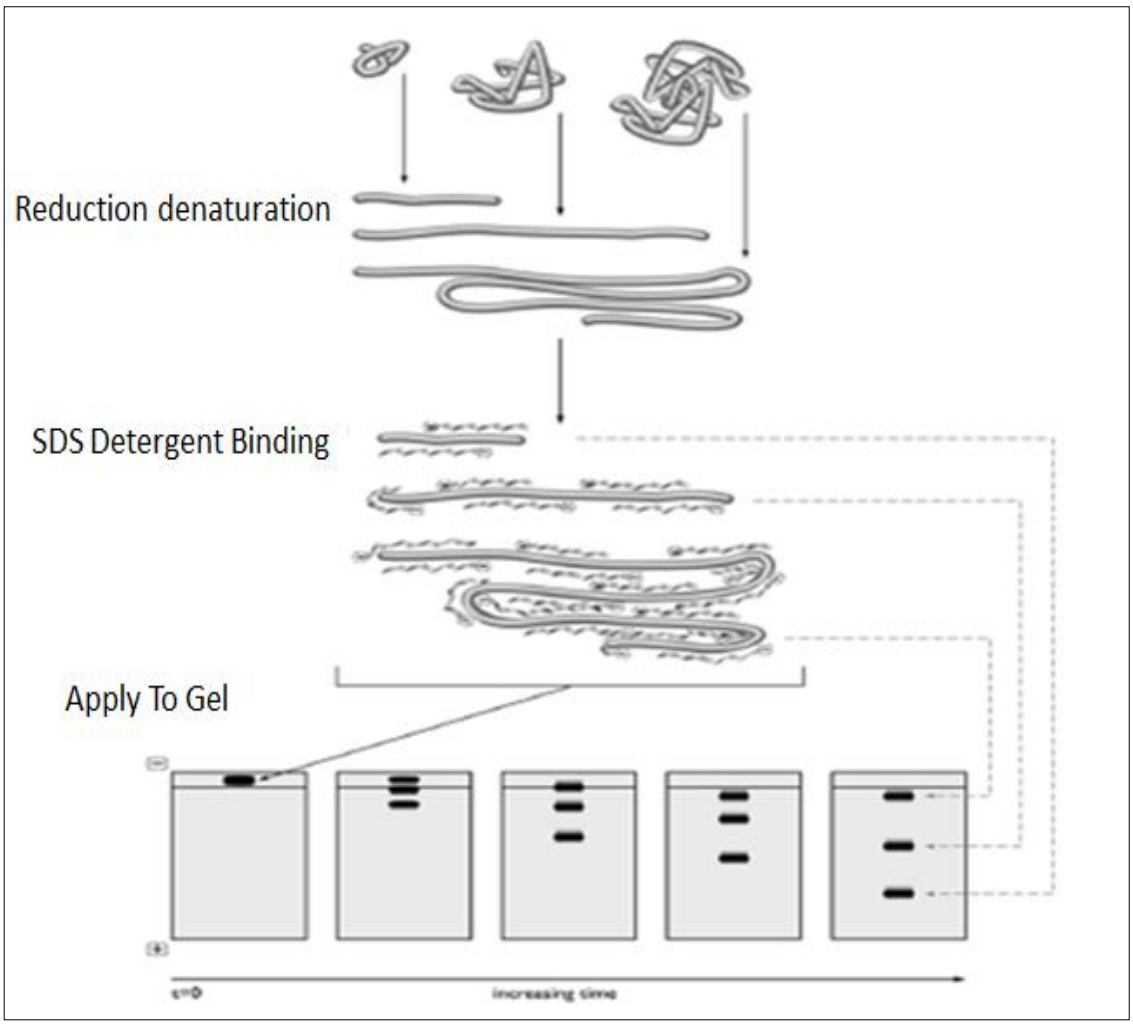

Figure 5. Représentation du principe d'un gel 1D SDS-PAGE (Liebler D.C., 2002)

I.3.3.2. Visualisation des spots protéiques

La dernière étape de l'électrophorèse consiste à détecter les spots protéiques par coloration des gels, plusieurs procédés de sensibilité différente existent et sont choisis en fonction de l'utilisation ultérieure des gels 2D, le bleu de coomassie permet de détecter un minimum de 100 ng de protéine par spot et présente l'avantage de donner une intensité de coloration proportionnelle à la quantité de protéines, la coloration au nitrate d'argent est, quant à elle, jusqu'à mille fois plus sensible et permet de détecter des spots contenant 0,1 ng de protéines, elle présente néanmoins certains inconvénients : la stoechiométrie de la coloration n'est pas totalement linéaire, la reproductibilité est difficile à obtenir et certaines protéines sont peu ou pas colorées par cette méthode. Les protéines peuvent aussi être visualisées par des colorants fluorescents (CyDyes, SYPRO Ruby) (Fabien B., 2008; Rabilloud T. et al., 2001) dont la sensibilité, moins de 1 ng de protéine par spot, est bien supérieure au bleu de coomassie, et dont la linéarité est maintenue sur plus de trois puissances de dix (Brosson D., 2006).

I.3.3.3. Traitement informatique des images 2D-PAGE

Le traitement informatique des images 2D-PAGE selon la technique de visualisation employée et de numérisation des gels, l'image obtenue nécessite une étape plus ou moins complexe de traitement graphique pour réduire le bruit de fond, éliminer les rayures et accroître le contraste, l'image obtenue est ensuite traitée par des logiciels d'analyse d'images 2D tels que Melanie (Amersham Biosciences) ou PD-Quest (BioRad) (Pineau C., 2006). Ils permettent un prétraitement automatisé des spots et de leur quantification, mais cette étape doit être complétée manuellement pour référence le gel coloré. Ensuite, chaque spot d'un gel peut être associé à son équivalent sur un autre gel pour constituer un gel virtuel de référence, cette étape, assistée par le logiciel, nécessite le positionnement manuel de repaires invariants d'un gel à l'autre, à partir desquels le logiciel associe les autres spots, la comparaison entre gels de référence permet d'identifier des variations qualitatives et quantitatives entre les profils protéiques (Brosson D., 2006).

I.3.3.4. Chromatographie liquide

Une alternative à la séparation des protéines par électrophorèse sur gel est la séparation par chromatographie liquide (Bœuf A., 2013), la chromatographie liquide a comme principe la séparation des composés entrainés par un liquide (phase mobile) à travers un

solide (phase stationnaire) qui lui, est normalement fixé à une colonne appelé colonne chromatographique (Link A.J., 1999), la séparation se réalise selon les interactions chimiques ou physiques des molécules avec la phase mobile ainsi qu'avec la phase stationnaire, cette séparation peut se faire avec une colonne chromatographique c'est à dire 1D ou ayant recours à deux colonnes chromatographiques séquentielles 2D (Anastácio A., 2014; Aubry M.A., 2000).

I.3.4. Identification des protéines par spectrométrie de masse

I.3.4.1. Définition de la technique

La spectrométrie de masse permet de transformer des molécules en ions à l'état gazeux et d'obtenir leur masse moléculaire (m) en analysant le rapport de leur masse sur leur charge (z), noté m/z, ce rapport m/z des ions formés à partir de l'échantillon est mesuré par un spectromètre de masse (Liuu S., 2014 ; Besson D., 2013). L'analyse de la masse se divise en deux catégories suivant la technique utilisée conduisant soit à l'obtention de la masse de chaque peptide trypsique (spectrométrie de masse de type MS), soit de la masse de ces peptides associée à une séquence partielle (spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS) (Anastácio A., 2014; Brosson D., 2006) (Fig.6; 7; 8).

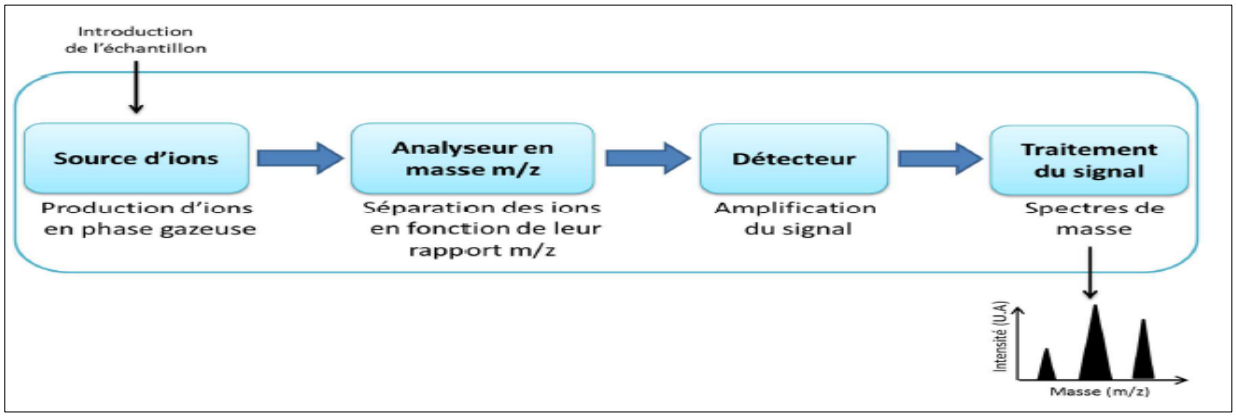

Figure 6. Structure de base d'un spectromètre de masse de type MS (Anastácio A., 2014).

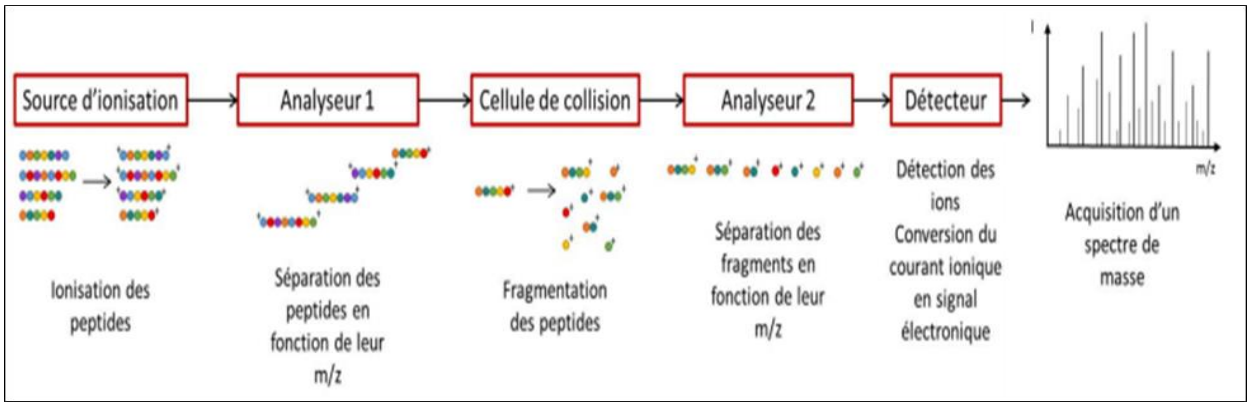

Figure7. Représentation schématique des différentes parties composant un spectromètre de masse en tandem ou MS/MS (Benhaim M., 2017).

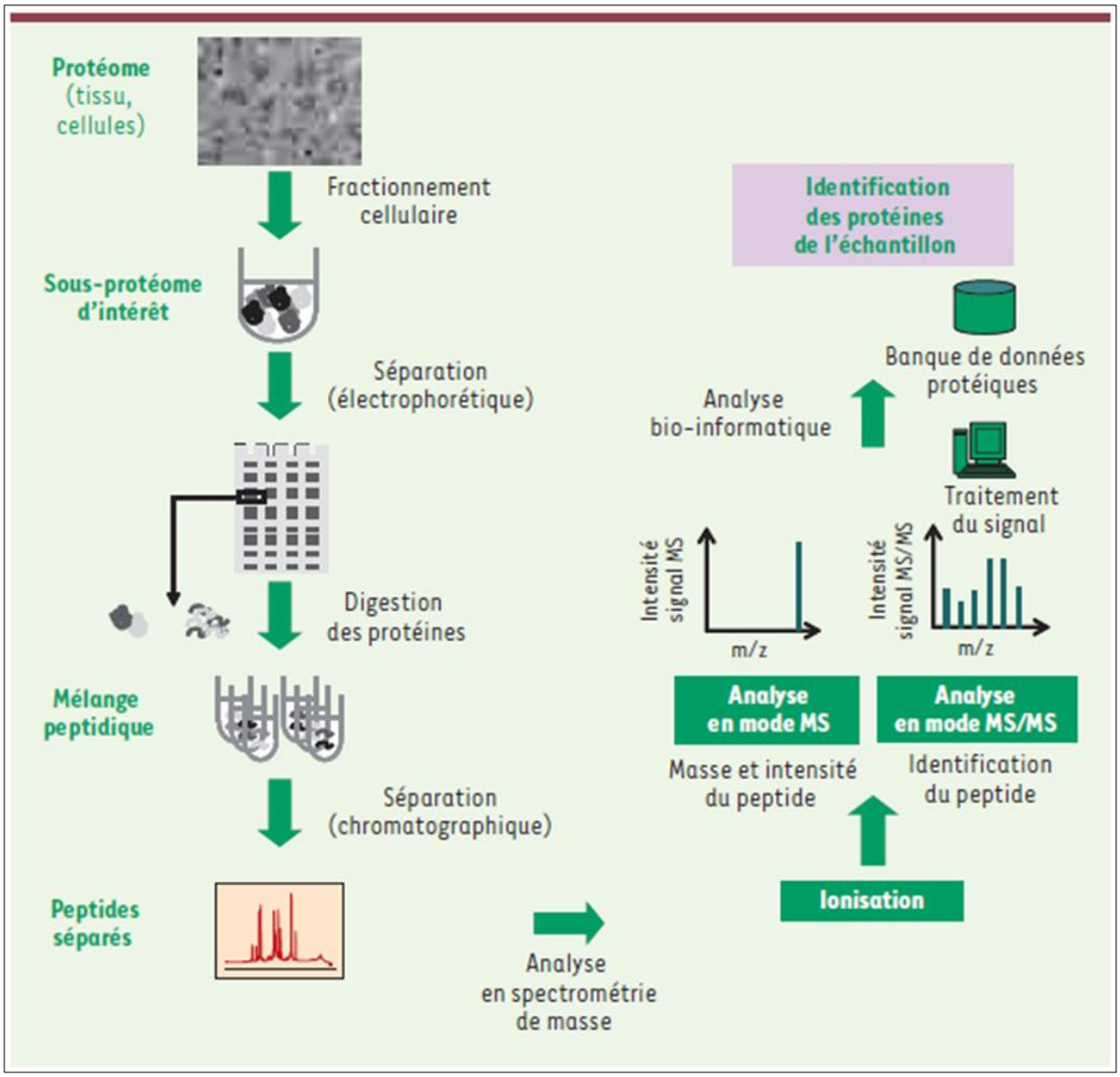

Figure 8.Déroulement d'une analyse protéomique basée sur la spectrométrie de masse (Emadali A. et al., 2009).

I.3.5 Analyse bioinformatique

Quelles que soient les méthodes utilisées, toute analyse protéomique par spectrométrie de masse a besoin d'outils informatiques puissants pour analyser et valider les données, ainsi les bases de données telles que SwissProt et trEMBL utilisées pour l'identification des protéines sont consultées via des logiciels dédiés tels que MASCOT, Sequest, XTandem (Matondo M., 2008), ces logiciels comparent les masses des peptides obtenues avec les masses théoriques des peptides présents dans les bases de données, d'autres outils sont également a posteriori nécessaires pour approfondir l'étude des informations obtenues, comme la classification des protéines selon leur fonction biologique et/ou moléculaire, selon leurs interactions entres elles ou avec d'autres molécules et leur rôle dans les voies de signalisation entre autres. Ceci est possible grâce à des logiciels qui compilent toutes les informations publiées sur chaque protéine et qui croisent ces informations de façon à relier certaines protéines entre elles (Anastácio A., 2014; Bouttes C., 2005).

I.4.Amélioration de technique et haut débit

I.4.1. Amélioration de la protéomique basée sur la 2D PAGE

Les limitations de la protéomique basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle se situaient, jusqu'à la fin des années 90, au niveau du nombre de protéines résolues sur les gels 2D-PAGE, ainsi que sur la reproductibilité d'un gel à l'autre. Des travaux ont été entrepris pour optimiser chaque étape du processus.

I.4.1.1. Des évolutions concernant l'extraction protéique

Concernant l'extraction protéique, l'un des biais qui apparaît dans des conditions compatibles avec l'électrophorèse bidimensionnelle est la sous-représentation des protéines membranaires, dans la mesure où elles sont difficiles à solubiliser sans interférer avec leur point isoélectrique, c'est pourquoi de nouveaux détergents, non ioniques, ont été développés, des études comparatives ont été menées d'où il ressort que les détergents de la famille des sulfobétaines, en combinaison avec de l'urée et de la thiourée, sont les plus efficaces pour solubiliser des protéines très hydrophobes comme les protéines transmembranaires (Molloy M.P., 2000), cependant, il est important de noter que l'efficacité d'un composé plutôt qu'un

autre dépend à la fois de la nature des protéines et des constituants lipidiques de l'échantillon, il ne s'agit donc pas d'utiliser un détergent universel pouvant extraire toutes les protéines membranaires, mais plutôt d'effectuer plusieurs extractions avec différents détergents, de manière à élargir le panel de protéines solubilisées, cette stratégie d'extraction protéique par traitements successifs n'est pas applicable uniquement aux protéines membranaires mais peut être utilisée pour solubiliser n'importe quelle protéine difficile à extraire (Luche S. et al., 2003).

I.4.1.2. Des évolutions concernant la technologie 2D-PAGE

L'une des évolutions les plus significatives de la technologie 2D-PAGE fut le développement de gel de première dimension à gradient de pH immobilisé (IPG), il s'agit d'un gel où sont co polymérisés des dérivés d'acrylamide comportant des groupements à effet tampon avec une matrice de polyacrylamide, les groupements chargés participant à la mise en place du gradient de pH, sont fixés au gel et permettent une focalisation précise des protéines tout en évitant les problèmes de dérive associés aux techniques plus anciennes, la commercialisation de ce type de gel d'IEF a permis l'essor de la technique 2D-PAGE autorisant une haute reproductibilité d'un gel à l'autre (Molloy M.P., 2000). De plus, ce type de gel autorise le dépôt de quantité importante de protéines (jusqu'à 5 mg pour des gels de 18 cm) permettant ainsi de visualiser des protéines peu abondantes. Dans le but de séparer des spots protéiques avec une très haute résolution, des gels IPG ont été développés avec des gammes de pH réduites, ces gels permettent de séparer les protéines sur quelques unités de pH (régions acide, neutre ou basique), ou bien désormais sur une seule unité de pH disponible sur l'ensemble de la gamme (de pH=3 à pH=11) (Brosson D., 2006; Gorg A. et al., 2000).

I.4.1.3. Des évolutions concernant les colorants

De nouveaux types de coloration ont également accru la résolution des spots protéiques, il s'agit de fluorophore avec une sensibilité de coloration presque équivalente à celle de l'argent et une linéarité d'intensité, une reproductibilité, une facilité et une rapidité proche de la coloration au bleu de coomassie ,l'intégration de ces technologies a permis le développement de plateformes entièrement automatisées qui prennent en charge un échantillon protéique de l'extraction à l'analyse et l'identification des spots protéiques. Le gain de temps qui en découle, la très bonne reproductibilité de ces analyses permettent donc

d'envisager une analyse protéomique à haut débit bien que basée sur des électrophorèses bidimensionnelles (Brosson D., 2006; Rabilloud T. et al., 2001).

I.4.2.Vers une protéomique sans électrophorèse

Bien que les techniques aient fortement été améliorées pour une meilleure reproductibilité et un meilleur isolement des protéines, l'analyse protéomique par gel 2D-PAGE se heurte encore aux limitations associées à la séparation des protéines sur gel, les protéines faiblement ou moyennement exprimées sont en effet rarement détectées en raison de leur concentration se situant aux limites de détection des colorations (Gygi S.P. et al., 2000), elles sont souvent masquées par des protéines plus fortement exprimées, de plus, les techniques d'extraction biaisent les analyses en provoquant une forte sous-représentation des protéines les moins solubles et des protéines basiques, difficiles à séparer. Pour pallier ces défauts, une stratégie d'identification s'affranchissant totalement de la séparation 2D-PAGE a été développée, il s'agit d'une colonne de chromatographie liquide (LC) en phase inverse directement couplée en ligne à un spectromètre de masse de type ESI-MS/MS, l'analyse porte sur un échantillon protéique qui est digéré par la trypsine, séparé par chromatographie liquide puis analysé par le spectromètre de masse. L'évolution de cette technologie repose sur l'adjonction d'une chromatographie en phase liquide bidimensionnelle, qui permet une séparation plus précise des peptides. Cette technologie, dite MudPIT ou Shotgun (Brosson D., 2006; Link A.J. et al., 1999).

Récemment, il existe quelques nouvelles technologies:

A. Approche AMT

L'Approche AMT (Accurate Mass and Time) apparaît comme une technique de choix pour la découverte des biomarqueurs puisqu'elle permet de caractériser le protéome en profondeur et de quantifier une grande variété de protéines à partir d'échantillons complexes tels que les fluides biologiques ou les tissus, sans aucun fractionnement préalable, cette méthode ne se base pas sur le nombre de spectres obtenus mais sur l'intensité des signaux des spectres MS et particulièrement sur l'intensité du courant ionique total d'un peptide, un peptide ionisé se caractérise par trois paramètres, son rapport masse sur charge, son intensité et son temps de rétention. Avec ces données, il est possible de comparer l'intensité d'un ion présentant un temps de rétention et un rapport m/z donnés, il a été montré qu'il existe une corrélation entre l'intensité du signal et la concentration ionique, l'aire du pic

chromatographique d'un peptide identifié augmentant avec la concentration du peptide injecté (Smine S., 2017; Court M., 2014) (Fig.9).

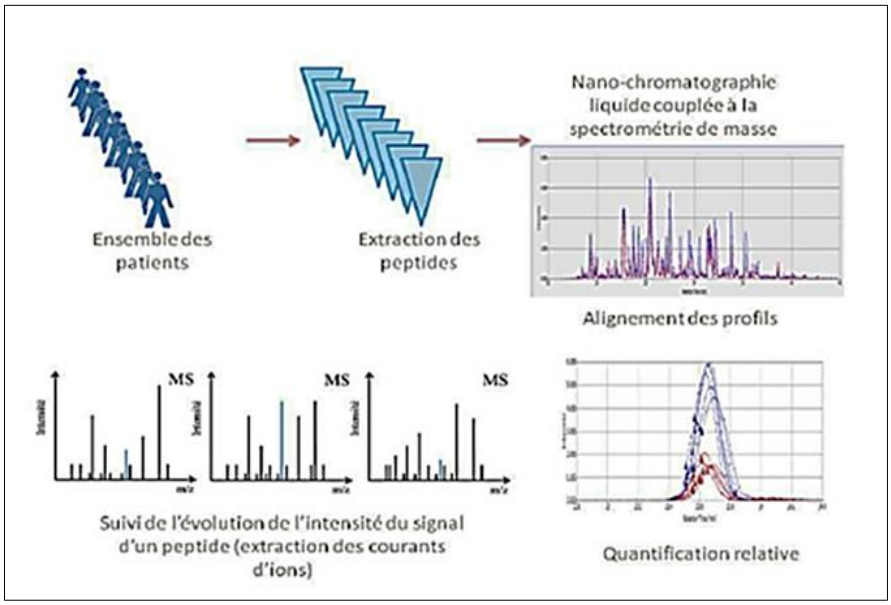

Figure9. Principe de l'approche AMT (Smine S., 2017).

B. SELDI-ToF

La plate-forme SELDI-TOF (surfaced-enhanced laser desorption/ionization time of-flight) présente de nombreux avantages par rapport aux autres techniques, notamment en raison de sa simplicité d'utilisation, de sa sensibilité et de sa capacité d'analyse à haut débit des échantillons, cette technique permet la séparation, la détection et l'analyse de protéines, directement à partir de l'échantillon biologique avec une sensibilité. Elle est toutefois limitée par la gamme de masse protéique analysable, avec une très bonne détection pour les protéines inférieures à 20-30 kDa et une sensibilité moindre pour les protéines de plus hautes masses. En combinant les différentes surfaces chromatographiques disponibles, on obtient une vue d'ensemble des peptides et des protéines présents dans un échantillon donné (Solassol J. et al., 2005) (Fig.10).

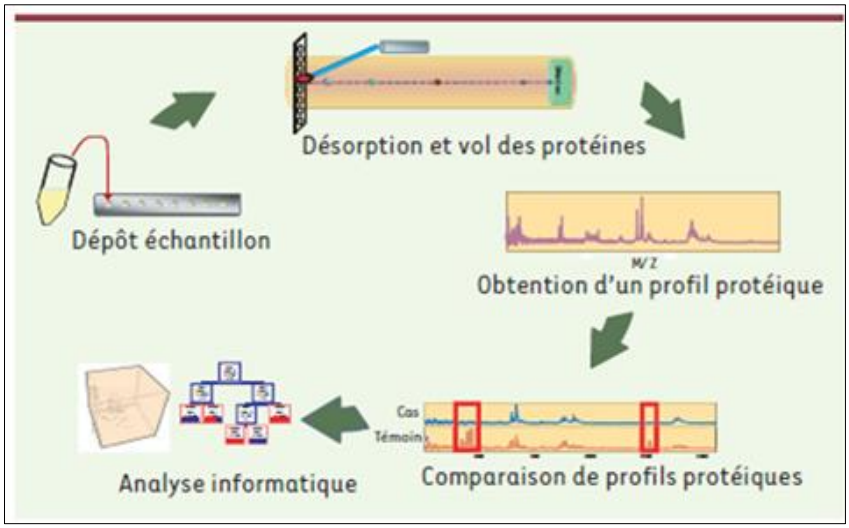

Figure10. Principe de la technologie SELDI-TOF (Solassol J et al,. 2005).

