



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

قسم : البيولوجيا و علم البيئة النباتية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : *Biotechnologie et Génomique Végétale*

Intitulé :

**Apport de la protéomique quantitative ciblée à haute résolution :
utilisation de la technique spectrométrie de masse chez les plantes**

Présenté et soutenu par : *BOUKERZAZA Asma*

Le : 26/09/2019

Jury d'évaluation :

President du jury:

Mr. *KELLO Kamel* (MAA- UFM Constantine).

Encadrant :

Dr. *LOUALI Yamouna* (MCB - UFM Constantine).

Examinatrice:

Dr. *HAMLA Chourouk* (MCB - UFM Constantine).

*Année universitaire
2018 - 2019*

Remerciements

Tout d'abord, je rends grâce à Dieu pour sa miséricorde et ses bénédictions.

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon respect à l'égard de mon promoteur **Dr. LOUALI YAMOUNA** maître de conférences à l'université Mentouri Constantine, pour avoir accepté de m'encadrer ainsi que pour ses précieux conseils et orientations, sa disponibilité, sa gentillesse, sa patience, sa modestie tout comme l'intérêt bienveillant qu'elle a manifesté envers moi qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude.*

*Mes plus vifs remerciements vont aussi au **Mr. KELLOU KAMEL** Maître de assistance A à l'Université des Frères Mentouri Constantine1 pour avoir bien voulu me Faire l'honneur de présider le jury. Ainsi qu'au **Dr. HAMLIA CHOUROUK** Maître de conférences à l'Université des Frères Mentouri Constantine1 pour avoir accepté d'examiner ce travail et d'être membre de ce jury.*

*Il m'est également agréable d'exprimer ma profonde gratitude et mes plus sincères remerciements à tous mes enseignants qui m'ont assurés des études de haut niveau et qui m'ont permis d'acquérir de nombreuses connaissances ; en particulier : **Pr. Ykhlef Nadia, Dr. Hamouda Dounia, Dr. Bousbaa Ratiba, Dr. Benabdoun Meriem Faiza, Dr. Kacem Nadia Sandra, Mr. Kellou Kamel, Mr. Temagoult Mahmoud, Dr. Hamla Chourouk, Dr. Benbelkacem Abdelkader , Mlle. Mouellef Adra** ainsi que mon encadrant **Dr. Louali Yamouna.***

Je tiens, enfin à remercier tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin par un geste, une parole ou un conseil avisé.

Merci à tous...

Merci pour tout...

Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je dédie mon travail à mon très cher respectueux et magnifique père Abdelali qui m'a soutenu toute au long de ma vie ;

À ma mère Fatima Comment t'oublier? Ton sourire et ta bonté restent encore gravés dans ma mémoire, j'imagine qu'elle serait ta joie aujourd'hui, j'aurais voulu que tu assistes à l'aboutissement de ces années de dur labeur, Dieu en a décidé autrement. Que Dieu t'accorde la paix éternelle et t'accueille dans son paradis ;

À mes sœurs Nassima, Lamia et Rym et mon frère Billel, à qui je souhaite un avenir radieux plein de réussite ;

À mes très chères tantes Wahiba et Badia et mon oncle Mourad et mes cousines Rachida, Manel, Weam, Magda. Vous qui avez toujours été là pour me soutenir et m'encourager ;

À mes très chères amies Rahma, Nadjma, Chahinez, Sara, Issmahane, Rayane, Amira et Ramla. Je vous dédie ce travail en témoignage de ma grande affection et en souvenir des agréables moments passés ensemble. Vous êtes les meilleures ;

À mes très chères voisines Nora, Safa, Hadil Vous qui avez toujours été là pour me soutenir et m'encourager ;

*A Toute la promotion de Biotechnologie et génomique végétale
2018-2019 ;*

À ma famille, Boukerzaza.

Asma

Apport de la protéomique quantitative ciblée à haute résolution : utilisation de la technique spectrométrie de masse chez les plantes

Résumé :

L'analyse protéomique consiste à l'étude qualitative et quantitative de l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule ou tissu dans des conditions données (protéome), à les séparer par des électrophorèses sur gel de polyacrylamide, à les détecter avec des colorations spécifiques et notamment à les identifier par spectrométries de masse moléculaire. Les progrès instrumentaux par spectrométrie de masse et l'interprétation automatisée des spectres MS/MS des dernières années ont permis d'imposer ce domaine dans les sciences de la vie. Cependant, cette méthodologie s'applique encore difficilement aux organismes dont les génomes n'ont pas été séquencés, et donc pour lesquels il n'existe pas de banques de séquences peptidiques de référence. Diverses stratégies protéomiques permettent ainsi, aujourd'hui, d'identifier et quantifier plusieurs centaines/milliers de protéines dans un échantillon complexe, ce qui permet classiquement de caractériser les états physiopathologiques. En revanche, la protéomique est un outil émergent en biologie évolutive et elle peut être utilisée à grande échelle dans les études des applications de spectrométrie de masse chez les végétaux.

Dans ce mémoire les points les plus importants qu'ont été discutés sont : les techniques, le principe de fonctionnement les plus importants analyseurs de masse, la quantification de protéines par spectrométrie de masse relative ou absolue, les innovations scientifiques.

Mots clés : Protéomique, spectrométrie de masse, Protéomique quantitative, iTRAQ

Contribution of targeted high-resolution quantitative proteomics: use of the mass spectrometry technique in plants

Summary:

Proteomics analysis consists of qualitative and quantitative study of all proteins expressed in a given cell or tissue under given conditions (proteome), separation by polyacrylamide gel electrophoresis, detection with specific colorations and, in particular, identification as molecular mass spectrometries. The instrumental advances in mass spectrometry and the automated interpretation of MS/MS spectra of the past few years have allowed the domain to impose in the life sciences. However, this methodology is still difficult to apply to organisms whose genomes have not been sequenced, and thus for which there are no reference peptide sequence banks. A variety of protein strategies are now used to identify and quantify several hundred/thousands of proteins in a complex sample, which typically characterizes physiopathological conditions. In contrast, proteomics is an emerging tool in evolutionary biology and can be used on a large scale in studies of mass spectrometry applications in plants.

The most important points discussed in this brief were: the techniques, the principle of operation of the main mass analysers, Quantification of proteins by relative or absolute mass spectrometry, scientific innovations.

Key words: Proteomics, mass spectrometry, Quantitative Proteomics, iTRAQ

مساهمة البروتيومات الكمية عالية الدقة المستهدفة: استخدام تقنية الطيف الكتلي في النباتات

ملخص:

يتكون التحليل البروتيني من الدراسة النوعية و الكمية لجميع البروتينات التي يتم التعبير عنها في خلية أو نسيج تحت ظروف معينة (البروتيوم) ويكون ذلك بفصلها عن طريق الكهربائي على هلام بولي أكريلاميد و اكتشافها مع بقاء محددة خاصة و يتم التعرف عليها عن طريق قياس الطيف الكتلي. إن التقدم الملموس في قياس الطيف الكتلي والتفسير الآلي لأطياف في السنوات الأخيرة قد جعل من الممكن فرض هذا المجال في علوم الحياة و مع ذلك لا يزال من الصعب تطبيق هذه المنهجية على الكائنات التي لم يتم تسلسل جينوماتها و بالتالي لا توجد بنوك تسلسل الببتيد المرجعي لها. تتيح الاستراتيجيات البروتينية المختلفة اليوم , تحديد وقياس مئات الآلاف من البروتينات في عينة معقدة , مما يجعل تقليدياً من الممكن وصف الحالات الفسيولوجية , و من ناحية أخرى البروتيومات هي أداة ناشئة في علم الأحياء التطورية و يمكن إستخدامها على نطاق الواسع في الدراسات تطبيقات قياس الطيف الكتلي في النباتات.

في هذه المذكرة , أهم النقاط التي تمت مناقشتها هي التقنيات, مبدأ التشغيل لمحللات الكتلة الرئيسية , القياس الكمي للبروتينات بواسطة مطياف الكتلة النسبي أو المطلقة , الابتكارات العلمية.