C. Marquage isotopique ICAT

La technologie ICAT fut la première technologie de protéomique quantitative développée sur la base d'une séparation chromatographique de peptides marqués et d'une analyse par spectrométrie de masse en tandem. Consiste à utiliser des étiquettes (tags) isotopiques distinctes pour marquer spécifiquement par liaison covalente les cystéines des protéines issues de deux échantillons à comparer. L'avantage majeur de cette technique résulte dans la possibilité de quantifier les protéines venant de deux échantillons distincts au cours d'une même analyse nanoLC-MS. Les peptides pour lesquels une expression différentielle est mise en évidence sont ensuite fragmentés par MS/MS en vue de leur identification (Burat B., 2017; Pineau C., 2006) (Fig. 11).

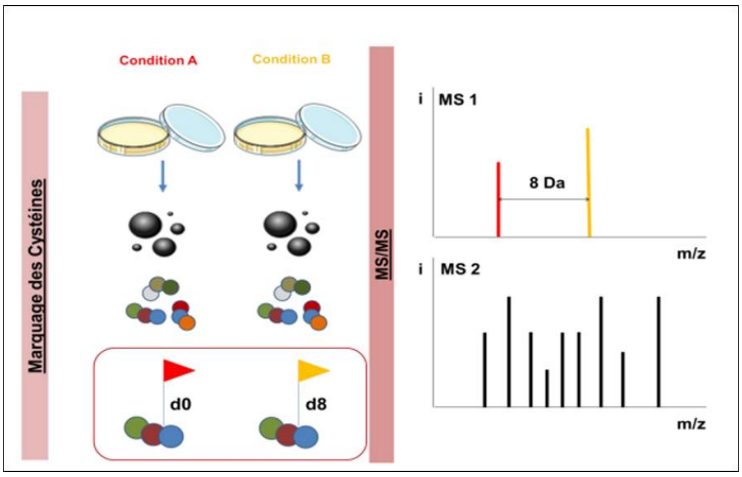

Figure11. Principe de l'ICAT (Burat B., 2017).

D. Technologie SILAC

La technologie SILAC ou « Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture » fait évoluer le marquage isotopique vers un marquage métabolique, Celle-ci est uniquement utilisable sur des cellules en culture dans la mesure où elle repose sur l'incorporation aux protéines de l'échantillon d'acides aminés essentiels non synthétisables par les cellules et porteurs d'éléments radioactifs (deutérium 2H, 13C, 15N). Le marquage SILAC ne fait donc pas intervenir de tags à proprement parler mais un approvisionnement différentiel des cellules en croissance en acides aminés essentiels (non synthétisés par l'organisme modèle) enrichis en isotopes lourds selon les deux conditions expérimentales distinctes étudiées (Burat B., 2017; Pineau C., 2006).

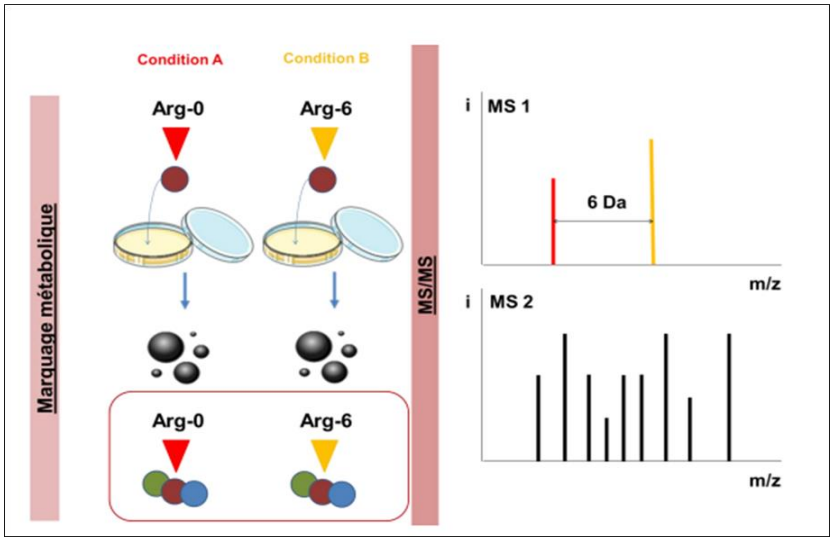

Figure12. Principe du SILAC (Burat B., 2017).

Chapitre II

Applications de la protéomique en clinique

Ce chapitre parle sur la protéomique clinique, qui a débuté par la publication en 1986 d'une étude en électrophorèse bidimensionnelle (2D) visant à comparer des échantillons de liquide céphalorachidien (LCR) de patients atteints de maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) avec ceux de témoins et de patients atteints d'autres affections neurologiques (Harrington MG., 1986). Quatre ans plus tard la publication, sur deux cas clinique, de la détection de deux de ces protéines. Ce n'est qu'en 1996 qu'une étude d'un autre groupe, confirme statistiquement sur un grand nombre de patients l'intérêt de la détection, en 2D, de ces protéines pour le diagnostic des MCJ (Lehmann S. et al., 2007), aussi dans ce chapitre présentons les biomarqueurs qui étant défini comme un paramètre phénotypique mesurable permettant de différencier l'état malade et l'état sain d'un individu, principales caractéristiques et types des biomarqueur, les fluides biologiques tel que le sang, le liquide céphalorachidien, l'urine, la sueur. Enfin, présentont les applications de la protéomique clinique dans plusieurs domaines.

II.1. Définition de protéomique clinique

La protéomique clinique est un domaine récent qui recouvre donc la découverte et la quantification de biomarqueurs, présents dans les fluides biologiques tels que le sang et le liquide céphalorachidien, s'intéresse à l'étude du protéome pour la recherche des marqueurs diagnostiques, pronostiques et de suivi thérapeutique des pathologies humaines (Bros P., 2016). 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 (Court M., 2014).

II.2. Biomarqueurs

II.2.1. Définition des biomarqueurs et leurs principales caractéristiques

La définition générale d'un biomarqueur est une caractéristique définie et mesurée en tant qu'indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogènes ou d'une réponse à une exposition ou une intervention, cependant ils ne sont pas un concept nouveau même s'ils n'étaient pas utilisés sous cette dénomination et de manière aussi fréquente dans le passé (Besson D., 2013; Li-Thiao-Té S., 2009). Ainsi, les biomarqueurs les plus accessibles et

les plus connus sont sans doute les paramètres physiologiques, biochimiques ou moléculaires qui peuvent être détectés dans un tissu ou un fluide biologique (Romanetto J., 2011). Les biomarqueurs représentent aujourd'hui un domaine vaste puisqu'ils se présentent sous différentes formes physiques et biologiques et couvrent différents domaines d'application aussi bien au cours du développement pharmaceutique que dans la médecine clinique (Dehoux M. et al., 2013).

Les principales caractéristiques d'un biomarqueur idéal selon Clerico A. et al., 2009 sont:

- Spécificité optimale d'organe ou de tissu.
- Bonnes performances diagnostique et pronostique.
- Praticabilité (acceptable pour le patient).
- Stabilité in vivo et in vitro.
- Variation biologique minimale.
- Valeurs de référence et seuils décisionnels pour des sous populations (âge, sexe, etc.).
- Qualités analytiques : bonne sensibilité analytique (sensibilité fonctionnelle) précision et justesse, automatisation, standardisation, cout peu élevé et rapport bénéfice /cout favorable.

II.2.2.Techniques appliquées pour l'étude différentes types des biomarqueurs

En fonction de la nature du biomarqueur recherché, peuvent être appliquées des techniques de génomique, de transcriptomique, de protéomique ou de métabolomique, de ce fait on parle de biomarqueurs génomiques fondés sur l'ADN, de biomarqueurs transcriptomique fondés sur l'ARNm, de biomarqueurs protéomique fondés sur les protéines ou de biomarqueurs métabolomique pour les métabolites (Romanetto J., 2011 ; Spyratos F., 2004) (Tableau.01).

Tableau 01. Techniques de découverte de différentes types de biomarqueurs usuelles (Romanetto J ., 2011).

	Biomarqueur génomique	Biomarqueur transcriptomique	Biomarqueur protéomique	Biomarqueur métabolomique
Technique à bas débit	Technique de séquençage	PCR Nothern blot		RMN Chromatographie en phase gazeuse
Technique à moyen débit	Spectrométrie de masse	SAGE	Spectrométrie de masse ELISA	Chromatographie liquide /Spectrométrie de masse
Technique à haut débit	PCR	Puce à ADN	Puce à protéines Puce à anticorps	

II.2.3. Biomarqueurs protéomique

Le protéome est l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule, une partie d'une cellule (membranes, organites) ou un groupe de cellules (organe, organisme) dans des conditions données et à un moment donné. Contrairement au génome qui est identique dans la plupart des cellules, le protéome est dynamique (Baudin B., 2015 ; Gras D., 2005), des groupes de protéines différents sont produits en fonction de la lignée cellulaire et du stade de développement de la cellule, le protéome est également influencé par l'environnement externe. La protéomique étudie alors les variations des taux d'expressions des différentes protéines en fonction du temps, de leur environnement, de leur état de développement, de leur état physiologique et pathologique de l'espèce d'origine. Elle étudie aussi les interactions des protéines avec leur environnement. Les biomarqueurs protéomiques font partie des biomarqueurs les plus courants et les plus anciens. Leur mise en évidence peut se révéler complexe et utilise le plus fréquemment des techniques d'immunodosage, le développement des antigènes et des anticorps spécifiques de la protéine détectée est une étape supplémentaire dans le développement de ces biomarqueurs protéomiques (Romanetto J., 2011).

II.2.4.Validation clinique d'un biomarqueur

Ont décrit un processus complet et détaillé de la validation de biomarqueurs à travers quatre étapes successives (Rifai N., Gillette M.A., et Carr S.A., 2006) : (i) l'étape de découverte des candidats vise à identifier des biomarqueurs potentiels, par analyse

différentielle semi quantitative (quantification comparative) entre différents états (sain et malade), (ii) l'étape de qualification consiste en la vérification d'une abondance différentielle des protéines entre les différentes populations (malades et contrôles), (iii) l'étape de vérification consiste en la vérification de la spécificité du biomarqueur à la pathologie étudiée. et enfin (iv) l'étape de validation des candidats biomarqueurs consiste à établir la spécificité et la sensibilité des candidats biomarqueurs, la taille des cohortes et donc le nombre d'échantillons requis croit au fur et à mesure de l'avancement des candidats biomarqueurs au travers des différentes étapes de découverte, de qualification, de vérification et de validation.. En effet, un pouvoir statistique de plus en plus discriminant est nécessaire pour établir des preuves de spécificités et de sensibilités, ce qui induit un nombre de patients à doser de plus en plus important. Parallèlement, le nombre de candidats biomarqueurs diminue à mesure que l'on avance dans le processus puisque l'on élimine les biomarqueurs non spécifiques ou peu sensibles (Court M., 2014 ; Thygesen K. et al., 2010) (Fig.13).

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 et (iii) la variabilité des individus et des pathologies. Aujourd'hui, aucune technique analytique utilisée seule n'a la capacité de surmonter ces trois obstacles simultanément. Ainsi, les approches expérimentales combinées à des outils analytiques adaptés sont propres à chaque phase du processus de développement des biomarqueurs (Court M., 2014 ; Thygesen K. et al., 2010).

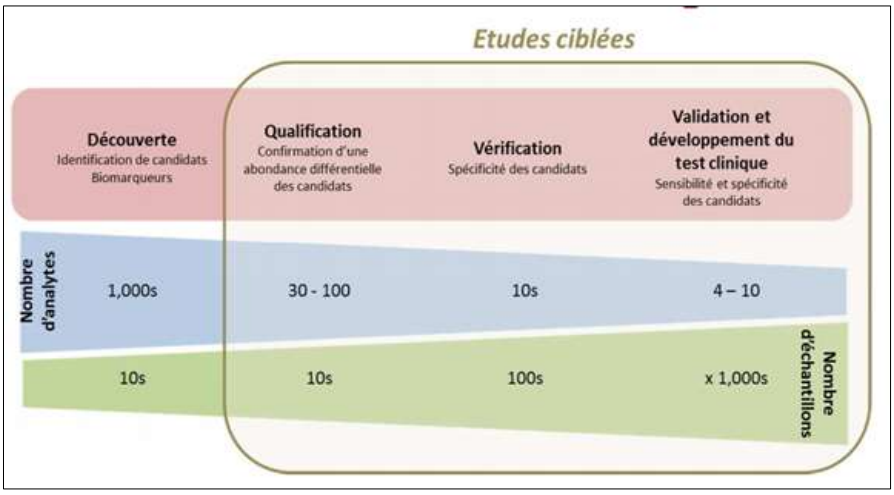

Figure13. De la découverte à la validation d'un candidat biomarqueur (Court M., 2014).

II.3. Fluides biologiques

II.3.1. Définition

Les fluides biologiques ou fluides corporels désignent d'une manière générale des liquides produits par un organisme vivant (Bourderioux M., 2015 ; Court M., 2014).

II.3.2. Caractérisations des fluides

Les deux fluides les plus couramment utilisés en protéomique clinique sont le sang et l'urine car il est facile de les collecter de manière peu invasive et en quantité suffisante pour réaliser différentes études à partir d'un seul prélèvement, les fluides présentent un défi analytique considérable pour la protéomique en raison de leur gamme dynamique des concentrations protéiques, leur complexité (Adkins J.N. et al., 2002) ou la présence de composés interférents (tels que les sels ou les débris cellulaires,…). L'extrême complexité des fluides biologiques, tels que le plasma ou l'urine, représente un enjeu majeur pour la protéomique (Court M., 2014 ; Anderson NL et Anderson N G., 2002).

II.3.3. Types de fluides

II.3.3.1. Sang

Le sang total correspond au sang frais obtenu directement après prélèvement biologique, il est composé d'un liquide biologique, le plasma, ainsi que des cellules sanguines que sont les globules blancs, les globules rouges et les plaquettes. Exo vivo le sang n'étant pas stable, il coagule pour donner après centrifugation un surnageant appelé sérum et un culot compact composé de fibrine et de cellules sanguines. Le plasma est quant à lui isolé après ajout du sang dans un tube de prélèvement contenant un anticoagulant et après centrifugation (Gabelle A. et al., 2009), bien que la composition du sérum et du plasma soit proche, ils présentent quelques différences, durant la coagulation certains composés tels que le glucose et le fibrinogène sont consommés et leur concentration est abaissée dans le sérum par rapport au plasma. Au contraire, d'autres composés tels que le potassium, le lactate et les phosphates sont produits et libérés dans le sérum durant la coagulation, leur concentration est donc plus élevée dans le sérum que dans le plasma. Enfin, le plasma contient l'anticoagulant du tube, ces milieux biologiques complexes, notamment le sérum, présentent une large gamme dynamique des concentrations protéiques (Bros P., 2016) (Fig.14; 15).

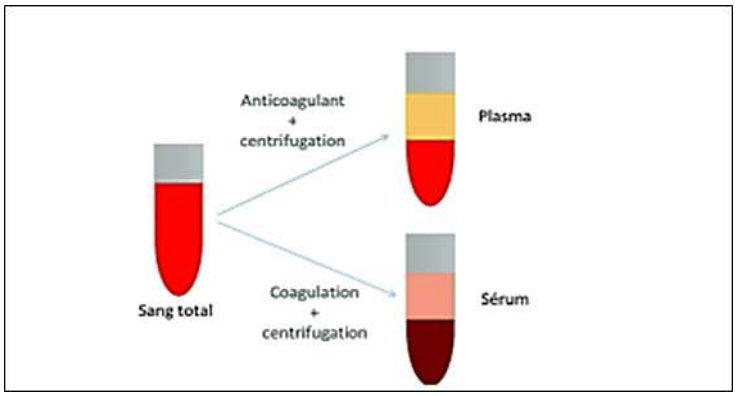

Figure 14. Différences entre le sang total, le sérum et le plasma, Le sang total est le sang frais recueilli après prélèvement (Bros P., 2016).

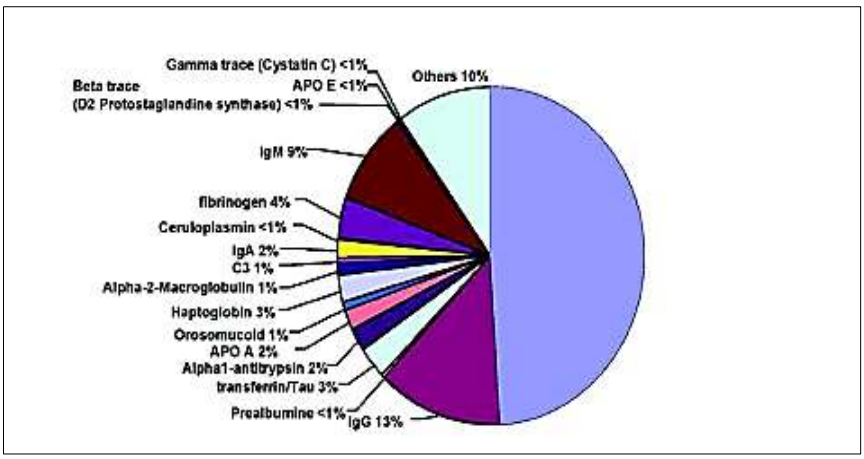

Figure 15. Diagramme circulaire représentant la distribution différentielle des protéines majoritaires dans le sérum, Chaque secteur est proportionnel à la part représentative de la protéine indiquée dans la légende en fonction de la quantité de protéine totale dans le sérum (Bros P., 2016).

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} (Court M., 2014) (Fig.16).

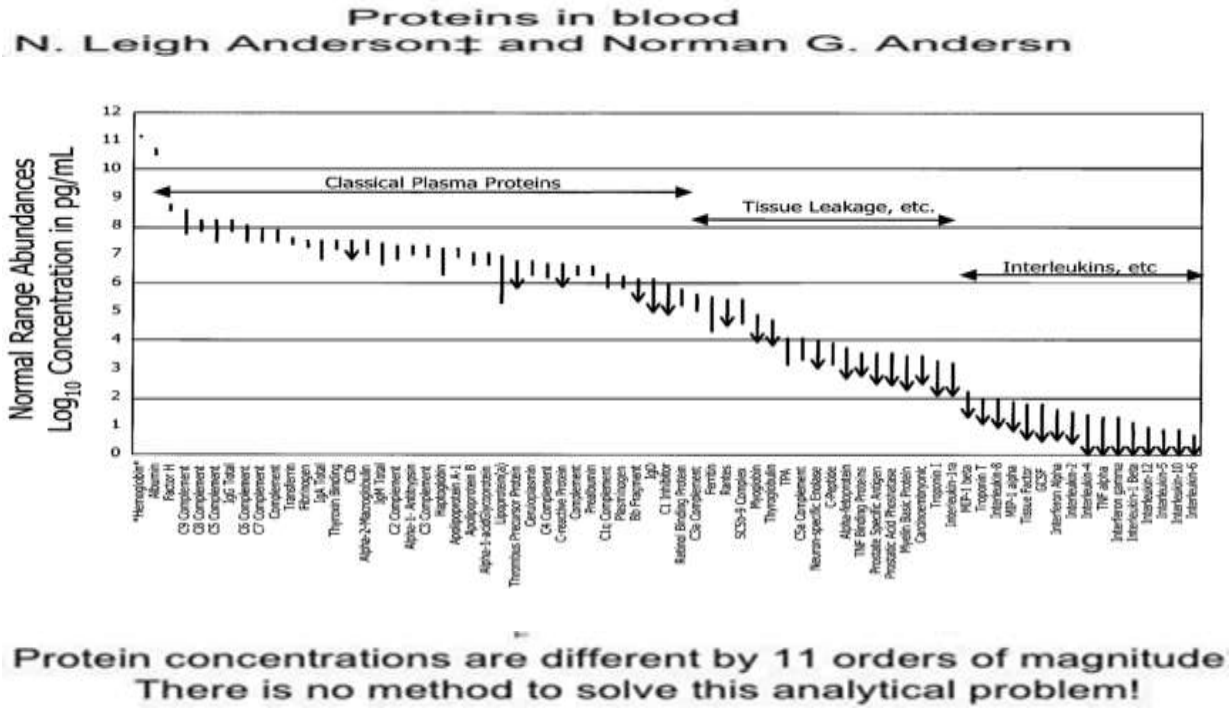

Figure 16. Intervalle de concentration de 70 protéines du plasma (Anderson N. L. et Anderson N.G., 2002)

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 (Court M., 2014) (Fig.17).

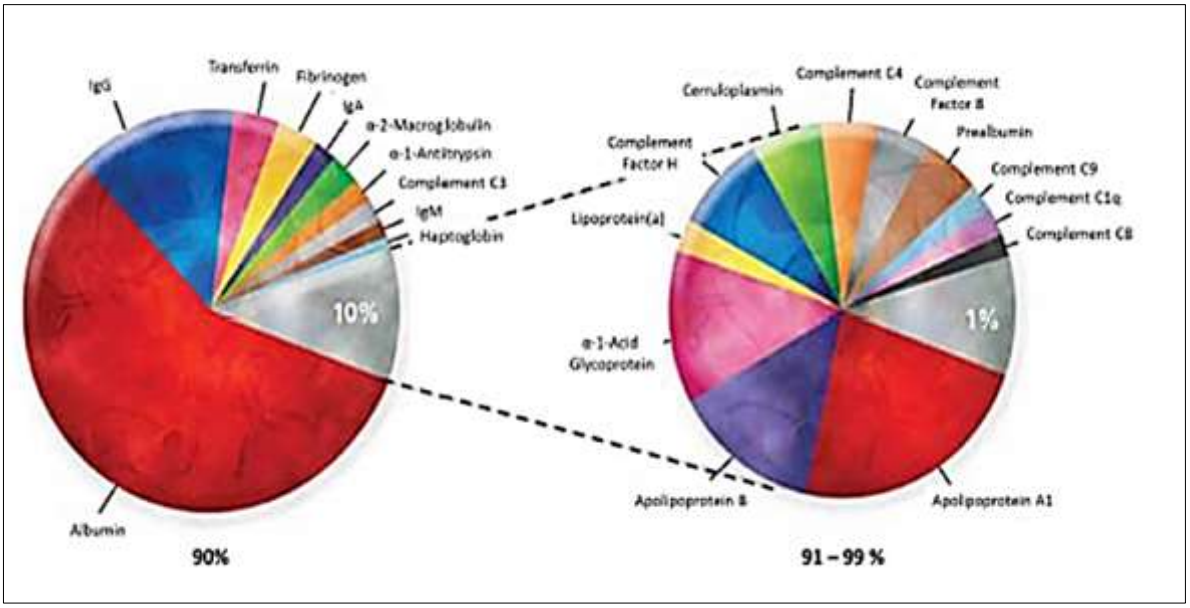

Figure 17. Distribution des protéines représentant (A) 90% et (B) de 91-99% de la quantité totale de protéines du plasma d'après (Court M., 2014).

II.3.3.2. Liquide céphalorachidien

Le liquide céphalorachidien (LCR) entoure le cerveau, le cervelet et la moelle osseuse et les protège ainsi des chocs mais aussi des maladies infectieuses, il est secrété par les plexus choroïdes du cerveau, structures particulières des parois des ventricules, à raison de 150 ml renouvelés 5 fois par jour, il est ensuite drainé par les villosités arachnoïdiennes au niveau de l'espace subarachnoïde (Spector R.. et al ., 2015 ; Lehtine M.K., 2013), entre 10 à 15 ml par adulte, et 5 à 10 ml par enfant de LCR peuvent être prélevés de façon invasive par ponction lombaire entre les vertèbres, ce liquide clair incolore de pH 7,3 est composé d'ions et de protéines. Le LCR est un milieu biologique complexe présentant une large gamme dynamique des concentrations protéiques. De par sa proximité avec le cerveau, le LCR est le fluide biologique de choix pour étudier son fonctionnement et les maladies qui lui sont associées (Blennow K., 2010). Afin de quantifier les biomarqueurs protéiques et peptidiques présents dans les fluides biologiques, il est important de connaitre quelles sont les stratégies de quantification et les techniques de préparation d'échantillons couramment utilisées en protéomique clinique (Bros P., 2016 ; Lehmann S. et al., 2009) (Fig.18;Fig.19).

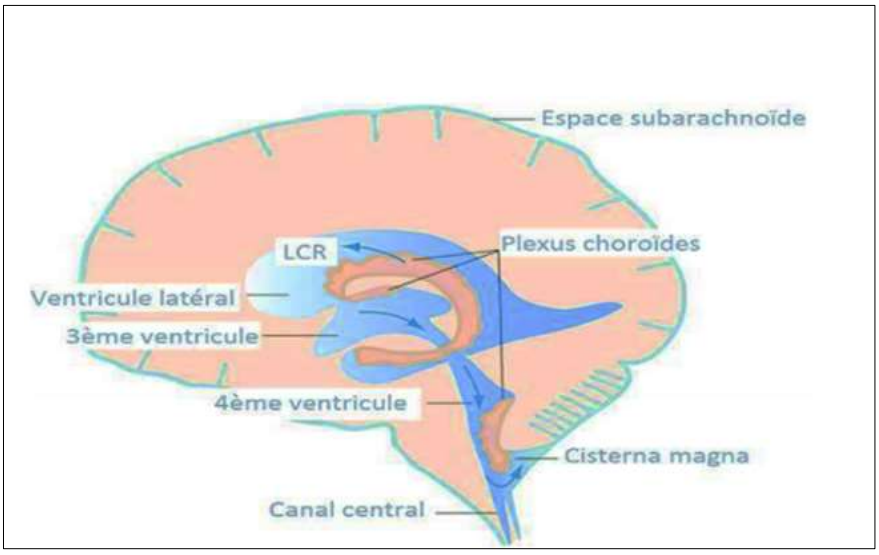

Figure 18. Circulation du liquide céphalorachidien, Après avoir été sécrété par les plexus choroïdes du cerveau, le LCR est drainé par les villosités arachnoïdiennes (Bros P., 2016).

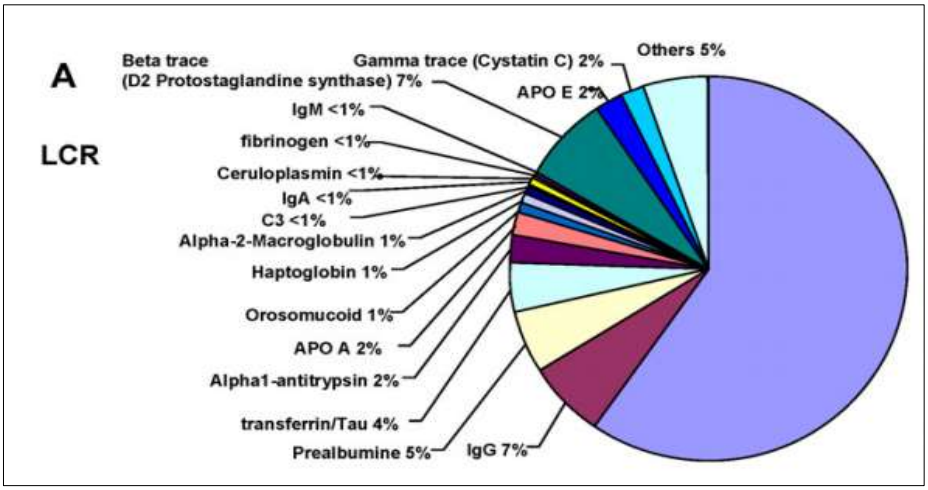

Figure 19. Diagramme circulaire représentant la distribution différentielle des protéines majoritaires dans le LCR (Bros P., 2016).

II. 3.3.3. Urine

C'est un déchet organique d'élimination rénale de consistance liquide, de couleur jaune ambre, de saveur amère légèrement salée, sécrétée par les reins et comprenant certains produits toxiques pour l'organisme, elle est conduite dans la vessie par les uretères, emmagasinée dans celle-ci avant d'être rejetée à l'extérieur lors d'une miction, l'urine normale est une solution d'eau contenant certaines substances dissoutes, cette composition peut être influencée par l'alimentation, l'activité métabolique et l'état de la fonction rénale.

L'urine se compose de sels minéraux: sodium, potassium, phosphore, magnésium, calcium et chlore. déchets azotés: urée, créatinine et acide urique, acide citrique, lactique, pyruvique et oxalique, hormones, vitamines et enzymes en très faible quantité (Bensouna S., 2019 ; Lehmann S. et al., 2009) (Fig. 20).

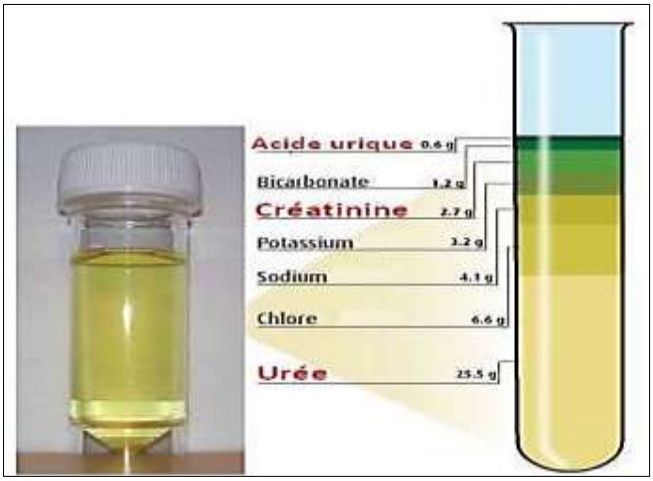

Figure 20. Composition de l'urine (Bensouna S., 2019).

II. 3.3.1. Sueur

C'est un liquide incolore, de saveur plus ou moins salée, de pH est compris entre 4 et 6,5, son odeur est très variable, généralement faible, la sueur est une des sécrétions les plus aqueuses de l'organisme, on y retrouve la plupart des constituants du plasma, mais dilués. Elle se compose de 99 % d'eau, 0,5% de substances minérales (chlorure de sodium, chlorure de potassium et des traces de calcium, magnésium, cuivre, phosphore, fer) et de 0,5 % de substances organiques (urée, ammoniaque, acides aminés, acide lactique, acide pyruvique, acide urocanique qui lui confèrent un pH acide), les concentrations des constituants majoritaires sont indiquées dans le tableau (Brisard A., 2005).

Tableau .02 . Concentration des principaux constituants de la sueur (Brisard A., 2005).

Constituants	Concentration
Cl^-	5-70 mM
Na^+	7-80 mM
K^+	4-24 mM
Urée	0,15-0,25 mg/mL
NH_4^+	0,5-8 mM
Acide lactique	10-40 mM
Protéines	20-77 mg/ 100 mL

II.4. Applications de la protéomique en clinique

II.4.1. Applications médicales

Les avancées dans le domaine de la protéomique génèrent actuellement un grand nombre de cibles thérapeutiques potentielles et permettent la découverte de marqueurs de maladies, un des principaux défis du secteur pharmaceutique est d'augmenter l'efficacité de la détection de la toxicité des médicaments par comparaison des profils protéiques entre des individus soumis à un traitement et des individus non traités (Aubry M.A. et al., 2000).

II.4.1.1. Etude de l'efficacité et de la toxicité des agents thérapeutiques

De nombreuses études utilisant la protéomique ont déjà été utilisées pour étudier les effets d'un médicament sur des échantillons biologiques, ainsi, la protéomique a joué un rôle prépondérant dans la découverte des mécanismes de la néphrotoxicité induite par un traitement à la cyclosporine A (CsA) (Aicher L. et al., 1998), l'étude des modifications de

profils protéiques sur gels 2DE entre des rats traités à la CsA ou non traités a permis de mettre en évidence la régulation négative, en cas de traitement à la CsA, d'une protéine de liaison au calcium, ce qui induit une accumulation de calcium dans les tubules du rein et donc une toxicité tubulaire. Cette étude a ensuite été généralisée à d'autres espèces, mettant en évidence l'existence d'un mécanisme similaire de néphrotoxicité chez l'homme (Steiner S. et al., 1996 ; Aicher L. et al., 1998), une autre application de la protéomique aux effets d'agents thérapeutiques est l'établissement de profils protéiques typiques d'une catégorie d'agents. L'indométhacine a ainsi servi à établir un profil d'expression protéique typique des agents anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID). En établissant le même type de profil pour d'autres NSAID potentiels, il devient alors possible de prédire leur efficacité par comparaison avec le profil type correspondant au traitement à l'indométacine. La protéomique permet de plus une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et la détection de modifications post-traductionnelles induites par un traitement ou une pathologie. Mais l'intérêt de la protéomique consiste aussi en la détermination de protéines pouvant être utilisées comme marqueurs des maladies, détectables de façon précoce et pouvant ensuite être utilisées comme cibles thérapeutiques (Lescuyer P. et al., 2004 ; Aubry M.A. et al., 2000).

II.4.1.2. Application aux différents types de pathologies humaines

A. Détection des pathologies du système nerveux central (SNC)

L'étude du liquide céphalorachidien (LCR) et du sérum permet de voir les changements du profil d'expression protéique tout au long d'une maladie et de découvrir quelles sont les protéines impliquées dans le développement de la pathologie. Ainsi, dans le cas de la maladie d'Alzheimer (AD), ou de la schizophrénie, des études ont démontré que l'expression de diverses protéines synaptiques était altérée. Les protéines SNAP 25 et GFAP (glial fibrillary acidic protein) par exemple, se révèlent être des protéines associées à la maladie d'Alzheimer et leur présence a été décelée à l'aide d'études protéomiques dans le cerebellum et dans les lobes frontaux, pariétaux, temporaux et occipitaux du cortex de patients atteints d'AD (Greber S. et al., 1999). D'autres études du protéome ont montré, chez des patients atteints d'AD, une diminution globale de l'expression d'une protéine inhibitrice de la liaison au diazépam (DBI) qui permet de réguler négativement la transmission GABAergique, alors que cette protéine est régulée positivement dans le liquide cérébrospinal des mêmes patients (Edgar P.F. et al., 1999), ces études sont désormais facilitées par l'établissement de cartes 2DE des protéines du cerveau humain (180 protéines ont été

caractérisées), de plus, puisqu'il est désormais connu que durant l'apoptose, la mitochondrie délivre diverses protéines pro-apoptotiques comme le cytochrome c et des facteurs d'induction de l'apoptose, son dysfonctionnement pourrait avoir un rôle critique dans le développement de maladies neurodégénératives comme AD, Parkinson, ou la chorée de Huntington. Une carte du protéome de la mitochondrie est donc en cours d'élaboration (Hanson B.J. et al., 2001; Langen H. P. et al., 1999).

B. Détection précoce des cancers

En dépit d'avancées significatives, nos connaissances sur la physiopathologie des cancers sont encore parcellaires et les retombées pratiques de ces recherches dans le domaine du dépistage, du diagnostic, du pronostic ou des traitements sont encore trop limités. La compréhension des différentes étapes permettant le passage d'une lésion localisée vers une tumeur invasive est particulièrement importante car elle conditionne la prévention et la prise en charge des cancers invasifs dont la mortalité reste élevée. C'est pourquoi, il est nécessaire d'élaborer de nouvelles stratégies pour identifier les protéines impliquées dans des mécanismes physiologiques ou pathologiques en ligne directe avec l'initiation et/ou la progression tumorale (Hamrita B. et al., 2011 ; Solassol J. et al., 2005; Chong B.E. et al., 1998) (Fig.21).

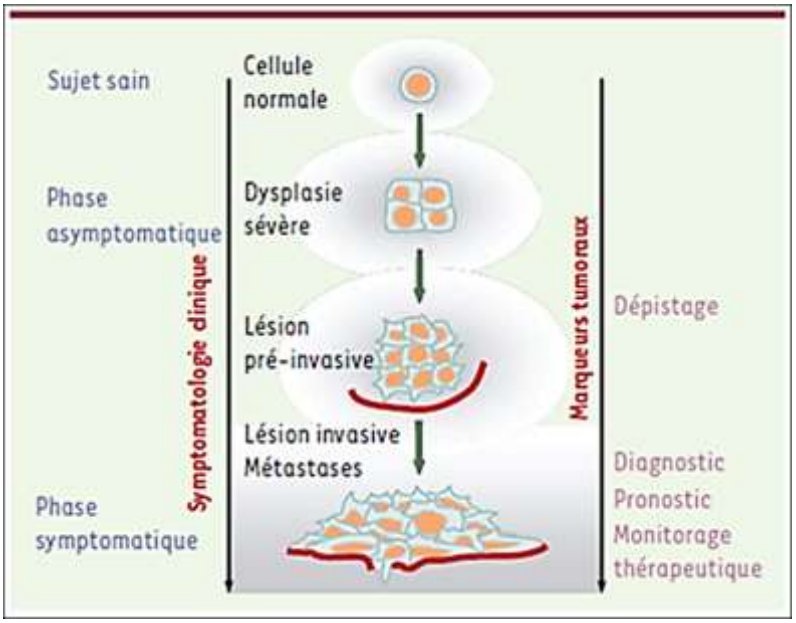

Figure 21. Diagramme de la progression tumorale (Solassol J. et al., 2005).

Ces approches se focalisent non plus sur l'identification d'un marqueur unique, mais sur plusieurs marqueurs co-exprimés, débouchant ainsi sur l'établissement d'un profil

d'expression ou d'une carte d'identité pour chaque tumeur, une telle signature moléculaire associée aux données cliniques et anatomopathologiques devrait permettre le dépistage des stades précoces de cancer avant l'apparition des signes cliniques. Récemment, les progrès en nanotechnologies fondés sur des méthodes de chromatographie liquide ou de surface ont permis l'émergence de nouvelles techniques d'analyse protéomique appliquées aux pathologies humaines (Zhu K.et al., 2003). Les marqueurs tumoraux ne sont pas statiques et leur expression varie au cours du temps en fonction de l'état général du patient, du processus tumoral ou des traitements. En pratique, bien qu'un grand nombre de marqueurs présomptifs ait été identifié, peu d'entre eux ont été promus et recommandés pour une utilisation diagnostique dans la population générale (Issaq H.J. et al., 2002), leur utilisation est actuellement limitée le plus souvent à l'établissement du bilan initial du cancer, à l'évaluation de l'efficacité thérapeutique et à la surveillance d'une récidive. La performance d'un test diagnostic est fondée sur 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 en bonne santé (l00 % de spécificité) et totalement positif pour un type de tumeur donnée (100 % de sensibilité). Par ailleurs, ces marqueurs devraient montrer une corrélation nette entre leur concentration sérique et la taille de la tumeur (Solassol J. et al., 2005) (Fig. 22).

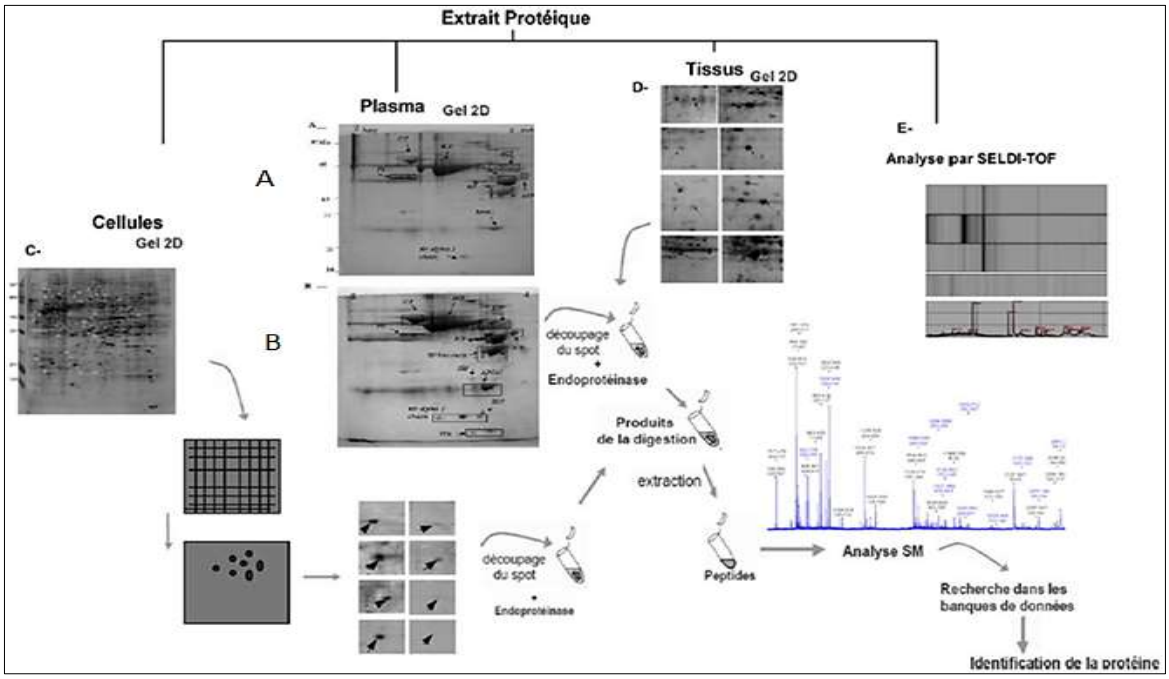

Figure 22. Quelques exemples d'approches proteomiques utilisées lors de l'identification de marqueurs tumoraux (C : SERPA, A, B, D : gel 2D/MALDI-TOF, E : SELDI-TOF) (Hamrita B. et al., 2011).

B.1. Détection de cancer de sein

La plupart des études sur le sein avaient pour but d'identifier les protéines qui sont différentiellement exprimées dans le tissu normal et le tissu cancéreux, afin de parvenir à ce résultat, la microdissection par capture laser a été utilisée, elle permet d'isoler les cellules tumorales du stroma environnant et du tissu normal et de permettre la caractérisation du tissu cancéreux sans contamination par le tissu voisin à l'aide des diverses techniques de protéomique (Gilabert M. et al., 2010 ; Spyratos F., 2004). À l'heure actuelle, l'analyse protéomique permet une description dynamique de la régulation de l'expression des gènes, grâce à l'étude des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles, la recherche d'un marqueur idéal doit répondre à plusieurs critères, à savoir, la spécificité, la sensibilité et la valeur prédictive positive. Par ailleurs, la concentration de cette molécule devrait montrer une corrélation entre le taux du marqueur, l'agressivité de la tumeur et l'efficacité thérapeutique. Il n'existe pas de marqueurs protéiques tumoraux possédant une spécificité et une sensibilité suffisantes pour avoir une utilité en clinique et notamment dans le diagnostic précoce des cancers mammaires (Hamrita B. et al., 2012), à titre d'exemple, bien que le marqueur CA 15-3 s'exprime chez 97 % des patientes présentant un cancer du sein, il n'est cependant pas spécifique de cette maladie, puisque des concentrations en CA 15-3 supérieures aux valeurs usuelles ont été observées chez environ 6 % des sujets sains (Mathelin C. et al., 2006) (Tableau.3).

Tableau.03. Protéines différentiellement exprimées dans le cadre des cancers mammaires et caractérisées par différentes approches protéomiques (Hamrita B. et al., 2012).

Marqueurs identifiés	Fonction	Régulation dans le cancer du sein	Méthode d'identification
Protéines cellulaires			
Cathepsine D	Protéase	Surexpression	2-DE
Kératine K5, K6, K7, K17	Cytosquelette	Inhibition	2-DE
K2RATINES k8, K18, K19	Cytosquelette	Surexpression	2-DE
Tropomyosine-1	Cytosquelette, suppresseur de tumeurs	Inhibition	Hybridation in situ/immunofluorescence
Vimentine	Cytosquelette	Surexpression	Test d'invasion sur Matrigel
Protéines disulfide isomérase	Oxydation cellulaires	Surexpression	2-DE/micro séquençage
14-3-3	Surexpresseur de tumeures	Inhibition	2DE/Maldi-Tof
Calréticuline	Chaperonne	Surexpression	-
NGF (nerve growth factor)	Facteur de croissance	Surexpression	Western blot/Elisa/ immunohistochimie
HSP27	Chaperonné	Surexpression	2-DE/Maldi-Tof/Tof-MS/MS
Annexine-2	cytosquelette	Surexpression	FD-LC-MS/MS
Galectine-1	Apoptose prolifération	Surexpression	FD-LC-MS/
Protéines plasmatiques			
Tétranectine	Protéolyse, coagulation, angiogenése	Surexpression	Elisa
uPA-PAI-I	protéolyse	Surexpression	Elise
CD105 (endogline)	Organisation du cytosquelette, signalisation	Surexpression	Elisa
α 1 – antitrypsine	Inhibiteur de protéases	Surexpression	2-DE/Maldi-Tof- MS
Apolipoprotéine A1	Métabolisme lipidique	Inhibition	2-DE/Maldi-Tof- MS
BC1, BC2, BC3	-	Surexpression	Puces à protéines (Ciphergen)
Kallicréine 4, 5, 10,15	Sérines protéases	Surexpression	-
Ubiquitine	Recyclages des protéinées/dégradation	Surexpression	Seldi-Tof/MS
Ferritine	Transport du fer	Surexpression	Seldi-Tof/MS
Autoanticorpe			
P53	Suppresseur de tumeurs	Surexpression	Elisa
RS/DJ-1	-	Surexpression	
Cardiolipine	Métabolisme énergétique	Surexpression	Elisa
β- 2glycoprotéine	Coagulation	Surexpression	Elisa
MnSOD (superoxyde dismutase	Oxydations cellulaires	Surexpression	Elisa compétitive
HSP60	Chaperonne, transport des protéines	Surexpression	immunohistochimie
α-β-Cristalline	Chaperonne	Surexpression	immunohistochimie
β-tubuline	Cytosquelette	Surexpression	serpa
Prohibitine	Prolifération, suppresseur de tumeurs	Surexpression	serpa

B.2. Détection de biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie

La technique la plus utilisée pour mesurer la protéinurie est la bandelette urinaire, cette technique permet de détecter la présence d'albumine lorsque celle-ci dépasse 50 à 100 mg/mL, cependant, elle ne permet pas de détecter les protéines de bas poids moléculaires présentes dans les urines, d'autres méthodes sont utilisées comme l'électrophorèse des protéines urinaires sur SDS-PAGE permettant une étude qualitative de la protéinurie. L'analyse du protéome urinaire soulève plusieurs difficultés liées à la faible concentration des protéines urinaires comparées aux protéines plasmatiques, à l'activité de protéases, à la présence de sels et à la variation de la concentration des protéines en fonction de l'état d'hydratation, les tissus relarguent constamment des protéines ou des fragments protéiques susceptibles d'être détectés dans les fluides biologiques. Ainsi une tumeur peut relarguer des protéines spécifiques ou modifier l'abondance des protéines normalement sécrétées dans les fluides biologiques. Dans le cas du cancer de la vessie, l'urine représente donc l'analyte idéal puisque elle est directement en contact avec les cellules épithéliales de la vessie, certains tests urinaires à visée diagnostique sont aujourd'hui disponibles, les plus utilisés sont le BTA Trak ou le NMP 22 (Court M., 2014). Deux études ont été menées pour la sélection de biomarqueurs urinaires, L'étude pilote était orientée vers la sélection de marqueurs pour le diagnostic du cancer de la vessie et a abouti à la définition d'un premier panel (Panel 1) tandis que la seconde étude avait pour objectif de sélectionner des marqueurs pour la détection des récidives du cancer de la vessie (Panel 2) (De Paoli M., 2016) (Fig. 23).

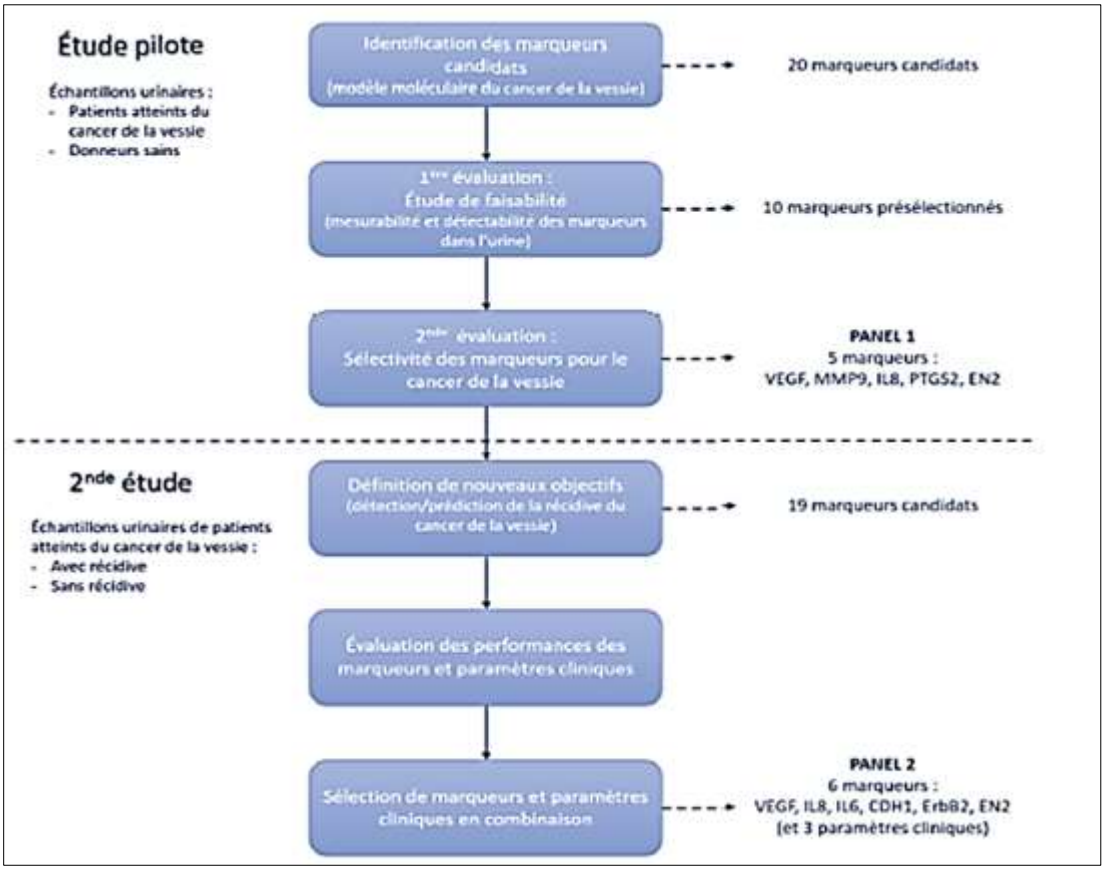

Figure 23. Représentation schématique des étapes de la sélection des marqueurs (De Paoli M., 2016).