الكلمات المفتاحية : البروتيومات, الطيف الكتلي, البروتيومات الكمية, iTRAQ

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations et acronymes

Liste des illustrations

Introduction	01
---------------------	----

Chapitre 1 La protéomique

1.La protéomique	03
1.1 Techniques d'études analytiques	05
1.1.1 Principe de l'électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (1D-SDS-PAGE)	05
1.1.2 Electrophorèse bidimensionnelle de protéines sur gel de polyacrylamide (2D – SDS-PAGE)	07
1. 1. 2.1 L'extraction protéique	07
1.1. 2. 2 De l'extrait protéique aux spots protéique	08
1.1. 2. 3 Identification des protéines	10
1.2 Techniques d'études quantitatives	10
1 .2.1 Quantification sur gel	10
1 .2.2 Quantification par méthode immunologique	12
1.3 Applications scientifiques de la protéomique	12
1.3.1 Analyse des modifications post-traductionnelles	12
1 .3 .1.1 Généralités	12
1 .3 .1.2 Phosphorylation	14
1 .3 .1.3 La N-acétylation	15
1 .3 .2 Etude des interactions Protéine / Protéine	18
1.4 Amélioration de la protéomique basée sur la 2D-PAGE	19

Chapitre 2 Spectrométrie de masse

2. La spectrométrie de masse : une technique de choix pour la protéomique	22
2.1 Historique	22
2.2 Définition de la technique	23
2.3 Principe de la spectrométrie de masse en tandem (ou MS/MS)	23
2 .4 Principe de la spectrométrie de masse de type MS	24
2.4.1 Les sources d'ionisation	25
2.4.1.1 Desorption-ionisation laser assisté par matrice (MALDI)	25
2.4.1.2 Les sources électrospray (ESI : ElectroSpray Ionisation)	27

Table des matières

2.4.1.3 Comparaison des deux techniques d'ionisation	29
2.4.2 Les analyseurs et spectrométrie de masse	29
2.4.2.1 Analyseur utilisant un champ électrique constant analyseur a temps de vol (TOF)	29
2.4.2.2 Les triples quadripôles	30
2.4.2.3 Le spectromètre de masse de type Orbitrap (OT)	32
2.5 Le principe de fonctionnement des principaux analyseurs de masse	32
2.6 Stratégie d'identification des protéines par spectrométrie de masse : nanoLC-MS/MS	34
2.7 Quantification des protéines par spectrométrie de masse	35
2.7.1 Les méthodes pour une quantification relative	36
2.7.1.1 2D-DIGE (Fluorescence In Gel Electrophoresis)	36
2.7.1 .2 Technologies de marquage isotopique stable	37
2.7.1.2.1 Marquage isotopique : technologie « Isotope-Coded Affinity Tags » ou ICAT	37
2.7.1.2.2 Marquage métabolique : technologie « Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture » ou SILAC	40
2.7.1.2.3 Marquage isobare : « isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation » (iTRAQ)	41
2.7.1 .3 Quantification « label-free » (LFQ)	43
2.7.1.4 Apports et limites de la technologie iTRAQ par rapport aux technologies ICAT, SILAC et LFQ	45
2.7.2 Les méthodes pour une quantification absolue	47
2.7.2 .1 AQUA	48
2.7.2.2 Quantification concatamer (QconCAT)	49
2.7.2 .3 Quantification absolue en protéines standard(PSAQ)	50
Chapitre 3 Application de spectrométrie de masse chez les plantes	
3 .1 Effet des stress abiotique sur le protéome	54
3 .1.1 Effet du stress hydrique sur le protéome	54
3 .1.2 Effet du stress thermique sur le protéome	58
3 .1.3 Effet du froid sur le protéome	60
3 .1.4 Effet du stress salin sur le protéome	63
3 .2 Effet des stress biotique sur le protéome	66

Table des matières

3 .2.1 Symbiose	66
3 .3 Effet de la fonction cellulaire sur le protéome	67
Conclusion	71
Références bibliographiques	73

Liste des abréviations et des acronymes

1D	Monodimensionnelle
2D	Bidimensionnelle
2D-DIGE	2D Differential Gel Electrophoresis.
2D-PAGE	Electrophorèse bidimensionnelle de protéines sur gel de polyacrylamide
4-HCCA	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
ABA	Acide abscissique.
APMALDI	Atmospheric pressure-MALDI
APX	ascorbate peroxydase
CAD	Collision Activated Dissociation
CID	Collision Induced Dissociation
DHB	L'acide dihydroxybenzoïque
DIA	Data Independent Acquisition
DIOS	desorption-ionisation on porous silicon
DTT	Dithiothreitol
ELISA	enzyme-linked ImmunoSorbent Assay
ESI	ElectroSpray Ionization
ESI_MS/MS	Electrospray ionization tandem mass spectrometry
ETD	Electron Transfer Dissociation
FT-ICR	Cellule de résonance cyclotronique à transformée de Fourier
HAT	Acétyl transférase
HDAC	Des histones déacétylases
ICAT	Isotope-Coded Affinity Tags
IDAT	détection par amplification a la polymérase T7
IEF	Isoélectrofocalisation (Isoelectric focusing)
iTRAQ	isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation
IMAC	Une technique de chromatographie d'affinité
LC-MS /MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LEA	Late Embryogenesis Abundant proteins
LFQ	Label-Free

Liste des abréviations et des acronymes

m/z	rapport masse sur charge
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight
MAP	Méthionine aminopeptidase
Mr	Masse moléculaire relative
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Spectrométrie de masse (<i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
NAT	N-acétyltransférase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ng	Nanogramme
OEE	Oxygen-evolving enhancer protein
PAGE	Polyacrylamide gel Electrophoresis
PMF	Empreinte peptidique de masse
Ppm	partie par millions
PTMs	Les modifications post-traductionnelles
Q	Quadripôle
QqQ	Triple-quadripôle
ROS	Reactive Oxygen Species « espèces réactives de l'oxygène ».
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
SDS	Dodécylsulfate de sodium.
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel Electrophoresis.
SEP	Spectrométrie de masse
SILAC	Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture
SOD	Superoxyde dismutase
SRM	Selected reaction monitoring
TOF	temps de vol (Time of flight)
Tris	Tris-Hydroxyméthyl-Aminométhane

Liste des illustrations

Figure 01	Principe de l'électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (1D-SDS-PAGE)	06
Figure 02	Principe de l'analyse protéomique basée sur la 2D-PAGE.	07
Figure 03	Effets fonctionnels de l'acétylation N-terminale	16
Figure 04	Schéma simplifié d'un spectromètre de masse en tandem ou MS /MS	24
Figure 05	Photographie d'une cible MALDI (Applied Biosystems)	25
Figure 06	Principe de la désorption/ionisation MALDI	27
Figure 07	Photographie d'une source electrospray (Thermo)	28
Figure 08	Schéma simplifié du fonctionnement d'une source électrospray	28
Figure 09	Principe de L'analyseur à temps de vol (TOF)	30
Figure 10	Schéma d'un analyseur quadripolaire avec la représentation de la trajectoire des ions selon l'axe du spectromètre	31
Figure 11	Propriétés structurales et chimiques des Cyanines	36
Figure 12	Structure du réactif ICAT	38
Figure 13	Principe de l'ICAT	39
Figure 14	Principe de SILAC	41
Figure 15	Principe d'iTRAQ	43
Figure 16	Stratégies de dilution isotopique pour la quantification absolue ciblée des protéines basée sur la SEP	52
Tableau	Avantages et limitations des standards internes utilisés en quantification absolue	53

Introduction

Introduction

Cartographier le génome, décrypter les mécanismes impliqués dans son expression, étudier la diversité, la fonction et la dynamique des protéines ainsi que l'ensemble des métabolites d'une cellule, constituent des enjeux majeurs dans la compréhension du vivant. Cette quête d'informations qui repose sur un ensemble de techniques « -OMIQUES » (génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique) est essentielle pour la compréhension de processus biologiques complexes (**Ideker et al., 2001; Csete et Doyle 2002**).

Les protéines, produits finaux des gènes, sont les principaux effecteurs des fonctions biologiques des cellules. Le « protéome » désigne l'ensemble des protéines exprimées par un génome pour une espèce, un organe, une cellule ou un compartiment cellulaire et ceci, à un moment défini (**Patterson ; Aebersold, 2003**).

La protéomique passe par l'étude structurale et fonctionnelle de ces macromolécules, par l'analyse quantitative mettant en évidence les mécanismes de régulation régissant leur synthèse et par le regroupement de toutes les données à l'aide des outils informatiques de plus en plus performants.

L'aire de la protéomique permet aujourd'hui de mieux comprendre l'implication des protéines dans la machinerie cellulaire.

Les études analytiques, identifiant et caractérisant la structure et la fonction de protéines, font intervenir des techniques très variées mais leur combinaison apparaît de plus en plus indispensable. Les électrophorèses en gels deux dimensions assurent la détermination des paramètres protéiques comme la masse moléculaire et le point isoélectrique.

De nombreux mécanismes intervenant pendant et après leur synthèse subissent de nombreuses modifications des protéines, les modifications post-traductionnelles (MPT) telles que la glycosylation, l'acétylation, la phosphorylation, sont principalement retrouvées. Toutes ces MPT sont impliquées dans divers processus cellulaires. Les MPT sont donc des éléments essentiels à prendre en compte lors de l'étude des protéines, ainsi que d'autres méthodes comme les quantifications immunologiques telles que l'IDAT (Immuno Detection Amplified by T7 RNA polymerase)

Une autre approche protéomique puissante se concentre sur l'analyse de novo de protéines ou de populations de protéines isolées à partir de cellules ou de tissus. De telles études posent généralement des problèmes en raison du degré élevé de complexité des

Introduction

protéomes cellulaires et de la faible abondance de nombreuses protéines, qui nécessitent des techniques d'analyse extrêmement sensibles. La spectrométrie de masse (MS) est devenue de plus en plus la méthode de choix pour l'analyse d'échantillons complexes de protéines.

La quantification de protéines par spectrométrie de masse peut être relative ou absolue. En ce qui concerne la quantification relative (2D-DIGE, ICAT, iTRAQ, SILAC) elle permet de comparer l'abondance d'une protéine entre plusieurs échantillons et d'en déduire des variations du niveau d'expression et/ou de dégradation.