B.3. Recherche des marqueurs pronostiques circulants du mélanome

Le mélanome est une tumeur maligne cutanée développée aux dépens de mélanocytes, il s'agit de la plus sévère des tumeurs cutanées malignes fréquentes (Belot A. et al., 2008), la prise en charge thérapeutique du mélanome à un stade précoce (stade I et II) est essentiellement chirurgical, avec un taux de guérison à dix ans qui approche les 90 %, le taux de guérison chute dramatiquement dans les formes plus avancées avec un taux de survie moyen à cinq ans de 30%pour les stades III. Dans la maladie métastatique (stade IV), le taux de guérison devient inférieur à 5 % (Balch C.M. et al., 2001). Plusieurs facteurs cliniques (âge, localisation, nombre de ganglions lymphatiques envahis et/ou présence de métastases à distance) et histopathologiques (profondeur de tumeurs et présences d'ulcérations) sont utilisés comme facteurs pronostiques (Aitchison T.C. et al., 1995) .Toutefois, l'épaisseur de la tumeur primaire, mesurée en millimètre, encore appelée indice micrographique de Breslow, reste le facteur pronostique indépendant le plus puissant dans le mélanome localisé. La conduite thérapeutique à ce stade est d'ailleurs en grande partie dictée par cet index. Malheureusement, dans certains cas, il ne représente pas un indicateur suffisamment précis du

comportement biologique de mélanome. En effet, une minorité de patients atteints de mélanomes de taille inférieure à 1mm développeront une maladie métastatique (Becker D.et al., 2006). Ainsi l'identification des mélanomes de faible taille (<1 mm) et de taille intermédiaires (2-4 mm), à fort risque de métastases locales ou à distance, demeure un des défis majeurs pour une prise en charge optimale et adaptée de chaque patient (Solassol1 J.et al., 2011).

B.4. Détection de cancer du côlon

Détection de nouveaux marqueurs peuvent être essentiels pour établir des diagnostiques plus précoces et plus précis, mais peuvent également devenir de nouvelles cibles thérapeutiques et permettre ainsi d'entrevoir de nouvelles drogues anticancérigènes (Aubry M.A. et al., 2000) (Fig.24).

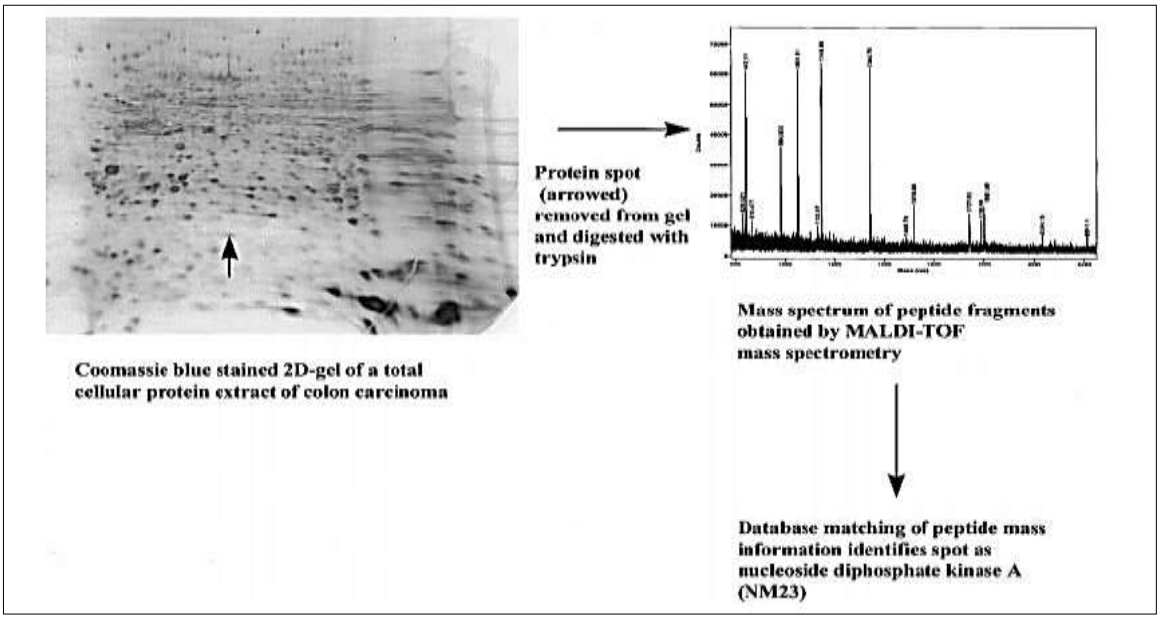

Figure 24. Exemple représentatif de l'approche protéomique pour l'étude du cancer du côlon (Chambers G. et al., 2000).

C. Détection des pathologies cardiaques

Les maladies cardiaques sont souvent multifactorielles, ainsi la capacité d'obtenir une vue globale des changements d'expression dans les cellules du myocarde pour les cas d'hypertension, d'ischémie, d'arrêt cardiaque ou de la cardiomyopathie dilatée (DCM) permet une meilleure compréhension des mécanismes causant ces maladies. La réalisation de banque de données de gel 2D des protéines cardiaques de l'homme et d'espèces modèles comme le chien et le rat permet aujourd'hui des recherches in vivo sur ces espèces modèles et de les

transposer à l'homme par la connaissance des protéines homologues. En analysant les gels 2D de chiens chez lesquels une DCM a été provoquée, trente et une protéines voient leurs taux d'expression modifié parmi lesquelles de nombreuses sont impliquées soit dans la production d'énergie par les mitochondries, soit dans le système de contraction ou dans l'apport d'oxygène dans les cellules du myocarde (Heinke M. Y. et al., 1999). La comparaison des gels 2D de cellules du myocarde saines et hypertrophiées (état des cellules dans le cas d'hypertension, d'infarctus ou de DCM) in vitro, a permis d'identifier onze protéines changeant de taux d'expression dont cinq isoformes de la chaîne légère de l'actine démontrant l'implication du système de contraction dans ces maladies(Pinet F. et al., 2007 ; Aubry M.A et al., 2000 ; Arnott D. K. et al., 1998).

D. Recherche des marqueurs diagnostiques des maladies infectieuses

La protéomique clinique consiste avant tout en l'étude de profils protéiques spécifiques d'une pathologie, de l'état d'avancement de celle-ci, de sa sévérité ou bien de l'efficacité d'un traitement, une deuxième application consiste en l'identification directe de micro-organismes. Actuellement de nouveaux agents infectieux tels que le HIV, Ebola, Borrelia burgdorferi apparaissent et s'ajoutent à d'anciens pathogènes que l'on croyait contrôler comme Mycobacterium tuberculosis (Marinach-Patrice C et al., 2007). L'établissement du profil protéique de ces agents infectieux est donc essentiel au développement de vaccins, de traitements et de méthodes de diagnostic (Aubry M.A. et al., 2000). Si l'approche utilisant les gels d'é1ectrophorèse bidimensionnelle reste un outil de choix pour la découverte de biomarqueurs protéiques, ses limitations en terme de débit d'analyses (faible) et de gamme de détection (protéines majoritaires principalement), n'ont pas permis son utilisation en diagnostic. Dans ce contexte, la spectrométrie de masse, outil d'analyse puissant adapté aux protéines, extrêmement sensible, reproductible et automatisable, est apparue comme une alternative potentielle aux méthodes traditionnelles de diagnostic, qu'il soit direct ou indirect (microscopie, PCR...). La technologie automatisable à haut débit, basée sur la capture spécifique de sous-groupes de protéines selon leurs propriétés biochimiques et/ou physiques couplée à l'analyse par spectrométrie de masse, a démontré son potentiel pour les gammes de poids moléculaires non accessibles par gels d'é1ectrophorèse (< 20 kDa) et l'analyse de fluides biologiques complexes pollués par des protéines abondantes telle l'albumine (Marinach-Patrice C.et al., 2007).

Chapitre III

Exemple d'une étude protéomique en clinique

III.1. Etude du profil protéomique de follicules ovariens

Cette étude a été conçue pour identifier les protéines exprimées dans l'unité folliculaire au cours de sa croissance et de son développement, dans ce but, un modèle expérimental pour le développement in vitro de follicules de souris a été utilisé, ce qui permet la croissance et la maturation des ovocytes à partir de follicules du stade secondaire jusqu'aux ovocytes fertilisables. Ce système a été préféré à plusieurs cultures nouvellement développées car il permet une observation continue du follicule ce qui le rend possible de détecter même de légers changements morphologiques du follicule.

Pour la réalisation de cette partie nous avons consulté pas mal de base de données pour télécharger les articles qui contiennent des informations récentes sur ce sujet (Annexe 01).

Cet article vise à dévoiler l'étendue des applications de la protéomique, une approche analytique qui révolutionne actuellement le champ de la biologie et plus particulièrement la biologie de la reproduction. Une vue d'ensemble de la technique est apportée ici afin d'appréhender sa puissance et de comprendre les perspectives de ses applications cliniques.

III.2. Etapes d'étude du profil protéomique de follicules ovariens

III.2.1. Isolement, culture et sélection de follicules

Dans ce contexte, la séparation des différents types cellulaires se fait par l'utilisation d'enzymes ou par une séparation mécanique, veillant à ce que la structure folliculaire reste intacte, la culture en microgouttes recouvertes d'huile minérale a été utilisée, ce type de culture est le plus couramment utilisé pour l'étude de la croissance folliculaire in vitro, chez la souris, avec l'induction de l'ovulation des follicules**,** selon des caractéristiques morphologiques spécifiques des follicules, peut choisir des groupes à différents stades de la culture, de l'ovocyte, puis la sélection des follicules pour l'analyse protéomique.

III.2.2. Analyse protéomique

III.2.2.1. Extraction des protéines

L'extraction des protéines a été réalisée par le tampon de lyse, sonication, et centrifugation, les surnageant ont été recueillis et identifiés comme étant un extrait de protéine totale (TPE), le dosage de chaque extrait protéique par la méthode de Bradford (Bradford 1976) puis le stockage des échantillons à – 80ºC jusqu'à utilisation**.**

III.2.2.2. Préfractionnement des extraits protéiques

Pour les extraits protéiques très complexes, des protéines peu abondantes peuvent se retrouver noyées au sein des protéines les plus abondantes. Pour pallier ce problème, il est conseillé de décomplexifier l'échantillon en réalisant un fractionnement des extraits protéiques. En fractionnant les extraits, il est possible de réduire le nombre de protéines différentes contenues dans un échantillon et ainsi de mettre en évidence des protéines moins abondantes qui ne peuvent pas être détectées lors de l'analyse de l'extrait total. Dans ce contexte, le chercheur Anastacio été réalisé deux méthodes de fractionnement basées sur la focalisation isoélectrique (IEF) qui sépare les protéines en fonction de leur charge native. L'un de si méthode se fait directement dans une bandelette composé d'un gel de polyacrylamide à 4% contenant un gradient de pH immobilisé - strip IPG (immobilized pH gradient).

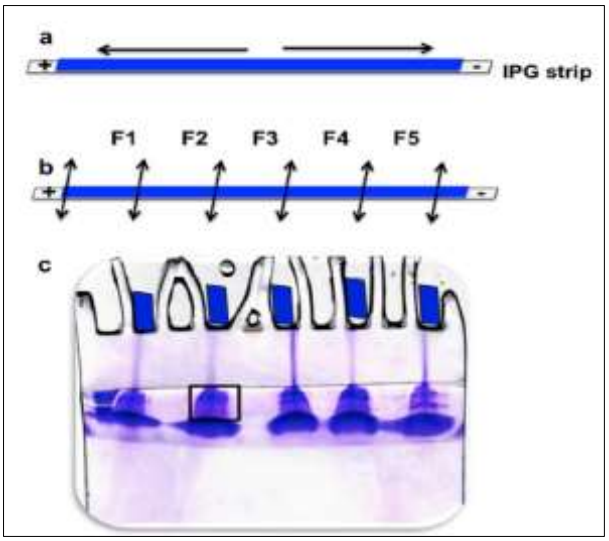

Figure 25. Schéma du principe de la migration IEF (Anastacio A., 2014).

III.2.2.3. Digestion trypsique

Le chercheur Anastacio fait une extraction d'une bande unique pour chaque fraction après une rapide migration en gel SDS PAGE, puis découpage en petits cubes et de la préparation pour décoloration des bouts de gels avant la digestion (Anastácio A. et al., 2017 ; Anastacio A., 2014).

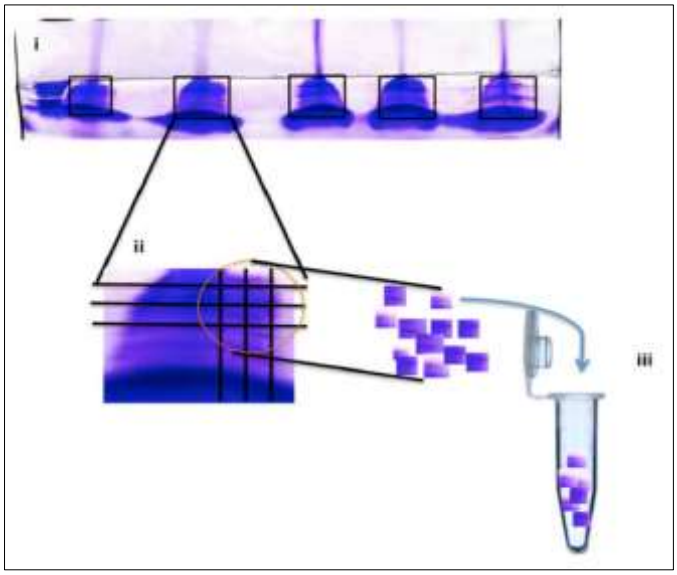

Figure 26. Schéma représente le principe de la digestion trypsique (Anastacio A ., 2014)

III.2.2.4. Analyse LC-MS / MS

Première étape de l'analyse LC –MS /MS, dessalage des échantillons peptidiques issus de la digestion par l'embout de pipette, pour les analyses LC-MS/MS, dans ce contexte deux configurations de nano LC ont été utilisées : 1D LC-MS/MS et 2D LC-MS/MS, la configuration 1D LC-MS/MS, pour faire l'identification des peptides utilise l'HPLC connecté avec un spectromètre de masse (MS) de type trappe ionique**.**

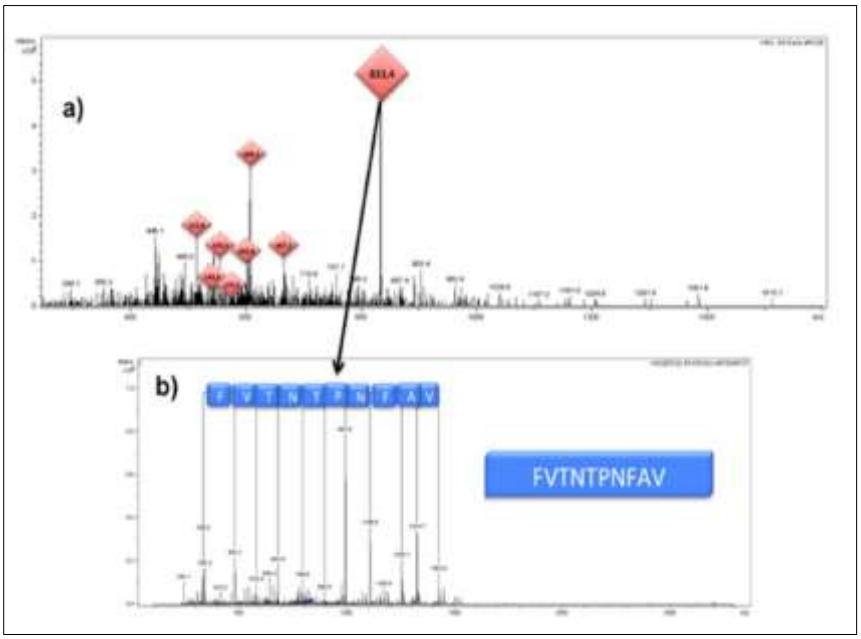

Figure 27. Spectre MS avec la sélection automatique des 8 précurseurs les plus abondants (Anastacio A., 2014).

III.2.2.5. Identification des protéines

Pour l'identification des protéines, les données MS/MS ont été soumises au logiciel X-tandem V. Pour comparer les trois stades du développement in vitro et mieux comprendre les profils protéiques obtenus, une analyse complémentaire a été réalisée à l'aide de logiciels d'analyse et de description de listes de protéines**.**

III.3. Résultats et discussion

L'études de le chercheure Anastacio , qui avait comme objet d'étude le follicule entier, a permis de mettre en évidence 1403 protéines impliquées dans le développement folliculaire représentant jusque-là le premier profil protéique du follicule en croissance (Anastacio A., 2014). L'analyses des profils protéiques identifiées 22 classes de protéines, la classe des protéines impliquées dans les liaisons aux acides nucléiques a été celle avec le plus de protéines attribuées. Les 4 classes suivantes avec plus de protéines attribuées étaient des classes d'enzymes : hydrolases, oxydoréductases, transférases et modulateurs enzymatiques. Les protéines du cytosquelette, les chaperonnes et les protéases ont été les autres classes avec un minimum de 5 % de protéines attribuées (Anastácio A.et al., 2017). De plus, les analyses qualitatives et quantitatives réalisées ont pu mettre en évidence des différences non seulement d'expression mais aussi d'abondance des protéines au cours du développement folliculaire suggérant qu'à certains moments leur rôle dans le développement est plus important, comme les protéines associées au réseau CDK, à la glycolyse, à la liaison et à la régulation du calcium (Anastácio A. et al., 2017).

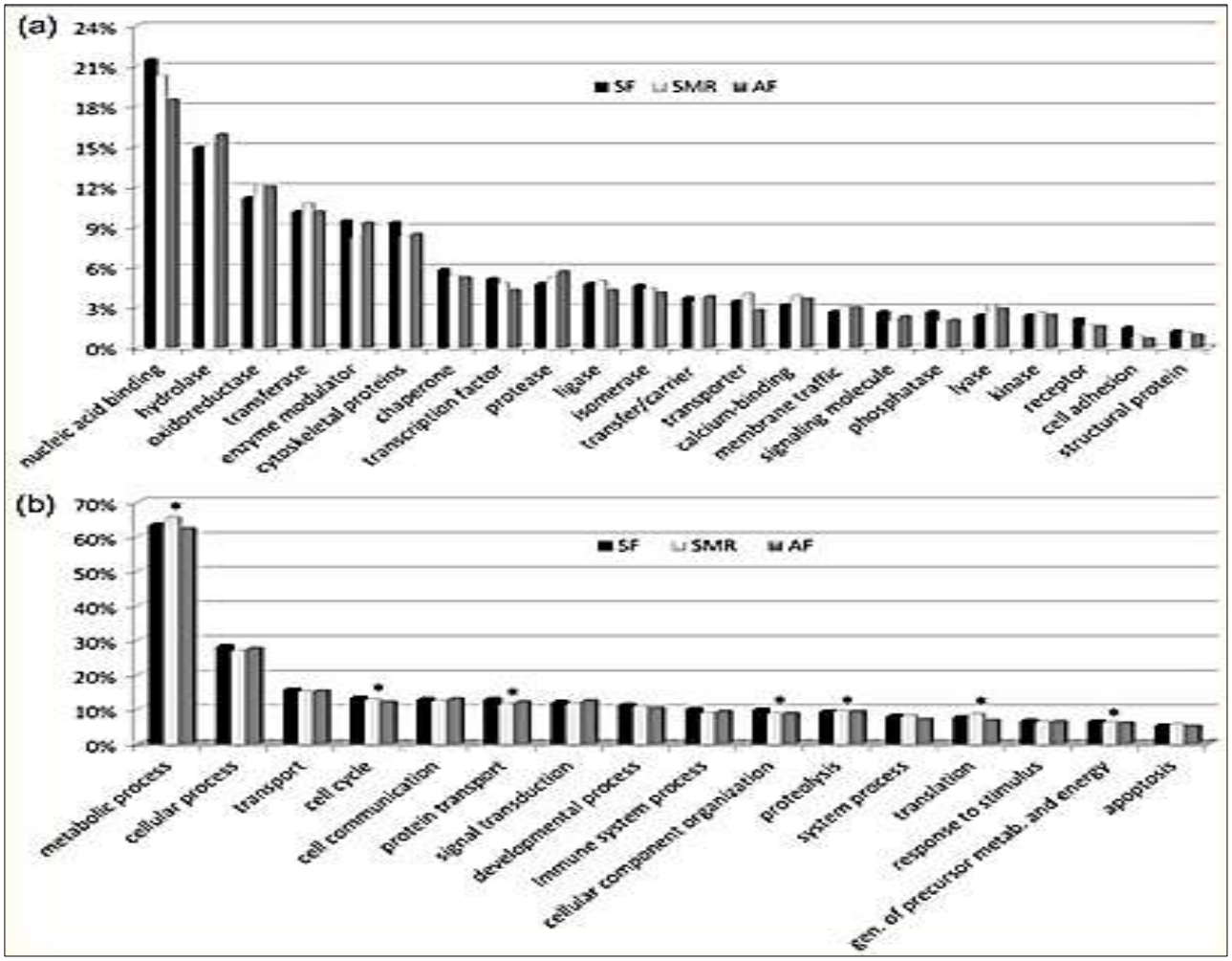

Figure 28. Analyse des protéines identifiées aux trois étapes. (a) Répartition des protéines identifiées pour chaque groupe en fonction de la classe de protéines PANTHER. (b) Classification fonctionnelle basée sur les processus biologiques (Anastácio A. et al., 2017).

Ben Khalifa M et al. 2012 ont été analysé le protéome des follicules ovariennes par chromatographie liquide en tandem et spectrométrie de masse. Ils ont révélé 11 protéines candidates (essentiellement apolipoprotéine H, la dihydrolipoyle, déhydrogénase, lysosyme C et la chaîne fibrinogène) avec un niveau d'expression élevé en parallèle d'un niveau d'expression bas de protéines différentes (l'antithrombine, la vitamine D, binding protein) (Ben Khalifa M.et al., 2012).

Une analyse protéomique comparative de l'ovocyte de souris à différents stades de développement a rapporté qu'au stade VG, il y a une surexpression de gènes impliqués dans la production de protéines responsables de la maturation ovocytaire, principalement la famille de protéines SLC responsables dans le transport de différentes molécules à travers la membrane ovocytaire et les cellules du cumulus (Shufang W., 2010). Aussi ils ont été observés que d'autres protéines impliquées dans la formation et l'adhésion des gaps jonctions sont plus abondantes dans les ovocytes au stade VG qu'au stade de la métaphase II.

L'étude de follicules ovariens ouvre de nombreuses perspectives pouvant servir de point de départ pour d'autres études plus ciblées sur le rôle spécifique de certaines familles de protéines dans le développement folliculaire, concernant les protéines qui n'ont pas été identifiées, il serait aussi important de vérifier si elles sont en plus faible abondance ou totalement absentes dans les stades de développement et d'en étudier l'impact sur développement folliculaire (Anastácio A. et al., 2017).

Cette étude contribue à l'identification de plusieurs mécanismes impliqués dans le développement des follicules ovariens in vitro, les données résultantes peuvent potentiellement servir les améliorations futures de l'actuel et toujours sous-optimal système de culture de follicules de mammifères, ce qui est particulièrement intéressant, des alternatives pour les patientes traitées pour un cancer sont nécessaires de toute urgence.

Conclusion

Notre recherche portée sur l'approche protéomique en clinique permet de concler que la protéomique clinique est une approche multidisciplinaire faisant appel à des compétences dans des domaines aussi vastes que la médecine, la biologie, la bioanalyse ou la bioinformatique. Ces approches protéomique représente actuellement un exploit extraordinaire et occupe une position clé dans la biologie moderne, elle fondée sur le couplage de trois technologies de pointe :

1) l'électrophorèse bidimensionnelle qui permet de séparer plusieurs milliers de protéines d'un même échantillon.

2) la spectrométrie de masse qui permet d'identifier ces protéines et de mettre en évidence leurs modifications post-traductionnelles.

3) la bioinformatique permettant la quantification du niveau des protéines et la constitution de bases de données.

On conclu que l'analyse protéomique est un domaine d'étude à part entière, il définit comme l'utilisation de la quantification au niveau de la protéine comme mesure objective de l'expression génique caractérisant un processus biologique donné (processus physiologique ou pathologique, effets des médicaments, de l'environnement...) et comme moyen de décodage des mécanismes contrôlant cette expression, et aussi met l'accent sur une description dynamique de la régulation des gènes. L'utilisation de l'analyse protéomique est appelée à se généraliser, en complémentarité avec la génomique, tant en recherche fondamentale qu'en biomédecine ou en pharmacologie, où elle constitue désormais un outil puissant pour l'identification de marqueurs associés à une pathologie et de cibles thérapeutiques. Mais dans le champ des applications cliniques, les limitations technologiques sont importantes et le défi analytique reste immense.

Les approches protéomiques actuelles présentent certaines limites. En effet, les altérations affectant des cibles primaires faiblement abondantes sont souvent difficiles à mettre en évidence par les approches actuelles. Une autre limite serait liée aux problèmes de validation, de standardisation des variables, d'hétérogénéité des résultats ainsi qu'à la gestion globale de l'ensemble des données communes à toutes les analyses. En dépit de ces handicaps majeurs et bien que des validations dans des études cliniques futures soient nécessaires, les explorations protéomiques ont abouti ces dernières années à l'émergence de nouveaux acteurs moléculaires susceptibles de mieux prédire le potentiel évolutif de la maladie.

Enfin on peut dire que la protéomique est encore à l'aube de son développement, mais l'avenir devrait nous donner raison quant à son utilisation.

Références bibliographiques

Adkins J N., Varnum SM., Auberry KJ., Moore R J., Angell N H., Smith R D., Pounds J G., Toward a Human Blood Serum Proteome Analysis By Multidimensional Separation Coupled With Mass Spectrometry. Molecular and Cellular Proteomics. 2002 .1(12) : 947–955.

Aicher L., Wahl D., Arce A., Grenet O., Steiner S., New insights into cyclosporine A nephrotoxicity by proteome analysis Electrophoresis. 19. 1998-2003.

Aitchison TC., Sirel JM., Watt DC., MacKie RM., Prognostic trees to aid prognosis in patients with cutaneous malignant melanoma. Scottish Melanoma Group. BMJ .1995 .311 : 1536-9.

Anastácio A. Etude du profil protéomique de follicules ovariens de souris à 3 différents stades de développement in vitro. Thése de doctorat. Université Pierre et Marie Curie. 2014.

Anastácio A., Kenny A., Wallberg R., Chardonnet S., Pionneau C., Fédérici CH., SantosTA., Poirot C., Protein profile of mouse ovarian follicles grown in vitro. Molecular Human Reproduction.2017. 23. (12) : 827–841.

Anderson N L., Anderson, N G., The human plasma proteome history characterand diagnostic prospects. Molecular and Cellular Proteomics. 2002. 1(11) : 845–867.

Arnott D., O'Connell K L., King J T., An integrated approach to proteome analysis Identification of proteins associated with cardiac hypertrophy. Analytical Biochemistry. 1998. 258 : 1-18.

Aubry M.A. , Aussagues Y ., Berge A. , Brunel L ., Cabeau J. , Chevalier S. , Chicanne G., Dubreuil B. , Friry C. , Morello E. , Samson A. , Trinchero N. , Zelazny E ., Expression Génique et Protéines Recombinantes. Université Paul Sabatier. 2000.

Baillet A., Trocmé C., Gaudin P., Analyse protéomique en rhumatologie implication dans la prise en charge des rhumatismes inflammatoires. Revue du Rhumatisme. 2011. 78 :187-190.

Baker T G. A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries. Biol Sci. 1963 158: 417-433.

Balch CM., Buzaid AC., Soong SJ., Atkins MB., Cascinelli N., Coit DG., Final version of the American joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. J Clin Oncol. 2001. 19 : 3635-48.

Baudin B. Protéomique et spectrométrie de masse. Revue Francophone des Laboratoires. 2011. 437:31-40.

Baudin B., Bruneel A., L'analyse protéomique Intérêts et perspectives en biologie clinique. Immuno-analyse et Biologie Spécialisée. 2004.19(6):313-322.

Baudin B. Mass spectrometry and clinical proteomics. Annales de biologie clinique. 2015. 73(1):39-48.

Becker D., Mihm MC., Hewitt SM., Sondak VK., Fountain JW., Thurin M. Markers and tissue resources for melanomameeting report. Cancer Res. 2006. 66 : 10652-7.

Baker M., Cancer stem cells tracked. Nature.2012.488 :13-14.

Belot A., Grosclaude P., Bossard N., Jougla E., Benhamou E., Delafosse P., Cancer incidence and mortality in France over the period. Epidemiol Sante Publique.2008. 56 : 159-75.

Benzahra S., Les tumeurs malignes de l'ovaire chez la jeune fille. Thèse de doctorat. 2014.

Besson D., Étude du protéome de tumeurs colorectales. Biologie cellulaire. Thèse de doctorat. Université d'Angers.2013.

Benhaïm M., Développements méthodologiques en protéomique quantitative pour mieux comprendre la biologie évolutive d'espèces non séquencées. Chimie analytique. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg. 2017.

Bensouna S., Composition de L'urine. Université Kasdi Merbah Ouargla .2019.

Benkhalifa M., Louanjli N., Berthe E., Madkour A., Saadani B., Dalleac A., Merviel P., Copin H., Montjean D., Protéome du liquide folliculaire et de l'ovocyte. Médecine de la Reproduction. Gynécologie Endocrinologie. 2012. 14 (4) : 287-94.

Bjellqvist B., Ek K., Righetti PG., Gianazza E., Gorg A., Westermeier R., Postel W., Isoelectric focusing in immobilized pH gradients principle methodology and some applications. J Biochem Biophys Methods. 1982 : 317-339.

Blennow K., Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. Nat Rev Neurol.2010.6(3) :131-44.

Blisard KS., Davis LE., Harrington MG., Lovell JK., Kornfeld M., and Berger ML., Pre-mortem diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by detection of abnormal cerebrospinal fluid proteins. J Neurol Sci 1990.99:75-81.

Bœuf A., Développement d'approches protéomiques pour l'étude des interactions tique / Borrelia / peau. Thèse de doctorat.Université de Strasbourg.2013.

Bourderioux M., Approches protéomiques pour l'analyse des exosomes de liquides biologiques pour la recherche de biomarqueurs. Physiologie. Thése de doctorat. Université Sorbonne Paris Cité.2015.

Bouttes C., Création d'une application intégrée pour la gestion et l'analyse de données protéomiques. Centre régional Languedoc-Roussillon. 2005.

Brisard A., universite de nantes. Faculte de pharmacie.2005.

Bros P., Développement de méthodes de référence pour spectrométrie de masse pour le dosage de biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Thèse de doctorat. Université Montpellier. 2016.

Brosson D., Analyse protéomique et caractérisation de nouvelles protéines de paroi chez Encephalitozoon cuniculi une microsporidie pathogène de l'homme. Biologie cellulaire. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II. 2006.

Burat B., Apports de la protéomique quantitative différentielle haut-débit à l'étude des mécanismes de modification du cytosquelette de cellules tubulaires proximales induits par les Inhibiteurs de la Calcineurine. Biologie moléculaire. Thèse de doctorat.Université de Limoges.2017.

Chong BE., Lubman DM., Rosenspire A., Miller F., Protein profiles and identification of high performance liquid chromatography isolated proteins of cancer cell lines using matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom .1998 . 12 : 1986-93.

Clerico A., Giannoni A., Prontera C., Giovannini S., High-sensitivity troponin a new tool for pathophysiological investigation and clinical practice. Adv Clin Chem. 2009. 49 : 1-30.

Com E., Hondermarck H., Functional proteomics in oncology: to understand more than to describe. Medecine sciences. 2007. 1:27-30.

Court M., Le protéome urinaire caractérisation et intérêt pour la recherche de biomarqueurs de pathologies. Génomique Transcriptomique et Protéomique. Thèse de doctorat. Université de Grenoble. 2014.

Dallongeville S., Etude des protéines dans les échantillons du Patrimoine Culturel par spectrométrie Raman et analyse protéomique. Chimie théorique et/ou physique. Thèse de doctorat.Université des Sciences et Technologie de Lille - Lille I. 2011.

Dehoux M., Gobeaux C., Ray P., Claessens Y., Lefevre G., Adoption d'un biomarqueur en pratique quotidienne : de la biologie à la clinique. 2013. 71 (1) : 5-11.

Delcourt N., When proteomics addresses itself to post-translational modifications. Medecine sciences. 2007. 23(2):219-220.

De Paoli M., Cancer de la vessie sélection de biomarqueurs urinaires et développement d'un outil d'analyse multiparamétrique pour le diagnostic et la récidive des tumeurs urothéliales. Ingénierie biomédicale. Thèse de doctorat. Université de Lyon. 2016.

De Roux N., La protéomique une nouvelle approche analytique de l'étude des protéines. Métabolismes Hormones Diabètes et Nutrition. 2003 (2).

De Seny D., Ribbens C., Cobraiville G., Meuwis MA., Marée R., Geurts P., Wehenkel L., Louis E., Merville MP., Fillet M., Malaise MG Protéomique par SELDI-TOtoF-MS des maladies inflammatoires articulaires identification des protéines S100 comme protéines d'intérêt. Med Liège. 2009. 64 : 29-35

Edelman A., Pathophysiology in the era of contemporary proteomics. Médecine sciences. 2005. 21:675-678.

Edgar PF., Schonberger SJ., Dean B., Faull RL., Kydd R., Cooper GJ., A comparative proteome analysis of hyppocampal tissue from schizophrenic and Alzheimer's disease individuals. Molecular Psychiatry .1999. 4 (2) :173-178.

Emadali A., Gallagher-Gambarelli M., Quantitative proteomics by SILAC practicalities and perspectives for an evolving approach. Medecine sciences .2009. 25(10):835-842.

Ernoult E., Recherche de biomarqueurs de la neurotoxicité des traitements anticancéreux à base d'oxaliplatine approche protéomique quantitative. Biologie cellulaire. Université d'Angers. 2011.

Fabien B., Procédé de traitement des images de gels d'électrophorèse bidimensionnelle différentielle dans le contexte de la recherche de marqueurs protéiques Traitement du signal et de l'image. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne. 2008.

Fahiminiya S., Labas V., Roche S., Dacheux JL., Gerard N., Proteomic analysis of mare follicular fluid during late follicle development. Proteome science .2011. 9:54.

Fenn JB., Mann M., Meng CK., Wong SF., Whitehouse CM., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolécules. Science.1989. 246 :64-71.

Florens L., Washburn MP., Raine JD., Anthony RM., Grainger M., Haynes JD., Moch JK., Muster N., Sacci JB., Tabb DL., Witney AA., Wolters D., Wu Y., Gardner MJ., Holder AA., Sinden RE., Yates JR., Carucci DJA proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle. Nature 419. 2002 : 520-526.

Fouillen L., Universalité des méthodologies protéomiques pour l'identification et la caractérisation des protéines. Thèse de doctorat. Universite de strasbourg.2009.

Fournier A., L'ADN libre intra folliculaire Biomarqueur non invasif de la qualite embryonnaire chez les patientes avec syndrome des ovaires polykystiques. Thèse de doctorat. 2003.

Gabelle A., Roche S., Lehmann S., CSF biomarkers proteomics investigations and clinical applications in neurodegenerative disorders .Neurol Paris .2009.165(3) :213-22.

Gavin AC ., Bosche M., Krause R., Grandi P., Marzioch M., Bauer A., Schultz J., Rick JM., Michon AM., Cruciat CM., Remor M., Hofert C., Schelder M., Brajenovic M., Ruffner H., Merino A., Klein K., Hudak M., Dickson D., Rudi T., Gnau V., Bauch A., Bastuck S., Huhse B., Leutwein C., Heurtier MA., Copley RR., Edelmann A., Querfurth E., Rybin V., Drewes G., Raida M., Bouwmeester T., Bork P., Seraphin B., Kuster B., Neubauer G., Superti- Furga G., Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. Nature.2002.415 : 141-147.

Gaynor R., Irie R., Morton D., Herschman HR., S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. Nature .1980 .286 : 400-1.

Georgiou AS., Sostaric E., Wong CH., Gametes alter the oviductal secretory proteome. Mol Cell Proteomics .2005 . 4 : 1785-96.

Gilabert M., Audebert S., Viens P., Borg JP., Bertucci F., Goncalves A., Proteomics and breast cancer a search for novel diagnostic and theragnostic biomarkers. Bulletin du cancer 2010.97(3):321-339.

Goncalves A., Bertucci F., Birnbaum D., Borg JP., Proteic profiling SELDI-TOF and breast cancer: clinical potential applications. Medecine sciences. 2007. 1:23-26.

Gorg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W., The current state of two-dimensional électrophorèses with immobilized pH gradients. Electrophorèses.2000.21 : 1037-1053.

Gras D., The proteomic approach définition and applications through the ATS congress. La Lettre du Pneumologue .2005. (3).

Greber S., Lubec G., Cairns N., Fountoulakis M., Decreased level of synaptosomal associated protein 25 in the brain of patients with Down Syndrome and Alzheimer's disease, Electrophoresis .1999. 20 :928-934.

Gridelet V., L'implantation embryonnaire étude des récepteurs endométriaux à l'hCG/LH blastocytaire et intérêt de la mesure du G-CSF folliculaire. Thèse de doctorat. 2015.

Gygi SP., Corthals GL., Zhang Y., Rochon Y., Aebersold R., Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. Proc Natl Acad Sci. U S. 2000. 97 : 9390-9395.

Hamrita B., Ben Nasr H., Hammann P., Kuhn L., Ben Anes A., Dimassi S., Chaieb A., Khairi H., Chahed K., Towards a better knowledge of breast cancer physiopathology: the proteomics approach. Annales de biologie clinique .2012.70(5):553-565.

Hamrita B., Nasr HB., Kabbage M., Hamann P., Kuhn L., Guillier C., Remadi S., Chaieb A., Khairi H., Chouchane L., The therapeutic contribution of proteomic approaches in cancers. Gynecologie, obstetrique and fertilite .2011. 39(2):87-93.

Hanson BJ., Schulenberg B., Patton WF., Capaldi RA., A novel subfractionation approach for mitochondrial proteins A three-dimensional mitochondrial proteome map Electrophoresis .2001. 22 :950-959.

Harrington MG., Merril CR., Asher DM ., Gajdusek DC., Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. N Engl J Med .1986.315:279-83.

Heinke M Y., Wheeler C H., Yan J X., Amin V, Chang D., Einstein R., Dunn M J., dos Remedios CG., Changes in myocardial protein expression in pacing-induced canine heart failure. Electrophoresis .1999. 20 :2086-2093.

Hennebicq S., Ovogenèse, folliculogenèse fécondation. Thèse de doctorat. 2012.

Hirtz C., Intérêt diagnostique et clinique de la protéomique salivaire Étude préliminaire du diabète de type 1.2005.

Hondermarck H., Proteomics and breast cancer: new perspectives and limitations. Pathologie-biologie 2006.54(4):194-198.

Hondermarck H., Solary E., Lehman S., Joubert-Caron R., Pinet F., Jouin P., Rabilloud T. Protéomique clinique. 2006 .41.

Issaq HJ., Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D., The SELDI-TOF MS approach to proteomics protein profiling and biomarker identification. Biochem Biophys Res Commun 2002 ; 292 : 587-92.

Jung JW., Lee W., Structure-based functional discovery of proteins structural proteomics.J Biochem Mol. 2004. 37 : 28-34.

Klose J., Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik. 1975. 26 :231-243.

Langen H., BerndtP., Röder D., Cairns N., Lubec G., Fountoulakis M., Two-dimensional map of human brain proteins. Electrophoresis .1999.20 :907-916.

Lemay N. Caractérisation des facteurs de compétence de l'ovule bovin. Thèse de doctorat. 2008.

Lehmann S., Dupuy K., Peoc'H., RocheS., Baudin B., Présent et futur de la Protéomique clinique. Annales de Biologie Clinique. 2007. 65 (5) : 463-471.

Lehmann S., Roche S., Allory Y., Barthelaix A., Beaudeux JL., Berger F., Betsou F., Borg J., Dupuy A., Garin J., Preanalytical guidelines for clinical proteomics investigation of biological fluids. Annales de biologie clinique .2009. 67(6):629-639.

Lehmann S., Dupuy A., Beaudeux JL., Lizard G., Multiplexed analysis for identification and evaluation of novel biomarkers in biological fluids, tissue and cell extracts. Annales de biologie clinique .2009. 67(4):381-393.

Lehtine MK., The choroid plexus and cerebrospinal fluid .emerging roles in development disease and therapy. J Neurosci. 2013.33(45) :175-9.

Lescuyer P., Chevallet M., Rabilloud T., L'analyse protéomique : concepts réalités et perspectives en thérapeutique. Médecine sciences. 2004. 20 (5). : 587–592.

Liebler D C., Introduction to proteomics tools for the new biology. Totowa NJ Humana Press.2002.

Link AJ., Eng J., Schieltz DM., Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. Nature Biotechnol .1999 . 17 : 676- 82.

Liotta LA., Kohn EC., Petricoin EF., Clinical proteomics. personalized molecular medicine. 2001.286(18):2211-4.

Li-Thiao-Té S., Traitement du signal et images LC/MS pour la recherche de biomarqueurs. Mathématiques. École normale supérieure de Cachan. 2009.

Liu HL., Hsu JP., Recent developments in structural proteomics for protein structure détermination. Proteomics. 2005. 5 : 2056-2068.

Liuu S., Analyse protéomique ciblée à haute résolution un outil puissant pour le diagnostic clinique à partir de prélèvements de tissus amyloïdes bruts. Chimie-Physique. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. 2014.

Lopez F., Protéomique et spectrométrie de masse applications en clinique. Hépato-Gastro. 12. 2005.

Luche S., Santoni V., Rabilloud T., Evaluation of nonionic and zwitterionic détergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. Proteomics. 2003. 3 : 249-253.

Machour N., Gilbert D., Vittecoq O., Costa O., Tron F., Charlionet R., Proteomics and autoantibody. Medecine sciences .2005. 21(8-9):759-764.

Marinach-Patrice C., Pionneau C., Mazier D., Spectrométrie de masse en biologie médicale principes et applications. Bio tribune magazine .2012.40(1):4-12.

Mathelin C., Tomasetto C., Cromer A., Proteomics and breast cancer. Gynecologie obstetrique and fertilite .2006. 34(12):1161-1169.

Matondo M., inhibition du proteasome dans des cellules de leucemies aiguëës myeloides apport des approches proteomiques. Biochimie et Biologie cellulaire. Thèse de doctorat. 2008.

Maudelonde T., Boulle N., Mange A., Rey J M., Genomic and proteomic. clinical interest.

Miguet L., Nouvelles méthodologies dans l'analyse protéomique par spectrométrie de masse Application à la recherche de biomarqueurs dans le cadre des leucémies .2006.

Molloy MP., Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients.Anal Biochem. 2000. 280 : 1-10.

Moore BW., A soluble protein characteristic of the nervous system. Biochem Biophys Res Commun 1965 .19 : 739-44.

Mourot M., Identification de gènes de compétence ovocytaire chez la vache. Thèse de doctorat.2006.

Nilsson CL., Larsson T., Gustafsson E., Identification of protein vaccine candidates from Helicobacter pylori using a preparative two-dimensional electrophoretic procedure and mass spectrometry. Anal Chem .2000. 72: 2148-53.

O'Farrell PH., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem. 1975. 250 : 4007-4021.

Oshiro G., Wodicka LM., Washburn MP., Yates JR., Lockhart DJ., Winzeler EA., Parallel identification of new genes in Saccharomyces cerevisiae. Genome Res. 2002. 12 :1210-1220.

Ostanin AA., Aizikovich BI., Aizikovich IV., Kozhin AY., Chernykh FR. Role of cytokines in the regulation of reproductive function. Bull Exp Biol Med 2007. 143 : 75-9.

Ouni E., Vertommen D., Amorim A., La protéomique de l'ovaire humain – Partie 1. L'application de la protéomique dans la procréation assistée. 201823 (8).

Paladin D., Environnement de développement bioinformatique pour la génomique et la protéomique. .université laval québec .2006.

Palii C., Mitrofan L., Montreuil J., Artenie V., l'approche proteomique et ses applications. Secţiunea Genetică şi Biologie Moleculară. 2007.

Perrot A., Apport d'une approche protéomique dans l'étude des mécanismes d'activation de néoplasies lymphoïdes B. Médecine humaine et pathologie. Thèse de doctorat.Université de Lorraine. 2015.

Petricoin EE., Paweletez CP., Liotta LA., Clinical applications of proteomics pattern diagnostics. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2002(7) :433-440.

Pineau C., La protéomique : nouvelles approches en génomique fonctionnelle. Médecine de la reproduction. 2006. 8(6).

Pinet F., Cieniewski-Bernard C., Dubois E., Lamblin N., Beseme O., Chwastyniak M., Amouyel P., Bauters C., Protéomique et marqueurs cardiaques. Médecine Nucléaire .2007. 31(11):580-586.

Porquet D., Analyse protéomique stratégies méthodologiques et applications en biologie clinique SPECTRA BIOLOGIE .2005.145

Rabilloud T., Adessi C., Giraudel A., Lunardi J., Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis. 1997.18 : 307-316.

Rabilloud T., Strub JM., Luche S., van Dorsselaer A., Lunardi J., A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. Proteomics. 2001. 1 : 699-704.

Rifai N., Gillette M A., et Carr S A., Protein biomarker discovery and validation the long and uncertain path to clinical utility. Nature Biotechnology. 2006 .24(8) : 971–983.

Romanetto J., Interets des marqueurs biologiques dans les essais cliniques. Université henri poincare nancy1 .2011.

Sagi D., Kienz P., Denecke J., Marquardt T., Peter-Katalinic J., Glycoproteomics of Nglycosylation by in-gel deglycosylation and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry mapping application to congenital disorders of glycosylation. Proteomics. 2005. (5) : 2689-2701.

Service RF., Proteomics Protein chips map yeast kinase network Science. 2005. 307 :1854-1855.

Scaros O., Fisler R., Biomarker technology roundupfrom discovery to clinical applications a broad set of tools is required to translate from the lab to the clinic. Biotechniques. 2005:30-2.

Scheele GA., Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Charaterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. J Biol Chem 250.1975 : 5375-5385.

Schiltz O., Protéomique et Maladies Rares.2012.

Shufang W., Zhaohui K., Zhiyi Jet al. Proteome of mouse oocytes at different developmental stages.

Smine S., Obésité induite par un régime riche en lipides (HFD) et effet protecteur d'un extrait polyphénolique de raisin (GSSE) : approche protéomique. Biochimie, Biologie Moléculaire. Normandie Université. 2017.

Solassol J., Boulle N., Maudelonde T., Mange A., Clinical proteomics towards early detection of cancers. Medecine sciences. 2005. 21(8-9):722-729.

Solassol J ., Guillot B., Maudelonde T., Circulating prognosis markers in melanoma proteomic profiling and clinical studies. Annales de biologie clinique. 2011. 69(2):151-157.

Solary E., Clinical proteomics in oncology. Medecine sciences .2007. 1:3-4.

Spector R., Robert S., Johanson CE., Abalanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions .Focus on adult human. Neurol .2015.273 :57-68.

Sprinzak E., Sattath S., Margalit H., How reliable are experimental protein-protein interaction data ? J Mol Biol 327.2003 :919-923.

Spyratos F., Proteomic and breast cancer theory and practice SFSPM, Nancy, 2004

Steiner S., Aicher L., Raymackers J., Meheus L., Esquer-Blasco R., Leigh Anderson N., Cordier A., Cyclosporine A decreases the protein level of the calcium-binding protein Calbindin-D 28kDa in rat kidney. Biochemical Pharmacology .1996. 51. 253-258.

Tajiri M., Yoshida S., Wada Y., Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins Application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment. Glycobiology Sous presse. 2005.

Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. Mass Spectrometry.1988. (2) 151-153.

Thervet E., Protéomique et transplantation rénale Un exemple d'utilisation clinique Le Courrier de la Transplantation. 2005. (1).

Thygesen K., Mair J., Katus H., Plebani M., Venge P., Collinson P., Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. Eur Heart J .2010 . 31 : 2197-204.

Trocmé C., Baillet A., Gaudin P., La protéomique: comment cela fonctionne-t-il ? .Revue du Rhumatisme 2011.78: 173-177.

Wilkins M R., Appel R D., Van Eyk J E., Chung M C., Gorg A., Hecker M., Huber L A., Langen H., Link A J., Paik Y K., Patterson S D., Pennington SR., Rabilloud T., Simpson R J., Weiss W., Dunn M J., Guidelines for the next 10 years of proteomics. Proteomics.2006. 6(1): 4-8.

Wisztorski M., Lemaire R., Stauber J., Ait Menguellet S., Jardin-Mathe O., Day R., Salzet M., Fournier I., MALDI imaging: a new technology to discover and validate new biomarkers. Medecine sciences .2007. 1:31-36

Yin Z., Stead D., Selway L., Walker J., Riba-Garcia I., McLnerney T., Gaskell S., Oliver SG., Cash P., Brown AJ., Proteomic response to amino acid starvation in Candida albicans and Saccharomyces cerevisiae.Proteomics. 2004. (4). 2425-2436.

Zakiya T., Caractérisation épidémio- génétique de la population de Tlemcen par le cancer de l'ovaire .2016.

Zhu K., Kim J., Yoo C., High sequence coverage of proteins isolated from liquid separations of breast cancer cells using capillary electrophoresis-time-of-flight MS and MALDI-TOF MS mapping. Anal Chem 2003 ; 75 : 6209-17.

Annexe

Annexe 01

Molecular Human Reproduction, Vol.23, No.12 pp. 827–841, 2017
Advanced Access publication on October 23, 2017 doi:10.1093/molehr/gax056

molecular human reproduction

ORIGINAL ARTICLE

Protein profile of mouse ovarian follicles grown *in vitro*

Amandine Anastácio[1,2,*], Kenny A. Rodriguez-Wallberg[2,3,*], Solenne Chardonnet[4], Cédric Pionneau[4], Christian Fédérici[5], Teresa Almeida Santos[6,7], and Catherine Poirot[1,8]

[1]Université Paris VI (UPMC), 75005 Paris, France [2]Department of Oncology-Pathology, Karolinska Institutet and Laboratory of Translational Fertility Preservation, Cancer Center Karolinska (CCK), 171 76 Stockholm, Sweden [3]Reproductive Medicine, Department of Gynecology and Reproduction, Karolinska University Hospital, 141 86 Stockholm, Sweden [4]Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, Inserm, UMS Omique, Plateforme PSL, F-75013 Paris, France [5]IPS Proteomics Facility, Université Paris Descartes, 75014 Paris, France [6]Department of Human Reproduction, University Hospital of Coimbra, 3000-075 Coimbra, Portugal [7]Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3004-504 Coimbra, Portugal [8]Service d'Hématologie-Unité AJA, Hôpital Saint Louis, 75010 Paris, France

*Correspondence addresses: Department of Oncology-Pathology, Laboratory of Translational Fertility Preservation, Cancer Center Karolinska (CCK), R8:03, 171 76 Stockholm, Sweden and Department of Reproductive Medicine, Karolinska University Hospital, 141 86 Stockholm, Sweden. E-mail: kenny.rodriguez-wallberg@ki.se (K.A.R.-W.); amandine.anastacio@ki.se (A.A)

Submitted on January 19, 2017; resubmitted on August 28, 2017; editorial decision on October 11, 2017; accepted on October 16, 2017

STUDY QUESTION: Could the follicle proteome be mapped by identifying specific proteins that are common or differ between three developmental stages from the secondary follicle (SF) to the antrum-like stage?