Alors que pour la quantification absolue (PSAQ, QconCAT, AQUA) elle permet, grâce à l'utilisation d'un standard de concentration connue, de déterminer la quantité et la concentration d'une protéine dans un échantillon.

Ce mémoire sera donc agencé comme suit :

- ❖ un premier chapitre qui représente une synthèse sur analyse protéomique : les techniques d'études analytiques et quantitatives et leurs applications.
- ❖ le deuxième chapitre est consacré à la représentation des techniques de spectrométrie de masse (MALDI-MS, ESIMS/ MS), l'élaboration de nouvelles stratégies analytiques appliqués a la quantification des protéines.
- ❖ le troisième chapitre sera quant à lui consacré à : l'application de spectrométrie de masse chez les plantes .

Chapitre 1 :
La protéomique

1. La protéomique

La protéomique s'intéresse à l'étude du protéome, c'est-à-dire à l'ensemble des protéines exprimées par une cellule ou un tissu à un moment donné (**Bernot, 2001**) Il s'agit donc, contrairement au génome, d'une image dynamique dépendante du tissu, du stade de développement et des conditions environnementales dans lesquelles l'organisme se situe.

La correspondance entre génome, transcriptome, et le protéome est loin d'être évidente, puisque plusieurs messagers distincts peuvent être transcrits à partir d'un même gène, et plusieurs protéines peuvent être obtenues à partir d'un même messager et les protéines sont évidemment biologiquement fondamentales (**Bernot, 2001**).

La protéomique est donc d'une première importance, définit comme l'étude de la structure et de l'expression des protéines ainsi que des interactions entre les protéines (**Gibson et Muse, 2004**).

La protéomique qui constitue donc à 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.

Elle présente cependant un certain nombre de difficultés :

- Aucun enzyme ne permet l'amplification des protéines.
- La présence de telle ou telle protéine après extraction peut être plus ou moins efficace suivant le type de solubilisations pratiqué et il n'existe pas de milieu d'extraction dans lequel toutes les protéines sont solubles.
- Les protéines faiblement exprimées sont difficilement détectables.
- L'analyse protéomique laisse peu de chance de détecter des mutations ponctuelle, des insertions, ou des délétions mineures.
- Le nombre de protéines identifiées peut être énorme, mais les fonctions sont souvent inconnue (**Bernot, 2001**).

En ce qui concerne l'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.

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 et al., 2005**).

D'autre part, ces modifications sont appréhendées directement par spectrométrie de masse dont la sensibilité (au dixième de Dalton) permet d'en déterminer avec précision la nature. Mais cela nécessite le développement de protocoles préparatoires et d'identification spécifiques (**Sagi et al., 2005**).

Des interactions protéine-protéine sont un enjeu majeur en recherche. Hautement spécifiques, elles régulent l'organisation cellulaire, ainsi que les réponses aux stimuli extérieurs (**Gervais, 2010**).

Par ailleurs, le taux d'ARN messager (ARNm) n'est pas toujours corrélé au taux de protéine correspondant et la fonction des protéines est rarement unique et l'identification des complexes protéiques permet d'approfondir les différentes fonctions d'une protéine d'intérêt, voire d'appréhender sa fonction initiale lorsque celle-ci est totalement inconnue (**Gervais, 2010**).

1.1 Techniques d'études analytiques

1.1.1 Principe de l'électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (1D-SDS-PAGE).

La technique la plus simple, consiste en la séparation des protéines selon leur MM et très populaire SDS-PAGE pour « Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamide Gel Electrophoresis » décrite initialement par **(Laemmli, 1970)**, et aujourd'hui très largement répandue. C'est une électrophorèse de zone des protéines dans un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

Les protéines extraites de l'organisme sont solubilisées dans une solution chauffée à 100°C, tamponnée au pH 6,8 par du Tris-HCl et contenant un excès de sodium dodécyl sulfate (SDS) et d'agent réducteurs des thiols (DTT ou le β -mercaptoéthanol). Le SDS charge négativement les protéines et les dénature, aidée par le chauffage, en entourant le squelette polypeptidique. L'agent réducteur réduit les ponts disulfures des protéines ce qui a pour conséquence de les dissocier en sous-unités polypeptidiques individuelles **(Ballihaut, 2007)**.

Les protéines ainsi solubilisées migrent dans un système d'électrophorèse discontinu constitué de deux gels de polyacrylamide de porosité différente et tamponnés à des pH différents **(Figure 01) (Ballihaut, 2007)**.

Les gels sont coulés et polymérisés dans un système vertical « en sandwich » entre 2 plaques de verre. L'échantillon est déposé au-dessus d'un premier gel appelé gel de 50 concentration (stacking gel) tamponné au pH 6,8 par du Tris-HCl et de réticulation très lâche.

Dans ces conditions, la présence de glycine dans la solution de la cuve d'électrophorèse va permettre de concentrer les protéines dans le gel au cours de la migration. Au pH 6,8 du gel, la glycine est faiblement chargée et présente une faible mobilité contrairement au Cl⁻ complètement ionisé avec une forte mobilité **(Ballihaut, 2007)**. Lorsqu'une tension est appliquée au système, les ions Cl⁻ migrent plus vite dans le gel laissant derrière eux une zone de faible conductivité, un gradient de tension important et un pH plus élevé qui accélère la migration de la glycine de façon à ce qu'elle suive les ions Cl⁻. Ce front constitué par les ions Cl⁻ et les ions glycine migrent au travers de l'échantillon puis au travers du gel **(Ballihaut, 2007)**.

Les protéines chargées négativement par le SDS possèdent une vitesse de migration intermédiaire et vont de ce fait se trouver emprisonnées et donc concentrées dans la fine zone délimitée par les ions Cl^- et les ions glycine (**Ballihaut, 2007**).

Les protéines ainsi concentrées sont ensuite séparées suivant leur taille dans le gel de séparation (running gel) tamponné à pH 8,8 avec des pores plus petits. La migration des protéines dans ces pores va être ralentie jusqu'à devenir plus faible que celle des ions glycine. Le pH 8,8 a pour effet d'augmenter la vitesse de migration des ions glycine qui vont alors dépasser les protéines et se trouver juste derrière les ions Cl^- (**Ballihaut, 2007**).

Les protéines ne sont plus emprisonnées dans la fine zone et sont alors séparées suivant leur taille par migration vers l'électrode positive. (**Righetti, 2005**).

La comparaison du profil de migration des protéines à celles de marqueurs de taille (M) connus et traités de la même façon permet de donner la masse moléculaire relative (M_r) des protéines séparées (**Righetti, 2005**).

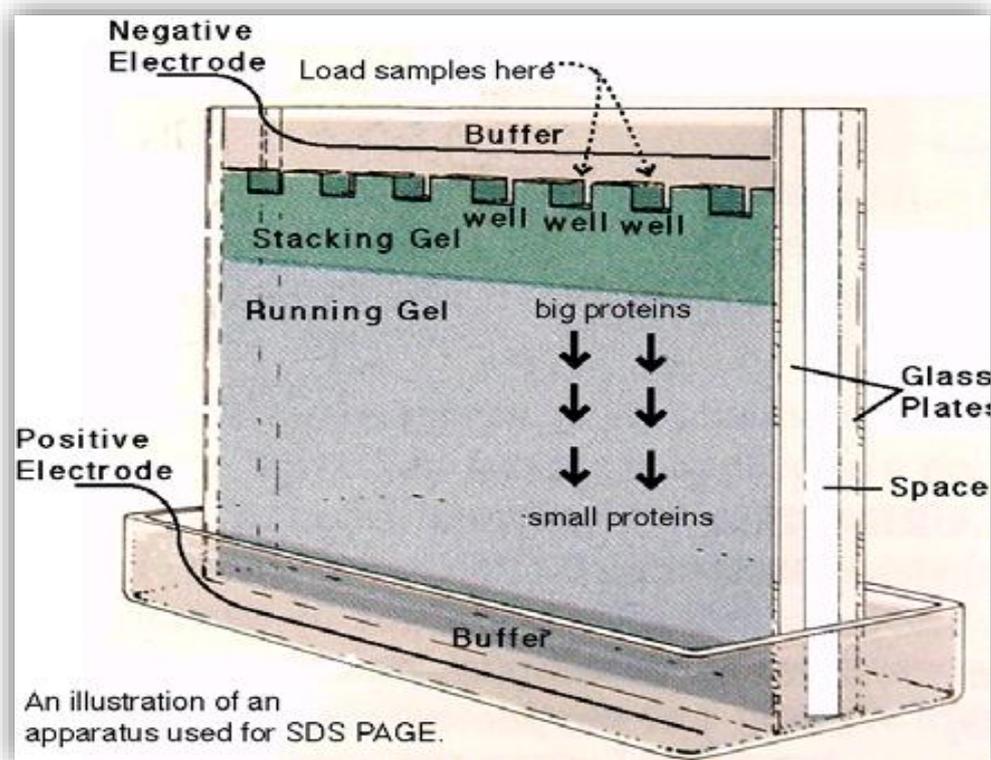


Figure 01 : Principe de l'électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (1D-SDS-PAGE) (**Ballihaut, 2007**).

1.1.2 Electrophorèse bidimensionnelle de protéines sur gel de polyacrylamide (2D –SDS-PAGE)

Les stratégies d'analyse protéomique basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle (ou approche classique) reposent sur trois grandes étapes critiques : l'extraction des protéines d'un échantillon biologique, leur séparation par électrophorèse bidimensionnelle et leur identification par spectrométrie de masse (**Figure 02**) (**Gorg et al., 2004**).

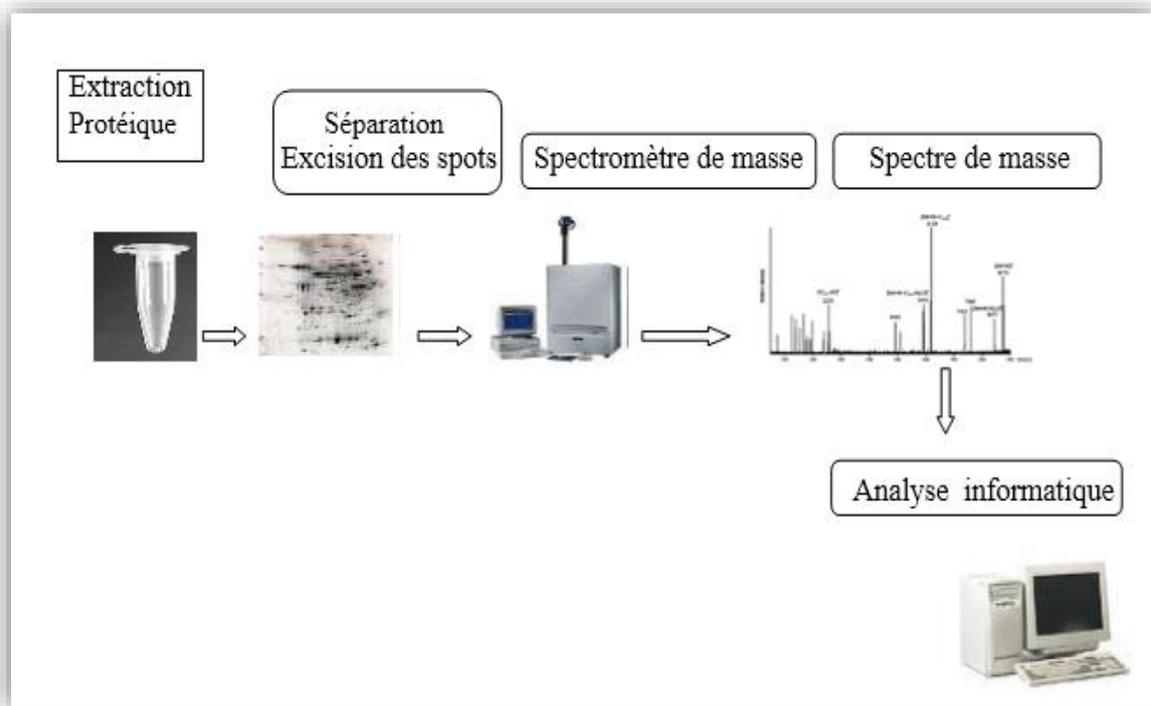


Figure 02 : Principe de l'analyse protéomique basée sur la 2D-PAGE et analyse informatique (**Brosson, 2006**).

1. 1. 2.1 L'extraction protéique

L'extraction a pour but de solubiliser le plus grand nombre possible de protéines, en éliminant les liaisons entre elles (liaisons ioniques, hydrogène, hydrophobes et ponts disulfure) ou avec d'autres molécules biologiques (lipides, acides nucléiques). Elle doit permettre aussi de limiter leur dégradation et/ou modification par des enzymes et des réactions chimiques (**Brosson, 2006**)

Le tampon d'extraction joue également un rôle après le dépôt de l'extrait protéique sur le gel de première dimension, en limitant la précipitation des protéines durant

l'isoélectrofocalisation (IEF), tout en aidant au maintien de la charge globale des protéines. De nombreux protocoles ont été proposés pour s'adapter au matériel biologique étudié. Cependant, l'étape d'extraction se doit d'être la plus simple possible pour accroître la reproductibilité (**Brosson, 2006**).

Cette extraction se fait classiquement en présence de chao-tropes (urée, thiourée), d'agent réducteur (DTT, β -mercaptoethanol) et de détergents (CHAPS, Triton X-100, SDS à faible concentration) (**Rabilloud et al., 1997**) et peut être complétée par des traitements mécaniques (cycles de congélation / décongélation, sonication, broyage). Toutefois, l'emploi du SDS et du CHAPS comme détergent n'est pas suffisant pour permettre une extraction satisfaisante des protéines transmembranaires. Des détergents non ioniques ont donc été développés spécifiquement pour accroître la solubilisation des domaines hydrophobes, tout en conservant aux protéines leur charge ionique (**Chevallet et al., 1998**).

La qualité de l'extraction protéique est un point majeur de toute analyse protéomique, elle doit être effectuée dans des conditions de travail strictement contrôlées.

1.1. 2. 2 De l'extrait protéique aux spots protéique

1 .1.2.2.1 Séparation sur gel 2D-PAGE des protéines extraites

La première séparation (axe X) est menée en fonction du point isoélectrique de chaque protéine (IEF : IsoElectric focusing) :les protéines sont séparée dans un gradient de pH(entre pH 3 et pH 12) sous action d'un champs électrique une protéine cesse de migrer quand elle a atteint la région dont le pH annule sa charge électrique (**Bernot , 2001**) .Utilisait auparavant des molécules supports connues sous le nom d'ampholytes afin d'établir un gradients de pH dans une colonne de gel d'acrylamide au cours d'une électrophorèse .Ce procédé n'est pas suffisamment reproductible pour permettre une comparaison par superposition de gels préparer à partir de deux échantillon de tissu différents , c'est pourquoi il a été largement supplanté par les gradients de pH immobilisée (IPG) (**Gibson et Muse, 2004**).

La seconde séparation (axe Y) est une électrophorèse de types SDS –PAGE en gel de polyacrylamide en présence d'un détergent anionique (en général SDS) ; le SDS impose à la plupart des protéines une charge équivalente, la séparation ne dépend donc plus que **de la masse** .La séparation est efficace pour des protéines dont la masse se situe entre 10 et 200 kDa (**Bernot, 2001**)

1 .1.1.2.2 Visualisation des spots protéiques

La dernière étape de l'électrophorèse 2D 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 (**Rabilloud et al., 2001**).

Elle présente néanmoins certains inconvénients :

- La stœchiométrie 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 Amersham, SYPRO Ruby) (**Rabilloud 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.

Des avancées récentes, en particulier la simplification des protocoles (**Lamanda et al., 2004**) rendent ces colorations très prometteuses.

1 .1.1.2.3 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 (**Brosson, 2006**).

L'image obtenue est ensuite traitée par des logiciels d'analyse d'images 2D tels que Melanie (Amersham Biosciences) ou PD-Quest (BioRad). Ils permettent un pré-traitement automatisé des spots et de leur quantification, mais cette étape doit être complétée manuellement pour référence le gel coloré (**Brosson, 2006**).

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, 2006**).

1.1. 2. 3 Identification des protéines

Après la coloration et l'acquisition informatique de l'image du gel, les spots individualisés sont découpés pour permettre l'identification des protéines. Historiquement, la première méthode utilisée pour identifier les protéines présentes dans les spots d'électrophorèse bidimensionnelle fut le microséquençage par dégradation d'Edman (**Edman, 1949**). Elle permet d'obtenir, par dégradation chimique, la séquence N-terminale de la protéine étudiée. Bien que cette technologie soit désormais automatisée, l'obtention d'une séquence est longue (4 à 8 heures) et nécessite une relative abondance en protéine (20 pmoles, c'est-à-dire 1 μg pour une protéine de 50 kDa). Cette technique est encore spécifiquement utilisée pour des cas précis comme l'analyse de la région N-terminale des protéines pour déterminer précisément le codon initiateur du gène ou le site de clivage d'un peptide signal. Cependant, pour l'analyse protéomique cette technique a été remplacée en routine par la **spectrométrie de masse** qui permet l'identification de protéines à une plus grande échelle, plus rapidement et avec une bien meilleure sensibilité (**Brosson, 2006**).

1.2 Techniques d'études quantitatives

1.2.1 Quantification sur gel

Le principal problème technique dans la caractérisation de l'expression protéique réside dans la quantification. Il n'existe pas de méthode simple de quantification absolue valable pour l'ensemble des protéines (les colorants ou marqueurs ne se fixant pas de manière uniforme sur toutes les protéines). Il ne peut y avoir par conséquent que des quantifications relatives, en comparant des protéines de même famille par exemple (**Patton, 2000**).

En outre la plupart des techniques de mise en image présentent des phénomènes de saturation au-delà d'un certain seuil ; seuls les Imager évitent cet écueil. L'approche standard de l'analyse protéomique par la technique de l'électrophorèse à deux dimensions couplée à la spectrométrie de masse (2DE-MS), permet de comparer, de façon relative, l'abondance d'une

protéine dans deux cellules ou tissus différents en comparant l'intensité d'un spot, dans un gel, à celle du même spot dans un autre gel (**Patton, 2000**).