SUMMARY ANSWER: From a total of 1401 proteins identified in the follicles, 609 were common to the three developmental stages investigated and 444 were found uniquely at one of the stages.

WHAT IS KNOWN ALREADY: The importance of the follicle as a functional structure has been recognized; however, up-to-date the proteome of the whole follicle has not been described. A few studies using proteomics have previously reported on either isolated fully-grown oocytes before or after meiosis resumption or cumulus cells.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: The experimental design included a validated mice model for isolation and individual culture of SFs. The system was chosen as it allows continuous evaluation of follicle growth and selection of follicles for analysis at pre-determined developmental stages: SF, complete Slavjanski membrane rupture (SMR) and antrum-like cavity (AF). The experiments were repeated 13 times independently to acquire the material that was analyzed by proteomics.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS: SFs ($n = 2166$) were isolated from B6CBA/F1 female mice ($n = 42$), 12 days old, from 15 L. About half of the follicles isolated as SF were analyzed as such ($n = 1143$) and pooled to obtain 139 μg of extracted protein. Both SMR ($n = 359$) and AF ($n = 124$) were obtained after individual culture of 1023 follicles in a microdrop system under oil, selected for analysis and pooled, to obtain 339 μg and 170 μg of protein, respectively. The follicle proteome was analyzed combining isoelectric focusing (IEF) fractionation with 1D and 2D LC-MS/MS analysis to enhance protein identification. The three protein lists were submitted to the 'Compare gene list' tool in the PANTHER website to gain insights on the Gene Ontology Biological processes present and to Ingenuity Pathway Analysis to highlight protein networks. A label-free quantification was performed with 1D LC-MS/MS analyses to emphasize proteins with different expression profiles between the three follicular stages. Supplementary western blot analysis (using new biological replicates) was performed to confirm the expression variations of three proteins during follicle development in vitro.

MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE: It was found that 609 out of 1401 identified proteins were common to the three follicle developmental stages investigated. Some proteins were identified uniquely at one stage: 71 of the 775 identified proteins in SF, 181 of 1092 in SMR and 192 of 1100 in AF. Additional qualitative and quantitative analysis highlighted 44 biological processes over-represented in our samples compared to the *Mus musculus* gene database. In particular, it was possible to identify proteins implicated in the cell cycle, calcium ion binding and glycolysis, with specific expressions and abundance, throughout in vitro follicle development.

LARGE SCALE DATA: Data are available via ProteomeXchange with identifier PXD006227.

© The Author 2017. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION: The proteome analyses described in this study were performed after in vitro development. Despite fractionation of the samples before LC-MS/MS, proteomic approaches are not exhaustive, thus proteins that are not identified in a group are not necessarily absent from that group, although they are likely to be less abundant.

WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS: This study allowed a general view of proteins implicated in follicle development in vitro and it represents the most complete catalog of the whole follicle proteome available so far. Not only were well known proteins of the oocyte identified but also proteins that are probably expressed only in granulosa cells.

STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S): This study was supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology, FCT (PhD fellowship SFRH/BD/65299/2009 to A.A.), the Swedish Childhood Cancer Foundation (PR 2014-0144 to K.A.R.-W.) and Stockholm County Council to K.A.R.-W. The authors of the study have no conflict of interest to report.

Key words: ovarian follicle / follicle development / in vitro growth / mouse / proteomics

Introduction

The development of successful systems for in vitro growth of ovarian follicles from the earliest stage until maturity is predicted to have an enormous impact on assisted reproductive treatments. In particular, the method is necessary for the increasing number of young cancer patients undergoing cryopreservation of ovarian tissue in clinical programs for fertility preservation, but for whom the risk of reintroducing of malignant cells precludes transplantation (Telfer and Zelinski, 2013). The best developed systems applied to mammalian follicles that can be translated to human follicle-culture systems have been achieved using mice, which have proved to be an excellent model for translational reproductive research, and live offspring have been obtained (Smitz and Cortvindt, 2002; Xu et al., 2006; Eppig et al., 2009). However, the current culture systems still need to be improved to increase the possibility of obtaining fully competent oocytes in humans (Telfer and Zelinski, 2013).

A series of biological processes is needed to achieve oocyte developmental competence for fertilization and embryo development (Picton et al., 1998). This competence is gained gradually during folliculogenesis, which is a highly complex process with several mechanisms and steps, which are not yet clear. After the activation of a primordial follicle, important changes occur such as granulosa and theca cell differentiation and proliferation. Simultaneously, the oocyte volume increases and it grows until it reaches the appropriate size to induce nuclear maturation, which finally allows fertilization and the development of a viable embryo (Gilchrist et al., 2004). In these processes, several critical steps, involving a cascade of molecular interactions, have been described with high transcriptional activity for synthesis of new proteins (Picton et al., 1998; Gilchrist et al., 2004; Eppig et al., 2005). However, not all mechanisms have been elucidated, and expanding our knowledge of protein expression during the early stages may add important information about the requirements for successful follicle development. Proteomic approaches allow the identification and characterization of proteins that are expressed in a cell. These approaches present several advantages over mRNA expression profiling since the presence of mRNA in a cell is not strictly correlated with protein expression (Ha et al., 2008).

Over the last decade, proteomic studies of female reproduction have essentially focused on oocyte maturation and early embryonic development of several mammalian species. In mice, the proteome of fully-grown oocytes obtained by superovulation before and after meiosis resumption has been reported, and the list of proteins identified is increasing (Ma et al., 2008; Zhang et al., 2009; Wang et al., 2010; Pfeiffer et al., 2011; Demant et al., 2012). Nonetheless, these studies report on proteins identified from isolated oocytes despite the essential role played by the bidirectional communication between oocyte and its surrounding cells in the follicle, which is required for oocyte growth and maturation (Matzuk et al., 2002). In mice, Meng et al. (2007) have investigated the surrounding follicle cells using mature cumulus-oocyte complexes (COC). However, at this stage of development, the cumulus cells are further differentiated from the previous granulosa cells due to the disruption of intercellular connections and consequent expansion occurring during ovulation (Hawkins and Matzuk, 2010).

To date, no study of the whole follicle proteome has been reported in any species. Our study was designed to identify proteins expressed in the follicular unit during its growth and development. For this purpose, an experimental model for mouse in vitro follicle development was used, which allows the growth and maturation of oocytes from secondary stage follicles up to fertilizable oocytes (Cortvindt et al., 1996). This system was preferred over several newly developed culture systems as it has been validated by obtaining live offspring and because it permits continuous follicle observation (Cortvindt et al., 1996; Smitz and Cortvindt, 2002; Picton et al., 2008), which makes it possible to detect even slight morphological changes indicative of follicle development at the three pre-determined morphological stages we attempted to investigate.

Material and Methods

Animals

All animal experimentation described was previously approved by the University Pierre et Marie Curie and conducted in accordance with accepted standards of humane animal care.

B6CBAF1/J female mice (n = 42), 12 days old, obtained from Charles River®, Lyon, France were sacrificed by cervical dislocation. The ovaries were collected to a 37°C warmed dissection medium (Leibovitz L15 (Gibco®, Cergy-Pontoise, France) enriched with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco®), 100 UI/ml penicillin (Sigma-Aldrich®, Saint Quentin Fallavier, France) and 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich®).

Preantral ovarian follicle isolation, culture and selection of follicles for analysis

Ovarian follicles were isolated by mechanical dissection under stereomicroscope (Nikon®, France) using 27 gauge needles (Sherwood

Medical®, Evry, France), ensuring that the follicular structure remained intact. Secondary follicles (SFs) with a diameter between 100 and 130 µm, a clearly visible round and central oocyte, two or more granulosa-cell layers, and some adhering theca cells were analyzed as such or put in culture to obtain follicles with a complete Slavjanski membrane rupture (SMR) and antrum-like follicles (AF) (Fig. 1a). The SMR stage was obtained between Days 6 and 9 of culture, when a complete rupture of the Slavjanski membrane and the expansion of granulosa could be observed, as signs of growing follicles. The AF stage was collected at the end of the culture (Day 12) when the follicles reached a diameter of at least 500 µm and a space within the granulosa-cell layers was visible, corresponding to the antrum formation in vivo.

Isolated SFs were cultured individually in 20 µl microdrops, 10 per Petri dish, covered by mineral oil (Sigma-Aldrich®, Saint Quentin Fallavier, France) in an atmosphere containing 5% CO_2 at 37°C. An α-minimal essential medium with glutaMAX (α-MEM GlutaMAX, Gibco®) supplemented with 5% FBS (Gibco®), 10 µg/ml transferrin (Boehringer Mannheim®, Meylan, France), 5 µg/ml insulin (Boehringer Mannheim®) and 100 mIU/ml recombinant follicle stimulating hormone (rFSH, MSD®, Puteaux, France) was used. The follicles were observed daily using an inverted microscope (Nikon®) at a magnification of ×100 or ×200 to observe morphological characteristics and follicular size. Two perpendicular diameters were taken using a calibrated ocular micrometer (Nikon®). Follicular diameter was estimated by measuring the granulosa-cell mass, but not the theca cells. From Day 2 onwards, half of the culture medium was refreshed.

All follicles recovered for the study were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS, Gibco-BRL®), dried and stored at −196°C until needed.

Proteomic analysis

The chemicals and material used for proteomic analysis were purchased from Sigma-Aldrich® (Saint Quentin Fallavier, France) and GE Healthcare® (Vélizy, France), unless otherwise indicated.

Protein extraction

Protein extraction was performed by adding 15 µl/vial of lysis buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 1% 3-[3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 0.5% 3-(Decyldimethylammonio) propanesulfonate inner salt (SB3–10), 0.5% Triton × 100, 10% isobutanol, 50 mM dithiothreitol (DTT) and 0.5% ampholyte 3–10. After 2 × 5 min of sonication and 45 min of 20–000 × g centrifugation at 4°C, the supernatants were collected and identified as total protein extract (TPE). Protein concentration was measured three times for each sample using the Bradford assay (Bradford, 1976) (Biorad®, France), and samples were stored at −80°C until use.

Protein fractionation

For each group, 100 µg of TPE was loaded into Immobilized pH gradient (IPG) Immobiline DryStrips (7 cm, pH 4–7) (Fig. 1b). Isoelectrofocusing (IEF) migration was performed on an Ettan IPGphor II isoelectric focusing (IEF) system, with a multistep program: 50 V for 1 h, 200 V for 1 h, gradient 200–1000 V in 45 min, 1000 V for 45 min, gradient 1000–4000 V in 1 h and 4000 V for 3 h. Following isoelectric migration, the strips were treated in a reduction buffer (6 M Urea, 75 mM Tris pH 8.8, 30% glycerol, 2% SDS, 65 mM DTT) for 15 min, followed by 15 min in an alkylation buffer (6 M Urea, 75 mM Tris pH 8.8, 30% glycerol, 2% SDS, 135 mM iodoacetamide). Each strip was then cut into five equal pieces using a scalpel blade (1 cm of the acidic end of the strip was discarded). Proteins from each strip fraction were extracted with a short stacking migration (1 h at 10 mA) in an SDS-PAGE gel, 12% acrylamide. Proteins from TPEs (10 µg) were stacked in the same way. Gels were stained with Coomassie Blue R-250, using Imperial Protein Stain (Pierce, Thermo Fischer Scientific®, Courtaboeuf, France) (Fig. 1b). Thus, for each group, six fractions (five obtained by protein fractionation and one corresponding to TPE) were treated and analyzed in parallel.

In-gel tryptic digestion

For each fraction, a unique large band was excised and cut into several 1 mm^3 cubes (Fig. 1b). Gel pieces were destained with a 25 mM ammonium bicarbonate (AmBic) in 50% ethanol solution, dehydrated in acetonitrile (ACN) and dried at room temperature. Gel slices were then rehydrated with 70 µl of trypsin solution (200 ng/µl in 50 mM AmBic) on ice for 30 min and incubated overnight at 37°C. Supernatants were collected in new tubes, and the gel pieces were incubated twice with 60% ACN in 0.1% trifluoroacetic acid to extract the remaining peptides. The extracts were concentrated and dried in a Speed-Vac (Thermo Fischer Scientific®), and then resuspended in 40 µl of 30% ACN with 0.1% formic acid (FA) and stored at −80°C until MS analysis.

LC-MS/MS analysis

Peptide samples were desalted using Zip-Tip C18 pipette tips (Millipore®, Fontenay sous Bois, France), following the manufacturer's instructions. Two configurations of high-performance liquid chromatography (HPLC) were used for LC-MS/MS analysis: 1D LC-MS/MS and 2D LC-MS/MS. The nanoHPLC (Ultimate 3000, Thermo Fischer Scientific®) was coupled to an ion trap mass spectrometer (MS) (HCTultra, Bruker® (Bremen, Germany)) used in the positive mode with the selection of eight precursors from each MS spectrum for fragmentation by collision-induced dissociation. Six serial injections were performed for each fraction of each group, four in 1D LC-MS/MS and two in 2D LC-MS/MS.

In the 1D configuration, peptide mixtures were concentrated and desalted for 5 min on a precolumn C18 (5 mm, 300 µm i.d., 100 Å, Dionex) with a mobile phase A1 (2% ACN/0.1% FA) at a flow rate of 20 µl/min. Then, the peptide mixtures were separated and eluted on an analytical column RP-C18 (15 cm, 75 µm i.d., 100 Å, Dionex) at a flow rate of 200 nl/min, using 2–30% gradient buffer I (95% ACN, 0.1% FA).

In the 2D configuration, peptides were first separated by sequential elution from a silica capillary column strong cation exchanger (SCX, 15 mm, 300 µm i.d., Dionex) with 20 µl of 0, 20, 30, 50, 100 and 1000 mM of ammonium acetate. Each of these salt steps was then treated as was the 1D approach.

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD006227.

Data analysis

Protein identification

Tandem mass spectra data were searched against the Uniprot KB mouse database (June 2012) using XtandemPipeline V 3.3.2 (http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/), taking into consideration trypsin as the cleavage enzyme, carbamidomethylation of cysteine residues as a fixed modification and methionine oxidation as a variable modification, a peptide mass tolerance of 0.5 Da and a charge of +2 or +3.

Proteins identified were only validated if they had at least one unique peptide, a P-value < 0.05 for peptides and a P-value < 0.003 for proteins, and a false discovery rate lower than 1%.

GO analysis

Gene Ontology (GO) was performed using the PANTHER 8.1 (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationship) classification system

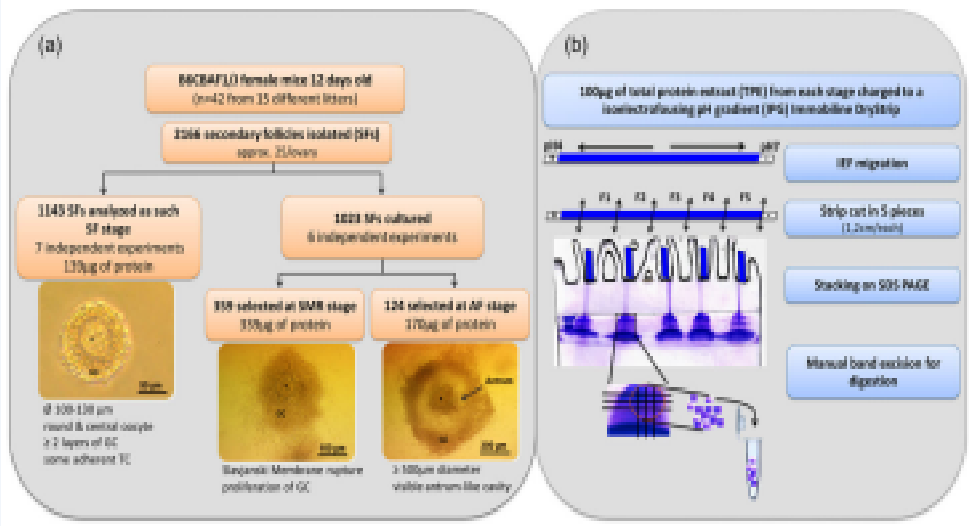

Figure 1 Schematic chart indicating (a) Type and numbers of animals used in the study and numbers of secondary follicles (SFs) that were isolated and cultured in repeated independent experiments. From culture, follicles were collected when Slavjanski Membrane Rupture (SMR) was observed or antrum-like cavity (AF). Morphological characteristics of the follicles selected at each stage are illustrated indicating: size, visible oocyte (O), granulosa cells (GC) theca cells (TC) and the presence of antrum (black arrow). The quantity of pooled protein obtained from selected follicles at each stage is also indicated. (b) Schematic description of how the total protein extract (TPE) from each follicle stage was fractionated by isoelectric focusing (IEF) with stacking in SDS-PAGE gel and manual band excision for digestion.

(http://www.pantherdb.org). Data were divided into protein classes and biological processes. A statistical over-representation test was performed to highlight biological processes over-represented in our samples. The Bonferroni correction for multiple testing was used.

Label-free quantification

For label-free quantitation, Bruker® raw data files from 1D LC-MS/MS acquisitions were imported into the Progenesis LC-MS software version 4.1.4832.42146 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) for feature detection, alignment and quantification.

For each group, the acquisitions were aligned according to retention time, using a combination of automatic and manual alignment. Peptide peak picking was undertaken with an absolute ion-intensity threshold of 100 000, a maximal ion charge state of 3 and a retention time ranging from 25 to 100 min. MS/MS peak lists were generated with the 100 most intense fragment-ion peaks. For a given peptide, only the five most intense MS/MS spectra were used to generate MS/MS peak lists, which were exported as mgf files. Protein identification was conducted using in-house Mascot software version 2.2.07 (Matrix Science, London, UK) against the *Mus musculus* proteome set (release 2013–05, containing 50 807 sequences) from SwissProt/Trembl database, and using the same parameters as above for protein identification. Mascot search results were imported back into Progenesis software to link the identified peptides to the detected abundances of those peptides. Any peptides identified with a Mascot score lower than 33 (significance threshold of $P < 0.05$) were removed. The protein quantitation was made using non-conflicting peptides. Only proteins with a fold-change >2 between the groups (ANOVA P-value < 0.05), and with at least two peptides with significant changes (ANOVA q-value < 0.05 and fold-change >2), were accepted.

Bioinformatics analysis

To identify biological pathways and networks that were significantly represented in our proteomic datasets, Ingenuity Pathways Analysis (IPA; Ingenuity Systems, Qiagen Company, Redwood City, CA, USA) and Pathway Studio (Elsevier, BV, New York, NY, USA) were used.

The IPA maps protein networks using an algorithm based on molecular function, cellular function and functional group. Path Designer completes the research workflow from data analysis through the creation of images able to suggest a summary of networks selected. Fisher's exact test was used to calculate the P-value determining the probability of each biological function or pathway being assigned by chance. In the test, $P \leq 0.05$ was used, and only networks scoring ≥2, which have >99% confidence of not being generated by chance, were selected.

In Pathway Studio, the proteins identified were submitted to the 9.0 ResNet Mammal database from Elsevier, which concerns biological and ontological interactions and pathways.

Western blotting

Western blotting was performed in a new biological replicate for each group and repeated three times for each protein. Protein extraction and quantification were performed as described above. From the TPE, 5 μg of protein was loaded per well in NuPAGE®4–12% Bis-Tris Gel (Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA). After running the gel according to the XCell SureLock® Mini-Cell protocol, proteins were transferred to a PVDF membrane. The membrane was then blocked for at least 30 min with StartingBlock Blocking Buffer (Pierce®, Carlsbad, CA, USA). The blots were then probed with monoclonal mice PKA, (ab75996, 1:1000 dilution), monoclonal mice LDHB (ab85319 1:10 000 dilution) and monoclonal rabbit p27 (ab92741, 1:1000 dilution) all from Abcam® (Cambridge, UK)

overnight at 4°C. The blots were then washed and probed with the secondary antibody (anti-rabbit or anti-mouse HRP conjugated, 1:10 000 dilutions, GE Healthcare®, Uppsala, Sweden). West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce®) was used to detect the signal from the blot. Band intensity was calculated on a recurring basis using Image Lab Software from BioRad®.

Results

Proteome of ovarian follicles grown *in vitro*

Fractionation of the TPE from the AF stage allowed the identification of 3.3 times more proteins than when only the TPE was analyzed (Fig. 2a). The quality of the fractionation method was demonstrated by the low overlap of proteins identified in several fractions, with 79% of the proteins being only identified in one fraction (Fig. 2b). The four serial injections performed in the 1D LC-MS/MS configuration allowed the identification of 600 proteins in SF, 737 in SMR and 710 in AF. The two serial injections in the 2D LC-MS/MS configuration allowed an increment in the number of proteins found in follicles of all stages. The increases were thus substantial and 25.2, 40.2 and 47.5% more proteins could be identified in SF, SMR and AF, respectively.

The combination of these two configurations made it possible to further increase the number of proteins identified and therefore to obtain a more complete protein profile in each stage, with 775 proteins identified in SF, 1092 in SMR and 1100 in AF (Supplementary Table S1).

Of the identified proteins, 609 (43.4%) were common to the three developmental stages, whereas 348 (24.8%) were common to two stages of development and 444 proteins were identified in a single stage: 71 (5.1%) in SF, 181 (12.9%) in SMR and 192 (13.7%) in AF (Fig. 2c). From a total of 1401 different proteins identified in the follicle, 290 proteins had not been previously described in proteomic studies of metaphase II oocyte (MII), germinal vesicle oocyte (GV) or COC (Fig. 3). The list of the proteins herein obtained can be consulted in Supplementary Table S2.

GO analysis

Proteins identified in each stage were assigned to protein class and biological process using PANTHER GO analysis.

For the three stages, GO analysis distributed the hit genes in 22 protein classes (Fig. 4a). Most proteins identified in the three stages were classified as nucleic binding proteins (18–22%). Thereafter, the four protein classes with more proteins attributed were enzymes: hydrolases, oxidoreductases, transferases and enzyme modulators. These classes together corresponded to ~45% of the proteins identified at SF and SMR, and to 40% of the proteins identified at AF. Cytoskeletal proteins represented 8–9% of the proteins identified in the three stages, and chaperones, transcription factors and proteases represented about 5% each. The remaining 13 classes each had <5% proteins assigned in all groups (Fig. 4a).

Concerning biological processes, 487 proteins from SF, 701 from SMR and 670 from AF were assigned to the metabolic process cluster. This represented more than 60% of the proteins at every stage of development. Cellular process, transport and specifically protein transport, cell cycle and cell communication were also clusters with numerous proteins assigned (Fig. 4b).

In spite of similar biological-process distribution between the stages, some were shown to be predominant in a given stage when compared to the whole gene Mus musculus database (Supplementary Table S3).

At the SF stage, a total of 77 identified proteins could be matched to the cluster cellular component organization, wherein 57 and 7 proteins were assigned to cellular component morphogenesis and mitochondrial transport, respectively. These subclusters were over-represented only in the SF stage, along with anatomical structure morphogenesis and RNA localization.

Within metabolic processes, ferredoxin and pyrimidine metabolic processes were over-represented in SMR, with 15 and 6 proteins assigned, respectively, while the vitamin metabolic process, with 10 proteins identified, was most prominent in AF. Metabolic processes associated to glycogen, fatty acids and DNA—in particular, DNA replication—were over-represented at SMR and AF stages, but not at SF stage.

Over 20 other biological processes were significantly over-represented in the three follicle groups of the study, which included: cell cycle, more specifically mitosis within the cellular process; generation of precursor metabolites and energy; protein metabolic processes, including protein-folding; carbohydrate metabolic processes; translation; and nuclear and protein transport (Supplementary Table S3).

Protein-network analysis

During follicular development, granulosa-cell proliferation and differentiation are essential to achieve oocyte maturity and competence. Culture conditions directly affect granulosa-cell health and proliferation, as well as cell stress and apoptosis levels (Eppig et al., 2000; Picton et al., 2008). In the samples, proteins with apoptosis or DNA repair were not over-represented in any of the groups. However, metabolic processes related to reactive oxygen species (ROS) were over-represented in all three stages. Pathway Studio analysis associated 112 proteins identified in this study with ROS generation (Fig. 5b). From these, 59 were identified at SF (52.7%), 98 at SMR (87.5%) and 96 at AF (85.7%). For the 95 proteins attributed by this bioinformatics analyser to DNA repair (Fig. 5a), the distribution between the three stages was similar to that found for proteins associated to ROS generation. For apoptosis and DNA repair biological processes, fewer proteins were identified at SF stage compared to the other two stages, and more proteins were identified in SMR stage.