Cependant, certaines classes de protéines sont exclues et non représentées sur un profil de gel 2D. Ceci inclus les protéines très acides ou très basiques, les très grosses ou les très petites protéines ainsi que les protéines membranaires. Ainsi le nombre de spots sur un gel 2D n'est pas représentatif du nombre total de gènes exprimés.

De plus, la technique 2DE détecte uniquement les protéines présentes dans les cellules de façon abondantes et, l'importante classe des protéines régulatrices (faiblement exprimées) sont difficilement détectable. Enfin, le pré fractionnement et la concentration des échantillons, nécessaire à la détection des protéines de faible abondance rend la quantification impossible.

Il existe différentes techniques permettant de détecter et quantifier les protéines à partir d'un gel (**Patton, 2000**).

L'utilisation du bleu de Coomassie est une des méthodes les plus utilisées en détection bien que cette coloration s'avère peu sensible et ne fournit une réponse linéaire que sur une faible gamme de concentration protéique (de 100ng à 1 µg). La coloration à l'argent, également très utilisée, présente elle une plus grande sensibilité mais n'est pas applicable à la quantification des protéines sur gel du fait de sa faible linéarité de réponse. Il est cependant possible de parvenir à une quantification efficace des protéines d'un gel 2D en utilisant un marquage radioactif ou fluorescent. En effet, ces deux types de marquage protéique sont actuellement les plus sensibles en permettant des détections de l'ordre de 10-13 mole (soit 1.5 à 20ng pour une protéine de 15 à 200 KDa), tout en offrant une réponse linéaire jusqu'à des concentrations de l'ordre du µg.

Ces techniques de quantification sur gel requièrent alors l'utilisation d'un appareillage performant d'imagerie tel que les caméras CDD, les scanners laser, les densitomètres ou les Fluorimagers. Il existe de plus des logiciels d'assistance informatique, pour le traitement des

Images, mis sur le marché par BioRad (Melanie II, Quest), par Genomic Solutions (Bio Image 2D) et par Amersham Pharmacia Biotech (Phoretix 2D Full) (**Mahon et Dupree, 2001**). Il faut cependant considérer le fait que ces techniques de quantification sur gel posent

Des problèmes du fait de leur faible reproductibilité et du non représentation de certaines classes de protéines.

1.2.2 Quantification par méthode immunologique

Un bon moyen de visualisation spécifique aussi bien dans les extrait que dans des cellules entières ou des tissus, consiste à utiliser des anticorps. Les anticorps sont des immunoglobulines protéiques sécrétées et font partie de la réponse immunitaire adaptative par les vertébrés contre des agents étrangers ; une méthode de détection particulièrement sensible réalisée dans les puits d'une plaque de micro-titration est connu sous le nom de test ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Elle est utile lors l'analyse semi quantitative a haut débit de l'expression protéique dans des extrait cellulaire (**Gibson et muse, 2004**).

On a développé une méthode très sensible de détection des protéines aux niveaux cellulaire appelée IDAT (pour immuno-détection par amplification a la polymérase T7). Ce protocole IDAT utilise un anticorps secondaire couplé a un oligonucléotides contenant un promoteur du phage T7 ; détecte l'amplification de ce marqueur en ajoutant l'ARN polymérase de T7 à l'échantillon et en utilisant des sondes fluorescentes courantes (**Gibson et Muse, 2004**).

1.3 Applications scientifiques de la protéomique

1.3.1 Analyse des modifications post-traductionnelles

1.3.1.1 Généralités

- ✚ Les modifications post-traductionnelles (PTMs) sont des mécanismes essentiels utilisés par les cellules eucaryotes afin de diversifier les fonctions de leurs protéines, de leur donner leur forme mature active et de coordonner dynamiquement leurs réseaux de signalisation, soulignant l'importance des PTMs dans le maintien d'un état cellulaire normal.
- ✚ Les PTMs modifient la structure et les propriétés des protéines par le biais de réactions biochimiques. Ces modifications peuvent être divisées en trois classes principales:
 - La première est l'addition covalente d'une ou plusieurs molécules sur une protéine.
 - La seconde est le clivage protéolytique d'une ou plusieurs liaisons peptidiques (**Mann et Jensen, 2003**).
 - La troisième est la formation de liaisons intra- ou intermoléculaires.

Dans la première catégorie, des groupements tels que les phosphoryles ($-PO_3^{2-}$), acétyles ou glycolyses sont attachés covalamment aux chaînes latérales des acides

aminés *via* l'activité catalytique d'enzymes spécifiques. Ces groupements sont de complexité variable ; on distinguera ainsi les petits groupements chimiques (par exemple la phosphorylation et l'acétylation), les molécules complexes (par exemple la glycosylation) et les protéines entières (par exemple l'ubiquitination) dans la deuxième catégorie, des enzymes appelées protéases catalysent la coupure des liaisons peptidiques.

Enfin, la formation de liaisons covalente intramoléculaire la plus fréquente est l'oxydation de cystéines en cystines avec formation de ponts disulfure, mais il est également possible de ponter des chaînes latérales avec l'extrémité N- ou C-terminale d'une protéine ou d'un peptide pour former des structures en lasso (**Bayro et al., 2003**).

- ✚ Plus de 300 modifications de protéines, générées par addition d'un groupement sur un ou plusieurs types d'acides aminés, par clivage protéolytique, ou par liaison intra- ou intermoléculaire, sont décrites à ce jour (**Jensen, 2004**).

Parmi, les PTMs les plus communes, on peut citer l'élimination de la méthionine en position N-terminale des protéines par une méthionine aminopeptidase, la formation des ponts disulfures, la glycosylation, la phosphorylation, l'ubiquitination ou la lipidation.

- ✚ Les PTMs peuvent être réversibles ou irréversibles. Des modifications permanentes, telles que le clivage protéolytique, la formation de pont disulfure ou la glycosylation, sont essentielles pour une maturation structurelle et fonctionnelle appropriée des protéines nouvellement synthétisées. D'autres modifications covalentes sont transitoires et jouent des rôles importants dans les voies de signalisation et la régulation des protéines (**Yang, 2005**).
- ✚ Une même protéine peut être modifiée sur plusieurs sites et par différentes PTMs. Cela permet d'obtenir un grand nombre de combinaisons et d'accroître la diversité du protéome.
- ✚ Le niveau d'abondance des PTMs est finement ajusté par des enzymes qui ajoutent ou suppriment les modifications. En agissant de manière coordonnée, les PTMs jouent un rôle clé dans la fonction des protéines, car elles régulent l'activité enzymatique, les interactions avec d'autres molécules (protéines, acides nucléiques, lipides, cofacteurs) et la localisation dans la cellule (**Beltrao et al., 2013**). Pour moduler la fonction des

protéines, les PTMs peuvent agir de plusieurs manières. L'addition d'une molécule sur une protéine peut :

- Provoquer un changement de la structure tridimensionnelle de la protéine et ainsi modifier l'agencement de son site actif, de domaines d'interaction et de sites de fixation des ligands.
- Créer un site de liaison pour le recrutement d'effecteurs contenant des domaines d'interaction qui reconnaissent le résidu modifié (**Seet et al., 2006; Deribe et al., 2010**). Plusieurs mécanismes d'interaction dépendants des PTMs sont décrits.
- Les développements récents en spectrométrie de masse et en préparation d'échantillon, tels que l'enrichissement, permettent d'identifier les PTMs à haut débit (**Choudhary et Mann, 2010**). Les PTMs les plus étudiées sont la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination et la glycosylation.

1.3 .1.2 Phosphorylation

1 .3 .1.2.1 Mécanisme

La phosphorylation est un mécanisme dynamique et réversible de par l'action antagoniste de protéines kinases, ajoutant le groupement phosphate sur un acide aminé hydroxylé (sérine, thréonine ou tyrosine) d'une protéine, et de protéines phosphatases, qui vont ôter le groupement phosphate des protéines.

La phosphorylation intervient sur les résidus sérine, thréonine ou tyrosine avec un ratio de 1000 :100 :1, respectivement (**de Graauw et al., 2006**).

Dans la plupart des cas, l'addition d'un groupement phosphorylé provoque des changements conformationnels dans la protéine phosphorylée. Ces changements peuvent affecter l'activité enzymatique et/ou les interactions protéine-protéine (**Johnson et Lewis, 2001**). Ainsi, une protéine peut être activée (**Leonard et al., 2013**) ou inactivée (**Burke et al., 2010**) par phosphorylation, ou même passer d'une voie de signalisation à une autre. En plus de modifier les propriétés intrinsèques des protéines par régulation allostérique, un rôle important de la phosphorylation est de créer des sites pour l'interaction avec d'autres protéines. Ces dernières contiennent des domaines qui reconnaissent les phospho-motifs et s'y lient. Ces domaines présentent une spécificité pour les 20 différents acides aminés phosphorylés.

1.3.1.2.2 Enzymes impliquées

Les protéines kinases et phosphatases ont une structure conservée au cours de l'évolution et jouent un rôle primordial dans la régulation de nombreux processus cellulaires en modifiant la fonction de leurs protéines cibles (**Delom et al., 2006**).

Plus de 500 *protéines kinases* sont codées par le génome (**de Graauw et al., 2006**). Ces enzymes peuvent être classées en fonction de leurs substrats, on distinguera alors les protéines tyrosine kinases et les protéines sérine/thréonine kinases (**Shchemelinin et al., 2006**). Les protéines tyrosine kinases peuvent elle-même être divisées en sous-groupes comprenant les récepteurs, qui sont des protéines transmembranaires avec un domaine extracellulaire de liaison à un ligand et un domaine kinase intracellulaire, et les non-récepteurs qui sont principalement retrouvés dans le cytosol ou le noyau (**Shchemelinin et al., 2006**).

1.3.1.3 La N-acétylation

La N-acétylation consiste à transférer un groupement acétyle sur l'azote N-terminal (acétylation N-terminale) ou sur l'azote d'une lysine (acétylation de lysine).

L'acétylation N-terminale nécessite le clivage préalable de la méthionine N-terminale par la Méthionine aminopeptidase (MAP). Ensuite, l'enzyme N-acétyltransférase (NAT) ajoute un Groupement acétyle en utilisant l'acétyl-CoA. Ce type d'acétylation est irréversible et se produit au cours de la synthèse de la protéine (**Figure 03**). Bien que 80 à 90 % de protéines eucaryotes soient acétylées de cette manière (**Arnesen, 2011**).

L'acétylation de la fonction ϵ - NH₂ de la lysine (appelée acétylation de la lysine) sur les extrémités N-terminales des histones est une voie courante de régulation de la transcription des gènes. L'acétylation des histones est un événement réversible qui réduit la condensation chromosomique pour promouvoir la transcription. L'acétylation de ces lysines est régulée par des facteurs de transcription qui contiennent une activité histone acétyle transférase (HAT) et des histones déacétylases (HDAC). En combinaison avec des méthylations, ces acétylations constituent le code histone à la base des phénomènes épi génétiques. Certains auteurs ont

proposé la mesure systématique des modifications d'histones par spectrométrie de masse dans l'optique du "déchiffrement" du code histone (Young et al., 2009).

L'acétylation de protéines peut être détectée par immun précipitation en utilisant des anticorps spécifiques des lysines acétylées ou par spectrométrie de masse en recherchant des incréments de masse de +42 Da par acétylation. Avec 3600 sites d'acétylation identifiés sur 1750 protéines

Choudhary et al. (2009) ont ainsi montré que l'acétylation des lysines est une modification répandue impliquée dans la régulation de plusieurs processus cellulaires tels que le cycle cellulaire ou le transport nucléaire

L'acétylation des lysines semble également avoir un rôle dans la régulation des voies métaboliques (Zhao et al., 2010).

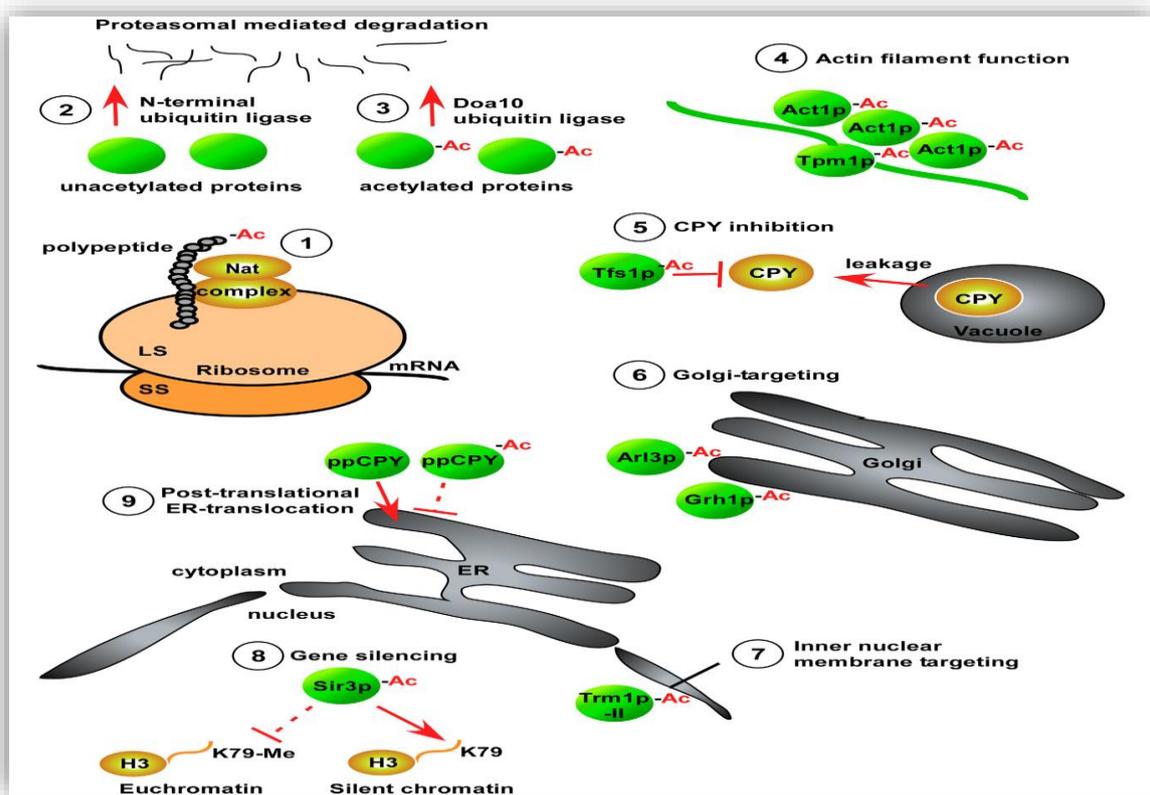


Figure 03 : Effets fonctionnels de l'acétylation N-terminale. (Arnesen, 2011)

L'importance et le grand nombre des modifications post-traductionnelles sont des évènements bien admis. Transitoires ou permanentes, elles jouent un rôle important non seulement dans la fonction mais aussi dans la régulation de la fonction des protéines.

Ces modifications post-traductionnelles provoquent des changements des propriétés physico-chimiques de la protéine. Une variation du point isoélectrique et de la masse est observée. Ces variations vont avoir des conséquences lors de l'analyse par les techniques d'électrophorèse 2D où la formation de traînée pendant la migration de la protéine peut être observée.

De même, lors de l'analyse en spectrométrie de masse, le spectre obtenu pour cette protéine sera aussi modifié. Ces différences de propriétés identifiées et répertoriées peuvent alors être utilisées pour caractériser ces modifications post-traductionnelles.

Ainsi, **Sickmann et al., (1999)** donnent pour la phosphorylation où ils constatent que les fragments de peptides modifiés révèlent un signal à -80 Da et -98 Da expliqué par la perte respective de HPO_3 et H_2PO_4 en MALDI-PSD par le fragment phosphorylé. Connaissant l'importance de l'évènement de phosphorylation dans les signaux de transduction (modulation de l'activité de certaines enzymes et de certains récepteurs).

Les mêmes auteurs (**Sickmann et al., 1999**) rappellent que selon les différents types d'acides aminés O-phosphoryles, N-phosphoryles, S-phosphoryles, des précautions doivent être prises lors de la préparation des échantillons pour l'analyse. En effet la stabilité de la phosphorylation varient selon les acides aminés sur lesquels elle s'effectue, ainsi les phospho-thréonines, -sérines, et -tyrosines sont stables en milieu acide comme en milieu alcalin contrairement aux phospho-aspartates, - glutamates dont le phosphate est très instable dans ces deux types de milieu. Le taux de protéines phosphoryles étant très faible, la préparation des échantillons doit passer par une étape d'enrichissement en la forme phosphorylé par analyse en chromatographie échangeuses d'ions après incorporation ou non de phosphate radioactif. Une technique de chromatographie d'affinité, IMAC (Immobilized Gallium(III) Affinity Chromatography) (**Posewitz et Tempst, 1999**) peut aussi être utilisée, les phosphopeptides sont retenus de façon sélective et en quantité suffisante pour être analysés en spectrométrie de masse MALDI/TOF ou ESI.

1.3 .2 Etude des interactions Protéine / Protéine

Les interactions protéine-protéine sont un aspect essentiel des processus biologiques. Elles sont fortement impliquées dans la formation de structures macromoléculaires, dans la signalisation, dans la régulation et dans les différentes voies métaboliques. Leur étude est donc cruciale pour la compréhension des réseaux d'interaction protéiniques, but majeur dans l'étude des systèmes biologiques (**Gervais ,2010**).

Les interactions protéine-protéine ont un rôle conséquent dans l'induction de beaucoup d'états pathologiques et dans les processus importants pour la pathogenèse des infections bactériennes et virales (**Karimova et al., 2002**).

La haute spécificité de ces interactions fait d'elles des cibles idéales pour les agents thérapeutiques. (**Park et Raines ,2000**), (**Vidal et Endoh, 1999**). Dans certains cas, notamment chez les plantes, l'identification des interactions protéine-protéine est une étape critique dans la détermination des fonctions de protéines inconnues. En effet, l'absence d'outils technologiques comme une vaste collection d'anticorps ne permet pas dans certains cas d'étudier directement la fonction d'une protéine donnée (**Gervais ,2010**).