Through IPA analysis, proteins involved in cell-cycle processes, with a particular focus on a cyclin-dependent kinases (CDKs) network, were highlighted. Indeed, 12 proteins, including CDKs and related proteins, exhibited a particular expression in the three stages (Fig. 6). At the SF stage, four of those proteins, such as S-phase kinase-associated protein 1 (SKP1), F-box/WD repeat-containing protein 12 (FBXW12), breast cancer type 2 susceptibility protein homolog (BRCA2) and Ubiquitin-associated protein 2-like (UBAP2L), were identified, even if cyclins were not (Fig. 6a). At the SMR stage, three of the four cyclins from this network were identified, namely, CDK 1, 4 and 6. Four other proteins that are directly or indirectly associated with those CDKs were also detected at the SMR stage, such as CDK5 regulatory subunit-associated protein 3 (CDK5RAP3), Forkhead box protein O1 (FOXO1), UDP-N-acetylglucosamine-peptide N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa subunit (OGT) and fibronectin (FN1),

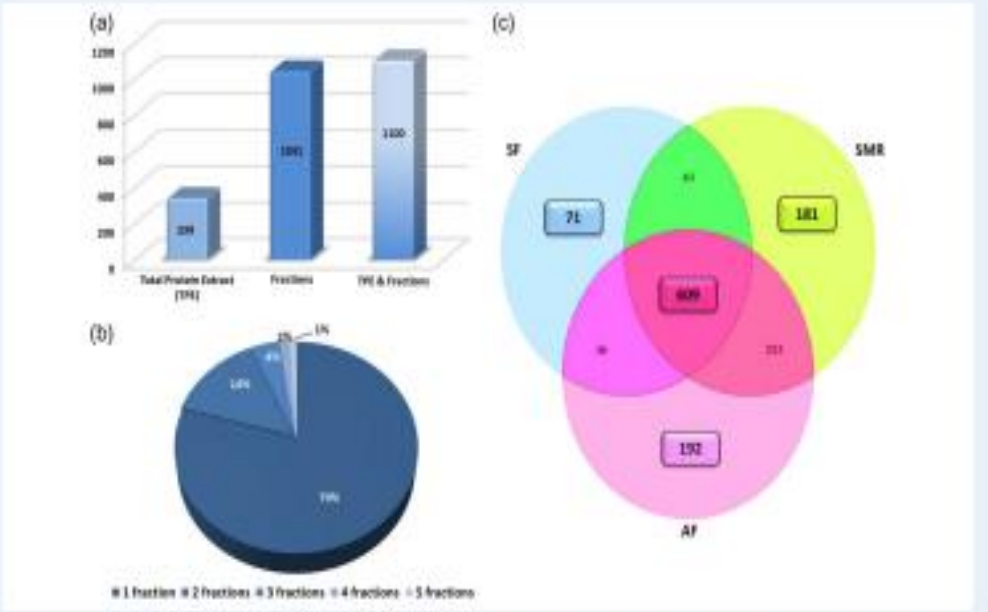

Figure 2. Fractionation was performed to increase the likelihood of obtaining a higher number of identified proteins in the samples. The figure illustrates this by showing: (a) the number of proteins identified in AF stage analyzing either only TPE or only the Fractions, and the combination of both; (b) the percentage of proteins identified in one single fraction, or in 2, 3, 4 or 5 fractions and (c) a Venn diagram of proteins identified in ovarian follicles. The blue circle contains proteins identified at the SF stage; the green circle contains proteins identified at the SMR stage; and the purple circle contains proteins identified at the AF stage.

Figure 3. Venn diagram comparing the mouse follicle proteome found in this study and the proteome of metaphase II oocytes (MII) (Ma et al., 2008; Zhang et al., 2009; Wang et al., 2010; Pfeffer et al., 2011), germinal vesicle oocytes (GV) (Wang et al., 2010; Demant et al., 2012) and cumulus-oocyte complex (COC) (Meng et al., 2007).

in addition to the four proteins already detected at SF stage (Fig. 6b). At the AF stage, a cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B) was identified. Consequently, other proteins connected with this inhibitor and identified in the previous stages were no longer observed, such as the three CDKs, SKP1/SKP2, FBXW12, BRCA2, FOXO1, OGT and UBAP2L. This illustrated a complete reversal of the CDK network protein profile at this stage (Fig. 6c).

Analysis of protein-abundance in the three developmental stages

Label-free quantification was performed on 1D LC-MS/MS data (incompatible with 2D LC-MS/MS data) in order to emphasize protein-abundance variations during in vitro follicle development. Differential levels of expression were found to be significant for 57 proteins between the three stages (Table I) and were distributed into five distinct abundance profiles (Fig. 7).

Fifteen proteins had their maximal abundance at the SF stage (Fig. 7 P1). Of these, 11 had significant variations between this stage and the other stages, including 7 proteins associated with the oocyte, such as zona pellucida sperm-binding proteins 2 and 3 (ZP2 and ZP3), oocyte-expressed protein homolog (OOEP), KH domain-containing protein 3 (Fils), transducin-like enhancer protein 6 (TLE6), protein-arginine deiminase type-6 (PADI6) and phospholipase A2, group IVC (Pla2g4c). In this same profile type, it was also possible to observe two proteins with a significant variation between SF and SMR stages, but not in AF stage. The two remaining proteins had a significantly lower abundance at the AF stage compared to the SF and SMR stages (Table I).

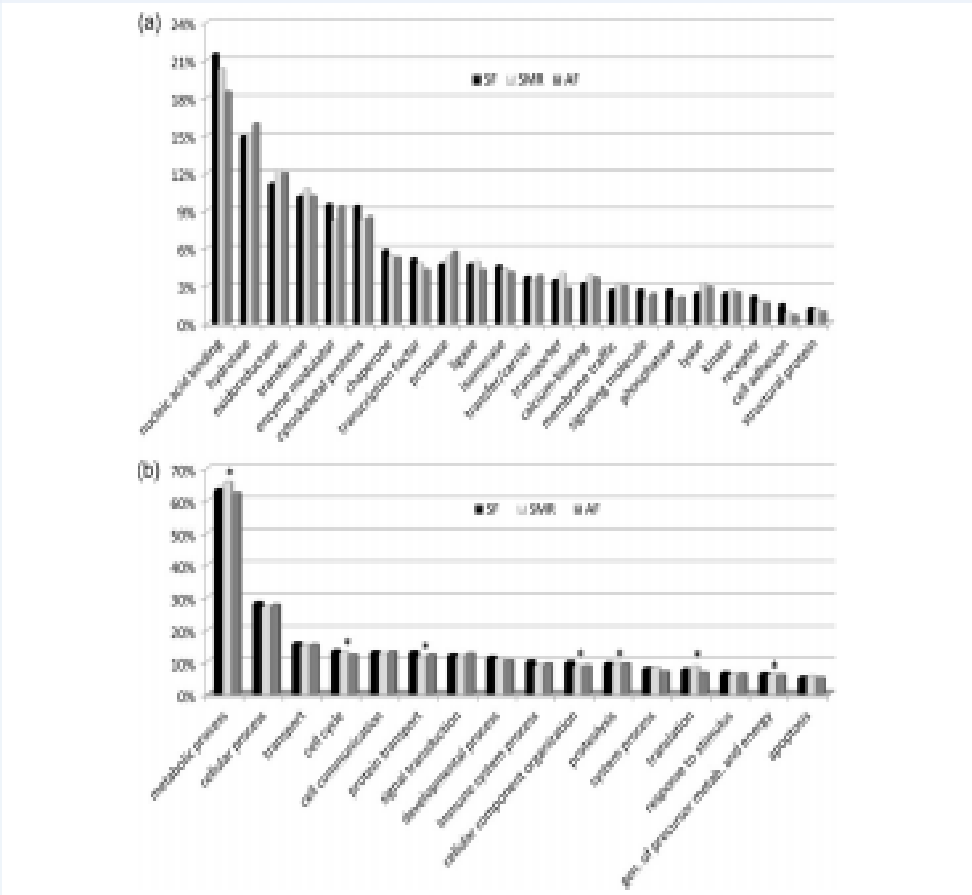

Figure 4 Gene Ontology (GO) analysis of the proteins identified at the three stages. (a) Distribution of the proteins identified for each group according to PANTHER protein class. (b) Functional classification based on Biological Processes. *Signifies biological process over-represented in samples when compared to the whole mouse genome.

From the five proteins with the highest abundance at the SMR stage, which characterize profile 2 (Fig. 7 P2), three calcium ion-binding proteins, calreticulin (CALR), calumenin (CALU) and myosin light polypeptide 6 (MYL6), were significantly less abundant in the other stages. The other two proteins varied between the SMR and AF stages.

A gradual increase in protein-abundance throughout the three stages was the most frequent profile observed, with 28 fitting proteins (Fig. 7 P3). Conversely, the profile with a lower abundance at SMR stage compared to SF and AF stages, with two proteins, was the less frequent profile (Fig. 7 P4).

At AF stage, seven proteins had their maximal abundance, with a significant variation between this stage and the other two (Fig. 7 P5). Two of these proteins are enzymes implicated in glycolysis: alpha-enolase (ENOA) and phosphoglucomutase-1 (PGM1), and a third, fatty acid-binding protein (FABP5), is a glucose transporter. A regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinases involved in cAMP signaling in cells (named PKAR2B) was also particularly abundant at this stage.

Moreover, by analyzing the list of 57 differentially expressed proteins, IPA suggested that glycolysis was the top canonical pathway, with nine proteins involved in this pathway. Eight showed a regular increase during follicle development, with maximal expression at AF stage. Conversely, the remaining protein, L-lactate dehydrogenase chain B (LDHB), had a maximal expression at SF stage and decreased during development (Fig. 8).

Protein-abundance results were validated by western blot analysis of selected proteins, namely PKAR2B and LDHB (Fig. 9).

Discussion

Previous studies of ovarian proteomics have used isolated oocytes obtained after superovulation and mainly investigated oocyte maturation. The oocytes thus obtained are fully grown and often present the maturity signs of meiosis resumption (Metaphase II oocytes). However, oocyte competence for maturation, fertilization and embryo

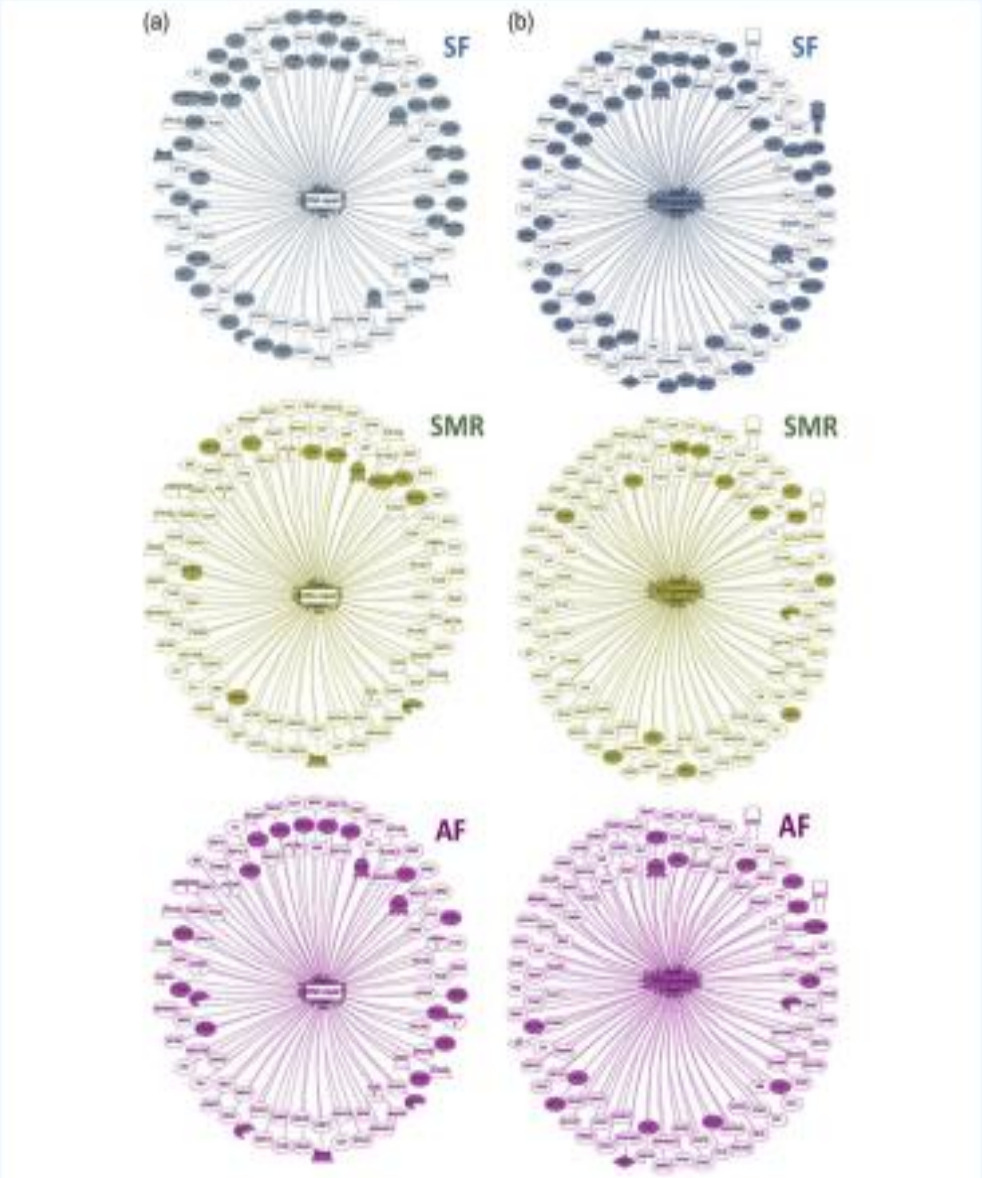

Figure 5 Follicle proteins identified related to (a) DNA repair and (b) ROS generation. The images were generated by Pathway Studio. Proteins identified are shown using white background and non-identified using color background.

development is slowly acquired during oocyte development, and it is highly dependent on the interactions between the oocyte and its surrounding cells, their specialization and functioning (Picton et al., 1998; Gilchrist et al., 2004); hence, there is interest in investigating the growth of the complete follicle unit at early stages and following its development.

The choice of the three follicle stages analyzed in this study was based on morphological characteristics previously described when a microdrop culture system is used. The culture system chosen in this study has been previously validated, as live offspring have been obtained, and it allows continuous observation of follicle growth to select morphologically appropriate follicles for the study from the SFs

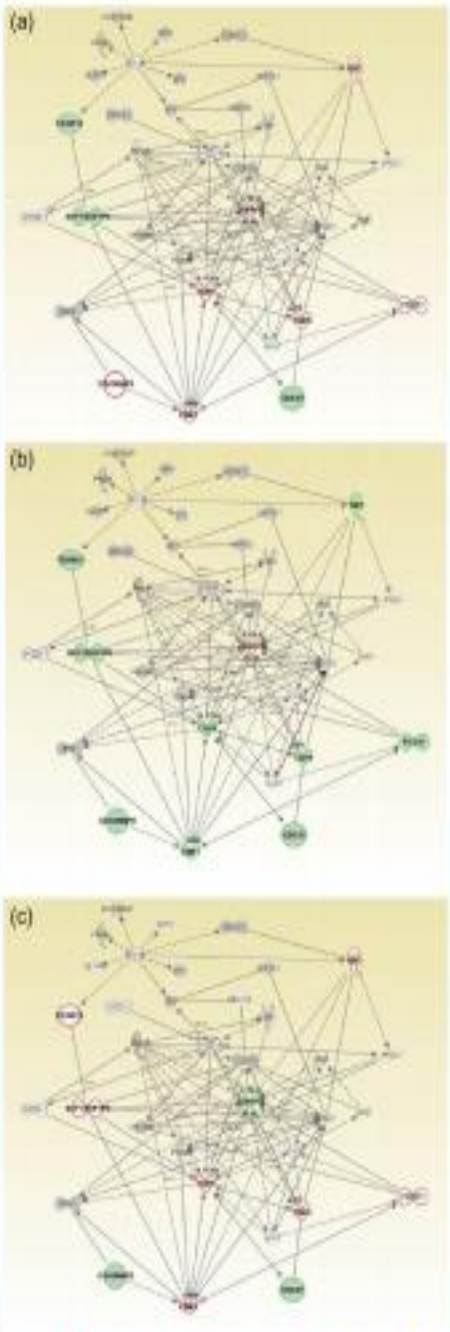

Figure 6 CDKs and related protein interactions underlined by Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Proteins in gray were detected in the samples, and those in white were not. This network showed 12 proteins whose expressions were different between the three stages: (a) SF stage, (b) SMR stage and (c) AF stage. Proteins surrounded in green indicate they were identified at that stage; proteins surrounded in red were not identified.

up to the stage of pre-ovulatory follicle (Cortvrindt et al., 1996; Picton et al., 2008).

Follicle proteome analyses and biological processes identified

We attempted to seek potential biological developmental markers of the entire functional follicle structure, rather than to study different cell types individually. By applying a combined 1D and 2D LC-MS/MS analysis, preceded by in-gel IEF fractionation in this study, it was possible to increase the number of proteins identified in follicles. Hence, 1401 different proteins were successfully identified, representing, to the best of our knowledge, the first protein profile of the whole ovarian follicle unit. Interestingly, the qualitative and quantitative analysis of the data pointed out not only biological processes but also proteins which seem to have a particular behavior throughout follicle growth.

GO analysis showed a similar distribution in all three stages for protein classes and biological processes. As in previous studies concerning the oocyte proteome, most proteins identified were assigned to metabolic processes, followed by cellular processes, transport and cell communication (Meng et al., 2007; Ma et al., 2008; Zhang et al., 2009; Wang et al., 2010; Pfeffer et al., 2011; Demant et al., 2012). However, it was observed that, compared to the whole *Mus musculus* genome, 44 biological processes were over-represented in the current study's samples. More than 20 biological processes were over-represented simultaneously in all three stages, with special emphasis on the cell cycle, particularly mitosis. Indeed, IPA emphasized the variable expression of twelve proteins involved in the cell cycle throughout the three stages. We observed that at the SF stage only 4 of the 12 proteins, with expression variation in the CDK network suggested by IPA, were identified. In particular, CDKs themselves were not detected. This is consistent with the fact that, at this stage, the follicle has only a few granulosa-cell layers, and consequently, the mitotic activity is lower than in other stages of development.

Conversely, the highest mitotic activity happened at the SMR stage, with an extremely high level of proliferation of granulosa and theca cells. This was underlined by identification of eleven of the 12 proteins associated with the cell cycle. The identification of the CDKs only at this stage sustains the intense mitotic activity of somatic cells in the growing follicle, because these proteins, when connected with cyclins, are responsible for cell-cycle progression and consequently granulosa-cell proliferation (Sherr, 1994; Coquerel, 2002; Shimizu et al., 2013). FOXO1, also only identified at SMR stage, was previously described as being specifically expressed in the granulosa cells of growing follicles (Tarnawa et al., 2013), with lower levels of expression in antral and Graafian follicles (Shi and LaPolt, 2003). It was also described as regulating the gene expression associated with proliferation, apoptosis and homeostasis of granulosa cells in culture (Park et al., 2005; Liu et al., 2009, 2013). Furthermore, CDKs 4/6 and FOXO1 have not been previously reported in the proteome of isolated oocytes or COC, suggesting that they are only expressed in granulosa cells, or at least they are more abundant before ovulation.

A reduction in granulosa-cell proliferation at Day 9 of ovarian follicle culture was previously described (Petty et al., 2007), indicating that even if the follicle is still increasing in size, mitotic activity decreases from that day onward. In the present study, the same behavior was highlighted by the identification of cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B), also known as p27Kip1, only at the AF stage. This protein

prevents the formation of cyclin E-CDK2 and cyclin D-CDK4/CDK6 complexes, resulting in inhibition of cell-cycle progression and cell proliferation (Bayrak and Olcay, 2003; Rajaneddy et al., 2007). In addition, the SPK1/SPK2 complex, which is known to be involved in CDKN1B degradation, was not identified at this stage, although it was detected in previous stages analysed. Since CDKN1B has been described as being detected in granulosa cells at all stages of follicular development, the current study's results showed that this protein is more abundant at AF stage compared to the other stages (Fig. 9). Moreover, previous studies showed the important role of this protein in follicle luteinization and ovulation (Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al., 1996), so it could be suggested as a marker for culture and follicle quality.

Nuclear and protein transport, generation of precursor metabolites and energy, carbohydrate metabolic process, protein-folding and translation were other biological processes over-represented in the three stages. These results are consistent with the major role of interaction between the granulosa cells and the oocyte, as well as the high levels of transcription, inducing expression of proteins needed for follicular and oocyte growth and acquisition of molecular capacities for future events.

Otherwise, some biological processes seemed to be more relevant to a specific stage of development since they were only over-represented in one of the development stages chosen for this study. In particular, the biological processes related to ferredoxins were only over-represented in SMR stage, and it was also only at this stage that adrenoxin (FDX1), called ferredoxin 1 in humans, was identified. Ferredoxin 1 is described as being involved in steroidogenesis (Miller, 2005) and it seems that transcription of this protein increases with the level of cAMP (Imamichi et al., 2013). This could be an indicator of steroidogenesis activity increasing in developing follicles. These results are consistent with estradiol secretion studies in ovarian follicles in culture, which associated secretion with cellular proliferation, describing a stabilization or decrease of estradiol secretion associated with a reduction in granulosa-cell proliferation (Boland et al., 1993; Liu et al., 2002; Dorphin et al., 2012).

The over-representation of metabolic processes related to glycogen and fatty acids at both SMR and AF stages supported the information from a previous study suggesting that these metabolic processes have an increasing role throughout follicular development (Collado-Fernandez et al., 2012).

Analysis of protein-abundance in the three developmental stages

Different levels of expression between the three stages were observed for 57 proteins. The majority of the proteins that were more abundant in SF stage are expressed in the oocyte, such as the glycoproteins ZP2 and ZP3 (Epifano et al., 1995), oocyte- and embryo-abundant PAD (PADI6) (Wright et al., 2003) and three protein members of the subcortical maternal complex (SCMC): OOEP, Filia (KHDC3) and TLE6 (Li et al., 2008). Although these proteins have been shown to increase during oocyte development (Epifano et al., 1995; Wright et al., 2003; Li et al., 2008; Zheng and Dean, 2009; Yurttas et al., 2010), their expression decreased when looking at the entire follicle during in vitro development. This is consistent with the higher representation of oocyte proteins in SF stage follicles when compared to the later stages where granulosa-cell growth is predominant and their proteins become much more abundant.

At the SMR stage, quantification analysis pointed out calcium-associated proteins, which is one of the most ubiquitous signaling molecules and which controls a wide variety of cellular processes. Calreticulin (CARL) is the major Ca^{2+}-binding chaperone in oocytes (Zhang et al., 2010). Accumulating evidence has found that intracellular free Ca^{2+} plays an important role in regulation of the meiotic maturation of oocytes and early embryonic development (Homa et al., 1993; Sousa et al., 1997; Whitaker, 2006). In the current study, quantitative analysis of the proteome revealed that this protein, as well as other calcium-binding proteins, such as calumenin (CALU) and myosin light protein 6 (MYL6), were more abundant at the SMR stage. This suggests that calcium exchanges in the follicle may have a relevant role at this point in development.

Quantitative analysis also highlighted carbohydrate metabolism, particularly glycolysis, which is described as an important pathway for glucose utilization by larger follicles, as an important biological process in follicle development (Harris et al., 2007; Xu et al., 2009; Collado-Fernandez et al., 2012). Glycolysis is required for follicle growth and estradiol secretion, and it is the main source of ATP in mouse preantral follicles in vitro (Boland et al., 1994b; a). It was possible to identify several proteins involved in this pathway, such as pyruvate kinase M2 (KPYM), PGMI, L-lactate dehydrogenase chains A and B (LDHA, LDHB), fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA), alpha and gamma enolase (ENOA, ENOG), ADP glucokinase (ADPGK), GAPDH, triosephosphate isomerase (TPIS), 6-phosphofructokinase type C (K6PP), glucose-6-phosphate (G6PDI) and phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1). The abundance for nine of these proteins was found to vary throughout follicle development (Table I). The expression of LDHB reached a maximum at the SF stage, while the other eight exhibited an increase in abundance throughout follicle development, achieving a maximum at AF stage. These results illustrate a strong need for energy supply at this stage of in vitro development. Previous studies showed that LDHB and associated mRNA increased in the oocyte during follicular development, maturation and the beginning of embryonic development (Brinkworth and Masters, 1978; Roller et al., 1989; Winger et al., 2000; Li et al., 2006). Yet, our results showed a lower abundance during follicular development, which could be interpreted as a protein specifically localized in the oocyte.

Another protein of relevant interest, and abundant in AF stage, was PRKAR2B, which is a regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) involved in cAMP signaling. Indeed, high levels of cAMP within the oocyte are essential to keep the meiotic cycle on hold. Nevertheless, the source of cAMP is still controversial since one theory suggests that the oocyte itself generates the inhibitory cAMP (Mehlmann et al., 2002; Horner et al., 2003; Mehlmann, 2005) whereas another theory suggests that meiotic arrest is dependent on cumulus or granulosa cells supplying this inhibitor (Sela-Abramovich et al., 2006). Higher levels of a protein implicated in cAMP signaling at AF stage suggest that this protein is likely to be produced in the granulosa cells since at this stage, in the current samples there is a higher number of granulosa cells compared to the other stages. It would be of great interest to further investigate the regulation of PKA during follicle development in order to assess its potential role in folliculogenesis.

Table I Proteins differently expressed in the three stages.