La forte prédiction des relations fonctionnelles de protéines dont l'interaction a été montrée est importante pour l'annotation des gènes. Chez les végétaux, les protéines sont souvent définies uniquement par la traduction de séquence codante. Le séquençage partiel de génomes comme ceux du blé (*Triticum aestivum*, 17000 Mb) et du maïs (*Zea mays*, 2500 Mb), d'*Arabidopsis thaliana* (157 Mb), ou du riz (*Oryza sativa*, 430 Mb) De plus, l'étude fonctionnelle des gènes dans un organisme ou un tissu donné ne donne pas des résultats toujours applicables aux protéines correspondantes (**Gervais ,2010**).

L'une des techniques les plus utilisées est celle du double hybride chez la levure (**Biffo et Marchisio ,1999**), cependant son utilisation est limitée pour l'étude d'éléments physiologiques spécifiques des organismes pluricellulaires (**Pasquali et al., 2000**).

Des auteurs ont combiné une technique qui utilise des protéines mutées « piègeuses de Substrats » et des approches protéomique pour découvrir des substrats de tyrosine Phosphatase (PTPs) (**Pasquali et al. , 2000**).

Ces enzymes déphosphorylent les protéines phosphorylées sur une Tyrosine. La technique mise en œuvre utilise des enzymes mutées comme sonde, elles peuvent se lier à leur substrat mais ne peuvent plus le déphosphoryler, le substrat est donc piégé.

1.4 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.

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 ou zwitterioniques, ont été développés. Des études comparatives ont été menées d'où il ressort que les détergents de la famille des sulfobétaines (dont le SB 3-10 et l'ASB14), 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, 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 (**Luche et al., 2003**).

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, comme c'est le cas, par exemple, des protéines de paroi.

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)**.

- **Immobilized pH gradients (IPG)**

L'électrophorèse bidimensionnelle basée sur l'utilisation de gradients de pH immobilisés (IPG) a été introduite en 1987 (**Hanash, 2000**), les IPG permettent l'isoélectrofocalisation (IEF) des protéines lors de la première dimension de la 2-DE.

Ils ont permis de surpasser les limites imposées par les anciens gradients d'ampholytes utilisés pour l'IEF (**Hanash, 2000**). Contrairement à ces derniers, dans les IPG, le gradient de pH fait parti intégrante du gel de polyacrylamide. Il est obtenu en incorporant dans le gel par

copolymérisation, des groupements acides et basiques ayant un effet tampon et appelés immobilines.

Les IPG se présentent sous forme de bandelettes, faciles à utiliser et dont les dimensions les plus courantes sont 180mm X 3.5mm pour seulement 0.05mm d'épaisseur. Avant d'effectuer la migration, ces bandelettes sont réhydratées dans un tampon contenant 8M d'urée, 0.5-2 % d'un détergent, 0.2 % de dithiothreitol (DTT) et 0.2 % d'ampholytes (CA) (**Anonyme A**) Les gels IPG réhydratés sont placés dans la chambre d'électrofocalisation qui est réfrigérée pour éviter toute surchauffe lors de la migration des protéines. L'extrémité acide de la bande IPG doit être placée du côté anodique.

Les échantillons protéiques (de 40 à 80 µl) sont déposés sur le gel grâce à des cupules de dépôt (cup_ loading). La concentration des échantillons ne doit pas excéder 5 à 10 mg / ml pour limiter les risques de précipitation des protéines (**Anonyme A**) Toujours dans ce but, le voltage doit être appliqué de façon progressive (**Hanash, 2000**). Le temps de migration dépend du gradient de pH utilisé et de la longueur de la bande IPG.

Le gel de type IPG permettent d'obtenir de très bonnes résolutions, notamment parce qu'ils présentent des gammes de pH très variées. Selon les applications, un IPG avec un intervalle de pH faible (une unité pH), moyen (3 à 5 unités pH) ou important (7 unités pH) peut être employé. Les IPG sont très utiles pour séparer des protéines basiques qui ne sont pas visualisées par un gradient d'ampholytes.

Ainsi, **Norbeck et Blomberg (1997)** ont montré que 25 % des protéines (basiques) de la levure n'étaient pas résolus par un gradient d'ampholytes mais mis en évidence par un IPG de pH 3-10.

Les IPG permettent d'obtenir des pH proches de 12, ils sont donc très intéressants pour analyser des protéines très basiques comme les histones et les protéines ribosomales (**Görg et al., 1997**).

Grâce à certains IPG, présentant un gradient de pH étroit, des peptides dont les pI diffèrent de 0.003 unités pH sont séparés. Cette très haute résolution est utile pour distinguer des protéines mutantes (**Görg et al., 1997**).

La résolution en 2-DE est augmentée en utilisant des gels IPG présentant de faibles intervalles de pH se chevauchant. (**Wildgruber et al., 2000**) ont pu révéler 2286 spots

protéiques chez la levure grâce à cinq IPG de pH 4-5, 4.5-5.5, 5-6, 5.5-6.7, 6-9. La même étude avec un IPG de pH 3-10 ne permet de révéler que 755 spots.

Les IPG, contrairement aux gradients d'ampholytes, offrent une très haute reproductibilité au niveau de la position des spots en 2-DE. Par contre, la reproductibilité quantitative pour les différents spots est moins élevée (**Norbeck et Blomberg, 1997**).

Concernant la seconde dimension, la disponibilité dans le commerce de gel pré-coulé permet là aussi une standardisation du protocole et d'accroître la reproductibilité.

De nouveaux types de coloration ont également accru la résolution des spots protéiques, il s'agit de fluorophore (Sypro Orange, SyproRed, Sypro Ruby) avec une sensibilité de coloration presque équivalente à celle de l'argent (0,5 ng de protéine) et une linéarité d'intensité, une reproductibilité, une facilité et une rapidité proche de la coloration au bleu de Coomassie (**Rabilloud et al., 2001**).

Chapitre 2 :
Spectrométrie de masse

2 .La spectrométrie de masse : une technique de choix pour la protéomique

2.1 Historique

La spectrométrie de masse est née des travaux de Joseph John Thompson (prix Nobel physique 1906) et de Francis William Aston (prix Nobel de chimie 1922). A cette époque, la spectrométrie de masse a été utilisée surtout pour la mesure de masse des atomes et des isotopes. Mais il faut attendre 20 ans d'amélioration du pouvoir de résolution de l'instrument, pour voir le premier spectromètre de masse commercialisé aux Etats Unis en 1942. Très vite le coût et la complexité de l'instrument a été un frein pour son expansion (**Griffiths, 2008**).

Les premiers domaines dans lesquels le spectromètre de masse a été utilisé sont: la physique (pour la mesure de masses atomiques), la chimie industrielle (pour le contrôle de qualité de produits) et l'industrie pétrolière (pour la mesure des abondances des hydrocarbures au cours de la production).

Ce n'est qu'à partir de 1960 que commence l'intérêt des sciences du vivant et la chimie pour la spectrométrie de masse en tant qu'outils d'aide pour la compréhension de la complexité des molécules fragmentées a l'intérieur de l'instrument, mais aussi le sondage de son utilisation pour d'autres applications.

La spectrométrie de masse a été des lors utilisée pour l'analyse des biomolécules volatiles de petite taille mais pas pour l'analyse de grosses structures moléculaires peu volatiles comme les protéines (**Griffiths, 2008**).

Les années 1980 ont connu une rupture technologique avec la découverte presque simultanée de 2 techniques d'ionisation douces en 1988 qui ont révolutionné l'analyse de macromolécules biologiques : le MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) par Koichi Tanaka et l'ionisation electrospray (ESI) par John Fenn (tous deux, lauréats du prix Nobel de chimie en 2002). Ces deux techniques ont rendu possible le transfert de macromolécules intactes de la phase liquide ou solide en phase gazeuse et ont ouvert la voie à la spectrométrie de masse moderne pour l'analyse protéomique (**Gelpi , 2008**).

Il existe on compte des dizaines de spectromètres de masse disponibles sur le marché dont les constructeurs les plus représentés sont : Agilent Technologies, Applied Biosystems, Bruker Daltonics, Perkin Elmer, Shimadzu/Kratos Analytical, Thermo Fisher Scientific, Waters Corporation (**Gelpi, 2009**).

2.2 Définition de la technique

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui permet la détermination de la masse moléculaire des composés analysés ainsi que leur identification et leur quantification. Elle est fondée sur la séparation et la détection d'ions formés dans une source d'ionisation ou dans une chambre de collision. Ces ions proviennent de la molécule à analyser. Il est donc possible avec cette méthode d'obtenir des informations structurales aussi bien sur les petites molécules organiques que sur des bio-polymères tels les acides nucléiques et les protéines. Les traitements chimiques ou enzymatiques des macromolécules biologiques préalablement à l'analyse par spectrométrie de masse (Hainque *et al.*, 2008).

2.3 Principe de la spectrométrie de masse en tandem (ou MS/MS)

Combine en général deux analyseurs. En MS/MS les ions formés dans la source entrent dans le premier analyseur MS 1. Parmi ces ions, un ion précurseur est sélectionné (MS 1 est utilisé comme filtre d'ions). Seuls les ions ayant le rapport m/z sélectionné pourront sortir de MS1. Ils entrent alors dans une cellule de collision où l'énergie interne des ions est augmentée pour les activer, de manière à provoquer leur décomposition (Schaeffer-Reiss, 2008).