Accession number	Protein name	Gene name	Protein score	ANOVA P-value	Fold-change	Max.	Min.	Profile Type (Fig. 7)
Q8K3V4	Protein-arginine deiminase type-6	Padi6	1103.2	1.9E-07	3.6	SF	AF	P1
P16125	L-lactate dehydrogenase B chain	Ldhb	879.7	7.0E-06	4.9	SF	AF	P1
P8WWV2	Protein Serpinb6a	Serpinb6a	648.1	3.4E-07	2.4	SF	AF	P1
Q9CWU5	KH domain-containing protein 3	Khdc3	569.8	5.9E-05	3.2	SF	SMR/AF	P1
Q9R0P9	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Uchl1	509.7	6.9E-05	4.4	SF	AF	P1
P24549	Retinal dehydrogenase 1	Aldh1a1	418.6	8.0E-04	2.0	SF	SMR	P1
P10761	Zona pellucida sperm-binding protein 3	Zp3	346.3	7.2E-05	4.9	SF	AF	P1
P54869	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	Hmgcs2	335.2	1.0E-02	2.1	SF	SMR	P1
Q9DAW9	Calponin-3	Cnn3	308.2	2.3E-04	2.5	SF	AF	P1
Q9WVB3	Transducin-like enhancer protein 6	Tle6	239.0	1.9E-06	3.5	SF	AF	P1
P10518	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	Alad	230.6	2.0E-04	2.7	SF	AF	P1
P20239	Zona pellucida sperm-binding protein 2	Zp2	189.8	7.0E-05	2.6	SF	AF	P1
Q08DC7	Pla2g4c protein	Pla2g4c	188.0	2.4E-04	3.1	SF	AF	P1
P24472	Glutathione S-transferase A4	Gsta4	153.6	3.3E-04	2.7	SF	SMR	P1
Q9CWE6	Oocyte-expressed protein homolog	Ooep	94.9	2.0E-02	4.8	SF	SMR/AF	P1
P14211	Calreticulin	Calr	276.5	1.3E-05	4.6	SMR	SF	P2
Q60817	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	Naca	270.9	1.6E-04	2.3	SMR	AF	P2
Q60605	Myosin light polypeptide 6	Myl6	174.3	1.6E-03	3.4	SMR	SF/AF	P2
G3UWR0	Calumenin	Calu	161.2	5.1E-05	3.1	SMR	SF	P2
Q4VAA2	Protein CDV3	Cdv3	106.5	2.1E-04	2.5	SMR	AF	P2
P20029	78 kDa glucose-regulated protein	Hspa5	2951.4	2.6E-05	2.7	AF	SF	P3
P17182	Alpha-enolase	Eno1	1548.7	4.5E-07	5.0	AF	SF	P3
P05213	Tubulin alpha-1B chain	Tuba1b	1527.4	7.0E-04	2.7	AF	SF	P3
P09103	Protein disulfide-isomerase	P4hb	1416.4	4.3E-06	2.7	AF	SF	P3
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	701.4	1.6E-07	4.0	AF	SF	P3
P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Mdh1	462.0	4.8E-06	2.1	AF	SF	P3
P48036	Annexin A5	Anxa5	445.8	5.5E-04	2.0	AF	SF	P3
Q99KV1	Dnaj homolog subfamily B member 11	Dnajb11	420.4	1.1E-03	2.2	AF	SF	P3
G3X8N5	L-lactate dehydrogenase	Ldha	412.5	3.1E-06	3.4	AF	SF	P3
P24815	3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta 5-->4-isomerase type I	Hsd3b1	394.6	6.4E-03	3.1	AF	SF	P3
E9PXX7	Thioredoxin domain-containing protein 5	Txndc5	380.2	4.7E-03	2.1	AF	SF	P3
P57759	Endoplasmic reticulum resident protein 29	Erp29	361.6	3.1E-05	2.5	AF	SF	P3
O08807	Peroxiredoxin-4	Prdx4	358.2	4.0E-05	2.2	AF	SF	P3
P29758	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	Oat	354.1	5.3E-04	2.1	AF	SF	P3
P51656	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 1	Hsd17b1	351.2	3.6E-03	2.4	AF	SF	P3
P53994	Ras-related protein Rab-2A	Rab2a	330.6	3.3E-03	2.0	AF	SF	P3
Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1	Pgam1	329.4	6.5E-04	2.2	AF	SF	P3
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	325.5	5.8E-03	2.2	SMR	SF	P3
P09411	Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	300.5	2.8E-03	2.7	AF	SF	P3
Q60715	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	P4ha1	271.1	7.0E-05	2.2	AF	SF	P3
Q9QXT0	Protein canopy homolog 2	Cnpy2	254.6	3.8E-03	2.3	SMR	SF	P3
A2A7Q5	Prolyl 3-hydroxylase 1	Leprel1	225.9	2.7E-03	2.3	AF	SF	P3
G3E850	Cytochrome b-5, isoform CRA_a	Cyb5	222.6	4.9E-05	3.4	AF	SF	P3
Q3UHW8	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Usp5	216.6	5.5E-03	2.2	AF	SF	P3

Continued

Table I *Continued*

Accession number	Protein name	Gene name	Protein score	ANOVA P-value	Fold-change	Max.	Min.	Profile Type (Fig. 7)
G1XA14	Protein Akr1c1	Akr1c1	212.7	7.50-03	3.4	SMR	SF	P3
P34884	Macrophage migration inhibitory factor	Mif	210.1	1.60-05	2.1	AF	SF	P3
P22935	Cellular retinoic acid-binding protein 2	Crabp2	130.9	2.20-04	2.6	AF	SF	P3
Q9CYA0	Cysteine-rich with EGF-like domain protein 2	Crid2	107.5	2.00-02	2.9	AF	SF	P3
P63158	High-mobility group protein B1	Hmgb1	267.9	2.00-03	2.5	SF	SMR	P4
Q9JKB1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	Uch3	226.8	1.10-03	2.6	SF	SMR	P4
Q9ERD7	Tubulin beta-3 chain	Tubb3	1342.8	1.60-03	3.3	AF	SMR	P5
P31324	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	Prkar2b	1129.2	1.70-04	3.7	AF	SF	P5
Q05816	Fatty acid-binding protein, epidermal	Fabp5	781.9	9.10-05	3.1	AF	SF	P5
P17751	Triosephosphate isomerase	Tpi1	627.6	5.70-05	2.3	AF	SF	P5
Q9DBF9	Phosphoglucomutase-1	Pgm1	403.2	1.20-04	2.3	AF	SF/SMR	P5
Q99JF5	Diphosphomevalonate decarboxylase	Mvd	161.0	9.70-05	3.6	AF	SF	P5
Q62159	Rho-related GTP-binding protein RhoC	Rhoc	136.3	2.10-04	2.4	AF	SMR	P5

Fold-change and ANOVA were calculated between the maximal and the minimal abundance obtained for each protein. The protein score is the sum of Mascot scores of the identified peptides. Proteins were validated when at least two peptides were significant, with an ANOVA P-value 0.05 and a fold-change ≥ 2. Profile Type (P1–P5) refers to the normalized abundance behavior of the protein (see Fig. 7).

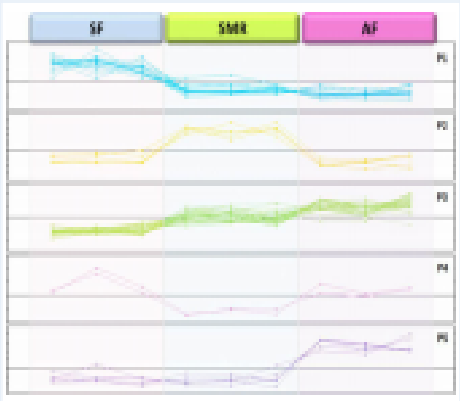

Figure 7 Standardized Normalized Abundance profiles of proteins differently expressed between developmental stages. (P1) 15 proteins with highest abundance in SF stage. (P2) 5 proteins with maximal abundance at SMR stage. (P3) 28 proteins corresponding to increasing abundance throughout developmental stages. (P4) 2 proteins with a significant decrease at SMR stage compared to the other two stages. (P5) 7 proteins with a significant variation between the two first stages (SF and SMR) and the AF stage, which is the stage with the highest abundance.

Apoptosis, ROS and DNA repair

During in vivo folliculogenesis, a large number of follicles will not grow and will degenerate, mainly due to proliferation arrest of granulosa cells and consequent apoptosis. In the ovary, almost 99% of follicles that begin development will die; therefore apoptosis is expected to be a major biological process in the ovary proteome (He et al., 2014). In the current study, only 5% of the proteins identified were attributed to that biological process. Since apoptosis was not over-represented at any stage of development, it can be concluded that in vitro culture conditions differ from those in vivo, as there is not increased expression of proteins related to apoptosis, taking account of appropriate culture conditions.

In vivo, the follicles constantly compete for developmental resources, leading to the death of the weakest. Nevertheless, in the type of culture that we describe here, the follicles grew individually without competition for resources. The lack of competition between follicles lead to a larger number of follicles reaching ovulatory stage and a reduced apoptosis rate compared to in vivo conditions.

However, Pathway Studio analysis demonstrated that at SMR and AF stages, twice as many proteins involved in ROS production and DNA repair were identified compared to SF stage. This could be justified by the culture conditions since the SF stage was exposed to those conditions for a shorter time. Nevertheless, at the end of the culture, the AF stage had fewer proteins associated with those biological processes compared to SMR stage. These results could be justified by the change of follicular structure in this type of culture, passing from a tridimensional to a bidimensional structure, as the follicle grows attached to the culture surface (Cortvindt et al., 1996; Pesty et al., 2007; Picton et al., 2008). However, if increased transcription of proteins involved in ROS production and DNA repair is induced by this structural change, it seems that it does not have a significant negative impact in follicular development since these types of protein was reduced again in the last culture phase.

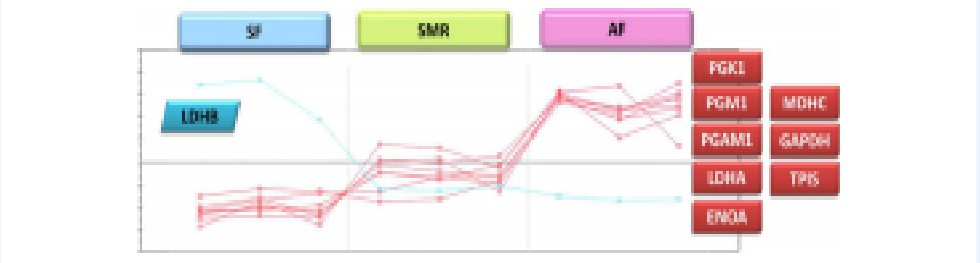

Figure 8 Abundance profile of proteins implicated in glycolysis, with a significant variation throughout follicle development in vitro. In red, eight proteins with increasing abundance during the stages. In blue, one protein, LDHB, with decreasing abundance during follicle development in vitro.

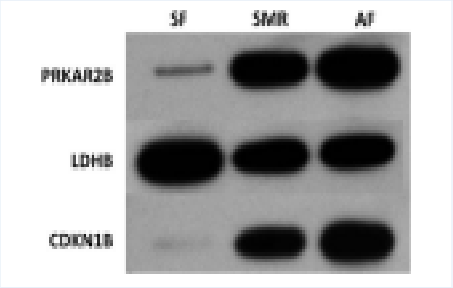

Figure 9 Western blot demonstrating variable expression of PRKAR2B, LDHB and CDKN1B at the three stages. It is possible to observe an increasing expression of PRKAR2B and CDKN1B during the culture, with a higher expression in the two later stages of development. The decreasing expression of LDHB during follicle development is also shown by western blot, with similar abundance in the SMR and AF stages.

Conclusion

Follicular integrity is crucial for oocyte development from follicle activation until maturation. In this study, it was possible to identify 1401 proteins expressed in the follicle during its growth in vitro, representing the first catalog of a follicle proteome. Although this protein list is not exhaustive, it shows the most abundant proteins expressed in the growing follicle, and it can be used as a baseline for further studies about the role of a protein in follicle development.

The comparative analysis of the three distinct morphological stages of follicles made it possible to highlight several functional groups of proteins exhibiting differential expression during in vitro development, suggesting different roles at specific stages. The combination of qualitative and quantitative analyses highlighted specific expression patterns for proteins associated with the CDK network, glycolysis, calcium binding and regulation, as well as a regulatory subunit of PKA. Further complementary studies should be carried out to understand the specific activation of developmental pathways that allow follicle development and maturation.

This study contributes to the identification of several mechanisms involved in the ovarian follicles development in vitro. The resulting data may potentially serve future improvements of current and still-suboptimal mammalian follicle-culture systems, which is particularly interesting as alternatives for female patients treated for cancer are urgently needed.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Molecular Human Reproduction* online.

Acknowledgements

The authors wish to thank Karine Reynaud (Alfort Veterinary School, Maisons Alfort, France) and Karthik Govindasamy Muralidharan, Arian Lundberg and Jonas Bergh (Department of Oncology-Pathology, Cancer Center Karolinska, Karolinska Institute) for laboratory assistance and administrative support. We also thank the anonymous reviewers whose comments and suggestions helped improve and clarify this manuscript.

Authors' roles

A.A., K.A.R.-W., T.A.S. and C. Poirot designed the study. A.A., K.A.R.-W., S.C. and C. Pionneau conducted the experiments, with A.A. having the main responsibility. C.F. realized the Ingenuity Pathways Analysis (IPA) and Pathway Studio analysis. A.A., S.C. and C. Pionneau analyzed the data, with A.A. having the main responsibility. K.A.R.-W. and C. Poirot provided economic and administrative support. A.A., K.A.R.-W., S.C., C. Pionneau, C.F., T.A.S. and C. Poirot participated in the writing of the manuscript and approved the final version.

Funding

The Portuguese Foundation for Science and Technology, FCT (PhD fellowship SFRH/BD/65299/2009 to A.A.), the Swedish Childhood Cancer Foundation (PR 2014-0144 to K.A.R.-W.) and Stockholm County Council (to K.A.R.-W.).

Conflict of interest

The authors of the study have no conflict of interest to report.

References

Bayrak A, Oktay K. The expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p15, p16, p21, and p27 during ovarian follicle growth initiation in the mouse. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:41.

Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG. Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles in vitro. *Biol Reprod* 1993;48:798–806.

Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG. Characterization of follicular energy metabolism. *Hum Reprod* 1994a;9:604–609.

Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG. The effect of glucose metabolism on murine follicle development and steroidogenesis in vitro. *Hum Reprod* 1994b;9:617–623.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.

Brinkworth RI, Masters CJ. On the localization of lactate dehydrogenase in the ovaries and reproductive tracts of rats and mice. *Mech Ageing Dev* 1978;8:299–310.

Collado-Fernandez E, Picton HM, Dumollard R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int J Dev Biol* 2012;56:799–808.

Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 2002;299:35–55.

Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC. In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod* 1996;11:2656–2666.

Demant M, Trapphoff T, Frohlich T, Arnold GJ, Eichenlaub-Ritter U. Vitrification at the pre-antral stage transiently alters inner mitochondrial membrane potential but proteome of in vitro grown and matured mouse oocytes appears unaffected. *Hum Reprod* 2012;27:1096–1111.

Dorphin B, Prades-Borio M, Anastacio A, Rojat P, Cousieu C, Poirot C. Secretion profiles from in vitro cultured follicles, isolated from fresh prepubertal and adult mouse ovaries or frozen-thawed prepubertal mouse ovaries. *Zygote* 2012;20:181–192.

Epifano O, Liang LF, Familari M, Moos MC Jr, Dean J. Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development* 1995;121:1947–1956.

Eppig JJ, Hosoe M, O'Brien MJ, Pendola FM, Requena A, Watanabe S. Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. *Mol Cell Endocrinol* 2000;163:109–116.

Eppig JJ, O'Brien MJ, Wigglesworth K, Nicholson A, Zhang W, King BA. Effect of in vitro maturation of mouse oocytes on the health and lifespan of adult offspring. *Hum Reprod* 2009;24:922–928.

Eppig JJ, Pendola FL, Wigglesworth K, Pendola JK. Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. *Biol Reprod* 2005;73:351–357.

Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM et al. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27 (Kip1)-deficient mice. *Cell* 1996;85:733–744.

Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 2004;82–83:431–446.

Harris SE, Adriaens I, Leese HJ, Gosden RG, Picton HM. Carbohydrate metabolism by murine ovarian follicles and oocytes grown in vitro. *Reproduction* 2007;134:415–424.

Hawkins SM, Matzuk MM. Oocyte-somatic cell communication and microRNA function in the ovary. *Ann Endocrinol* 2010;71:144–148.

He H, Tang H, Zhou T, Guo Y, Wang G, Lin M, Sun Y, Si W, Zhou Z, Guo X et al. Unravelling the proteome of adult rhesus monkey ovaries. *Mol Biosyst* 2014;10:653.

Horne ST, Carroll J, Swann K. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Hum Reprod* 1993;8:1274–1281.

Horner K, Livera G, Hinckley M, Trinh K, Storm D, Conti M. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Dev Biol* 2003;258:385–396.

Imamichi Y, Mizutani T, Ju Y, Matsumura T, Kawabe S, Kanno M, Yazawa T, Miyamoto K. Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2013;370:1–10.

Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 1996;85:721–732.

Li L, Baibakov B, Dean J. A subcortical maternal complex essential for preimplantation mouse embryogenesis. *Dev Cell* 2008;15:416–425.

Li SS, Liu YH, Tseng CN, Singh S. Analysis of gene expression in single human oocytes and preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:48–53.

Liu HC, He Z, Rosenwaks Z. In vitro culture and in vitro maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. *Fertil Steril* 2002;77:373–383.

Liu Z, Castellon DH, Zhou W, Richards JS. FOXO1/3 depletion in granulosa cells alters follicle growth, death and regulation of pituitary FSH. *Mol Endocrinol* 2013;27:238–252.

Liu Z, Rudd MD, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Fan HY, Zeleznik AJ, Richards JS. FSH and FOXO1 regulate genes in the sterol/steroid and lipid biosynthetic pathways in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 2009;23:649–661.

Ma M, Guo X, Wang F, Zhao C, Liu Z, Shi Z, Wang Y, Zhang P, Zhang K, Wang N et al. Protein expression profile of the mouse metaphase-II oocyte. *J Proteome Res* 2008;7:4821–4830.

Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 2002;296:2178–2180.

Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 2005;130:791–799.

Mehlmann LM, Jones TL, Jaffe LA. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science* 2002;297:1343–1345.

Meng Y, Liu XH, Ma X, Shen Y, Fan L, Lang J, Liu JY, Sha JH. The protein profile of mouse mature cumulus-oocyte complex. *Biochim Biophys Acta* 2007;1774:1477–1490.

Miller WL. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* 2005;146:2544–2550.

Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 1996;85:707–720.

Park Y, Maizels ET, Feiger ZJ, Alam H, Peters CA, Woodruff TK, Unterman TG, Lee EJ, Jameson JL, Hunzicker-Dunn M. Induction of cyclin D2 in rat granulosa cells requires FSH-dependent relief from FOXO1 repression coupled with positive signals from Smad. *J Biol Chem* 2005;280:9135–9148.

Pasty A, Miyara F, Debey P, Lefevre B, Poirot C. Multiparameter assessment of mouse oogenesis during follicular growth in vitro. *Mol Hum Reprod* 2007;13:3–9.

Pfeiffer MJ, Siatkowski M, Paudel Y, Balbach ST, Baumer N, Crosetto N, Drexler HC, Fuellen G, Boiani M. Proteomic analysis of mouse oocytes reveals 28 candidate factors of the 'reprogrammome'. *J Proteome Res* 2011;10:2140–2153.

Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 1998;145:27–37.

Picton HM, Harris SE, Muruvi W, Chambers EL. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction* 2008;136:703–715.

Rajareddy S, Reddy P, Du C, Liu L, Jagarlamudi K, Tang W, Shen Y, Berthet C, Peng SL, Kaldis P et al. p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. *Mol Endocrinol* 2007;21:2189–2202.

Roller RJ, Kinloch RA, Hirsoka BY, Li SS, Wassarman PM. Gene expression during mammalian oogenesis and early embryogenesis: quantification of three messenger RNAs abundant in fully grown mouse oocytes. *Development* 1989;106:251–261.

Sela-Abramovich S, Edry I, Galiani D, Nevo N, Dekel N. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology* 2006;147:2280–2286.

Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79:551–555.

Shi F, LaPolt PS. Relationship between FoxO1 protein levels and follicular development, atresia, and luteinization in the rat ovary. *J Endocrinol* 2003;179:195–203.

Shimizu T, Hirai Y, Miyamoto A. Expression of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in granulosa cells from bovine ovary. *Reprod Domest Anim* 2013;48:e65–e69.

Smitz JE, Cornwindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 2002;123:185–202.

Sousa M, Barros A, Silva J, Tesarik J. Developmental changes in calcium content of ultrastructurally distinct subcellular compartments of preimplantation human embryos. *Mol Hum Reprod* 1997;3:83–90.

Tamura ED, Baker MD, Aloisio GM, Carr BR, Cunnilion DH. Gonadal expression of Foxo1, but not Foxo3, is conserved in diverse Mammalian species. *Biol Reprod* 2013;88:103.

Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertil Steril* 2013;99:1523–1533.

Wang S, Kou Z, Jing Z, Zhang Y, Guo X, Dong M, Wilmut I, Gao S. Proteome of mouse oocytes at different developmental stages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:17639–17644.

Whitaker M. Calcium at fertilization and in early development. *Physiol Rev* 2006;86:25–88.

Winger QA, Hill JR, Shin T, Watson AJ, Knemer DC, Westhusin ME. Genetic reprogramming of lactate dehydrogenase, citrate synthase, and phosphofructokinase mRNA in bovine nuclear transfer embryos produced using bovine fibroblast cell nuclei. *Mol Reprod Dev* 2000;56:458–464.

Wright PW, Bolling LC, Calvert ME, Sarmento OF, Berkeley EV, Shea MC, Hao Z, Jayes FC, Bush LA, Shetty J et al. ePAD, an oocyte and early embryo-abundant peptidylarginine deiminase-like protein that localizes to egg cytoplasmic sheets. *Dev Biol* 2003;256:73–88.

Xu M, Barrett SL, West-Farrell E, Kondapalli LA, Kiesewetter SE, Shea LD, Woodruff TK. In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. *Hum Reprod* 2009;24:2531–2540.

Xu M, Kreeger PK, Shea LD, Woodruff TK. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Eng* 2006;12:2739–2746.

Yurttas P, Morency E, Coonrod SA. Use of proteomics to identify highly abundant maternal factors that drive the egg-to-embryo transition. *Reproduction* 2010;139:809–823.

Zhang DX, Li XP, Sun SC, Shen XH, Cui XS, Kim NH. Involvement of ER-calreticulin-Ca2+ signaling in the regulation of porcine oocyte meiotic maturation and maternal gene expression. *Mol Reprod Dev* 2010;77:462–471.

Zhang P, Ni X, Guo Y, Guo X, Wang Y, Zhou Z, Hao R, Sha J. Proteomic-based identification of maternal proteins in mature mouse oocytes. *BMC Genomics* 2009;10:348.

Zhang P, Dean J. Role of Filia, a maternal effect gene, in maintaining euploidy during cleavage-stage mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:7473–7478.

Présenté par : **YAHI Besma**
BELHIMAR Khadidja

Encadreur : **Dr. AISSAOUI Salima**

Thème

Approche protéomique en clinique

Résumé :

L'approche protéomique occupe une position clé dans la Biologie, elle englobe une large gamme de technologies visant à déterminer l'identité et la quantité de protéome exprimé dans une cellule, un organisme, un organe, un compartiment cellulaire ou un fluide biologique à un moment donné, dans un contexte biologique donné. permettent également d'étudier leur structure tridimensionnelle, leurs interactions entre elles ou avec d'autres molécules et la recherche des marqueurs diagnostiques, pronostiques et de suivi thérapeutique des pathologies humaines. L'approche protéomique est composée de plusieurs étapes, mettant en jeu la préparation d'échantillon, des techniques séparatives par l'électrophorèse bidimensionnelle, des techniques d'identification reposant sur la spectrométrie de masse et des outils bioinformatiques incluant bases de données et logiciels de traitement. De nombreuses applications de la protéomique en biologie clinique, santé, en biologie de la reproduction sont en cours de développement.

Mots clés : approche protéomique, protéome, électrophorèse bidimensionnelle, spectrométrie de masse.

Abstract :

The proteomics approach occupies a key position in Biology, encompassing a wide range of technologies aimed at determining the identity and amount of proteome expressed in a cell, organism, organ, cell compartment or biological fluid at a specific level. given time, in a given biological context. also allow to study their three-dimensional structure, their interactions with each other or with other molecules and the search for diagnostic markers, prognostic and therapeutic monitoring of human pathologies. The proteomic approach is composed of several steps, involving sample preparation, separation techniques by two-dimensional electrophoresis, identification techniques based on mass spectrometry and bioinformatics tools including databases and computer software. treatment. Many applications of proteomics in clinical biology, health, reproductive biology are under development.

Key words: Proteomic approaches , proteome, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry.

الملخص:

المناهج البروتينية تحتل موقعا رئيسيا في البيولوجيا ، وهي تشمل مجموعة واسعة من التقنيات لتحديد هوية وكمية البروتين الموجود في الخلية أو الكائن الحي أو العضو أو حجرة الخلية أو السائل البيولوجي في وقت معين في سياق بيولوجي معين تسمح أيضًا بدراسة بنيتها ثلاثية الأبعاد ، وتفاعلاتها مع بعضها البعض أو مع جزيئات أخرى والبحث عن علامات المراقبة التشخيصية ، و النذير والعلاجية للأمراض البشرية يتكون المنهج البروتيني من عدة خطوات ، تشمل تحضير العينة ، والتقنيات الانفصالية بواسطة الهجرة الكهربائية ، وتقنيات تحديد الهوية القائمة على القياس الطيفي الشامل وأدوات المعلومات الحيوية بما في ذلك قواعد البيانات وبرامج المعالجة. العديد من تطبيقات البروتينات في علم الأحياء السريري والصحة والبيولوجيا التناسلية قيد التطوير.

كلمات مفتاحيه:المنهج البروتيني، البروتيوم، الهجرة الكهربائية،جهاز قياس الطيف الكتلي.