Les ions précurseurs activés se dissocient en ions fragments, en rompant certaines liaisons chimiques dans la molécule. Les rapports m/z de ces fragments sont alors étudiés dans le second analyseur MS. La formation de ces ions fragments suit des règles précises (Figure 04).

Les groupes chimiques ont leurs caractéristiques propres de fragmentation. et le profil d'un spectre MS/MS donne en général des informations complètes et fiables sur la structure du composé précurseur, la fragmentation par dissociation induite par collision (CID) est la méthode de fragmentation des peptides la plus couramment utilisée (Hunt *et al.*, 1989) la fragmentation a lieu lorsque les peptides entrent en collision avec des molécules de gaz neutre (Argon, Hélium, Néon).

Puisque la dissociation intervient lorsque l'énergie de collision est supérieure à l'énergie d'activation, on parle aussi de dissociation activée par collision (CAD), la fragmentation à basse énergie (10_ 100 eV) intervient dans les quadripôles et les trappes ioniques, ce qui résulte en pertes de neutres et en ruptures des liaisons peptidiques (Papayannopoulos, 1995).

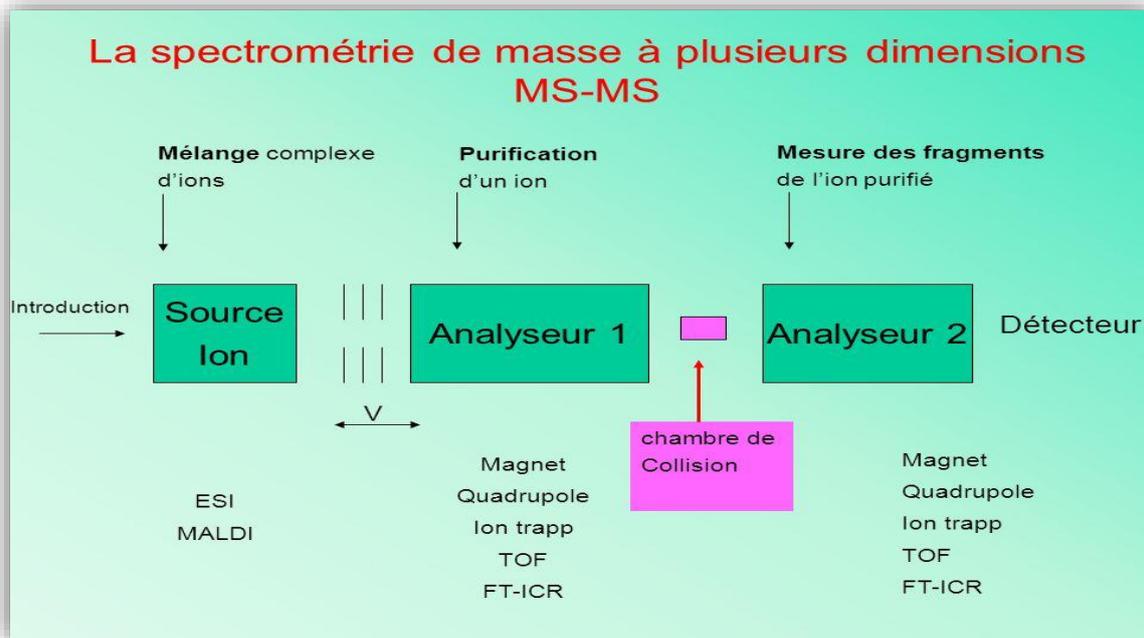


Figure 04 : Schéma simplifié d'un spectromètre de masse en tandem ou MS/MS (Schaeffer-Reiss, 2008).

2.4 Principe de la spectrométrie de masse de type MS

Un spectromètre de masse comporte trois modules :

- Le premier module est la **chambre d'ionisation** permettant de faire passer les différents fragments peptidique de la phase solide à une phase gazeuse ionisée, après leur extraction à partir d'un gel 2D ou leur élution d'une colonne de chromatographie, **deux chambres d'ionisation** courantes utilisent la désorption de la matrice assistée par laser (**MALDI** pour « Matrix Assisted laser Desorption ionization ») et ionisation par électro-aérosol (**ESI** pour « electrospary ionization »).
- Le deuxième module est une **chambre de séparation** dans laquelle les ions se déplacent dans la vide en fonction de leur charge et de leur masse et sont séparés sur la base de leur temps de vol (**TOF** pour « time -of-flight »).
- Le troisième module est un **détecteur** ayant la sensibilité et la résolution nécessaires pour séparer des pics de plus de 10000 espèces moléculaire différents (Gibson et Muse, 2004).

2.4.1 Les sources d'ionisation

2.4.1.1 Desorption-ionisation laser assisté par matrice (MALDI)

L'ionisation par technique MALDI se déroule en deux étapes :

Dans la première, la substance à analyser est mélangée à une solution de petites molécules organiques, appelées matrices, possédant une forte absorption dans l'ultraviolet. Cette solution est déposée sur une surface métallique, appelée la cible MALDI (**Figure 05**). L'évaporation du solvant avant analyse aboutit à la formation d'un dépôt de matrice/analyte cocrystallisé où les cristaux de matrice sont dopés en molécules d'analyte dispersées (105 à 106 fois plus de molécules de matrice que d'analyte (**Dubois, 2008**)).

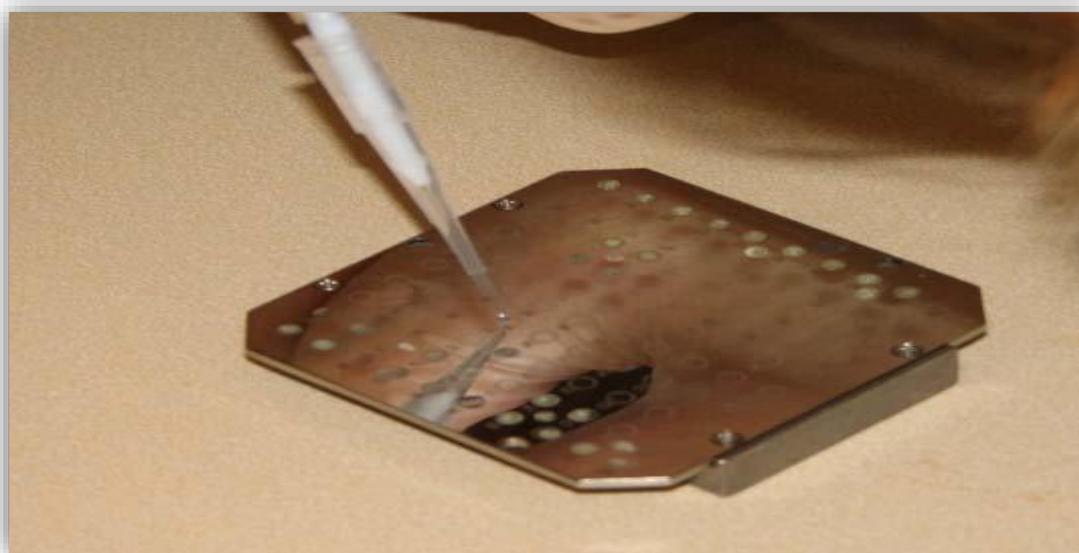


Figure 05 : Photographie d'une cible MALDI (Applied Biosystems) (**Dubois, 2008**).

La deuxième étape se produit sous vide après transfert de la plaque MALDI dans la chambre d'ionisation du spectromètre. Le dépôt est irradié par des impulsions laser intenses. La Majorité des lasers utilisés sont à azote et émettent à une longueur d'onde de 337 nm (laser à Azote). La durée des impulsions laser est de l'ordre de quelques nanosecondes, Ces impulsions sont répétées à une fréquence de quelques Hertz. L'acquisition d'un spectre de masse se fera Donc par accumulation d'un certain nombre d'impulsions laser, de l'ordre de plusieurs Centaines. L'énergie transmise par le laser est absorbée par la matrice, et cette irradiation induit l'accumulation d'énergie dans la phase condensée sous la forme d'excitation

des molécules de la matrice. Cet apport d'énergie très localisé cause l'ablation d'une portion de la surface du cristal et/ou la sublimation des cristaux, suivie de l'expansion d'agrégats de la Matrice en phase gazeuse (**Figure 06**), entraînant l'analyte intact dans le panache d'expansion (**Dreisewerd, 2003**).

Le mécanisme le plus largement admis pour la formation des ions implique le transfert de protons soit avant désorption en phase solide, soit dans le panache d'expansion en phase gazeuse. (**Alves et al., 2006**).

Les ions formés sont alors accélérés à l'aide d'un champ électrostatique vers l'analyseur.

Le choix de la matrice utilisée pour Co-cristalliser les analytes est primordial pour observer et une bonne désorption et ionisation des composés, elle permet d'assurer la protection de l'analyte et la transmission des protons à l'échantillon (**Dubois, 2008**).

Les plus utilisées sont les dérivés des acides cinnamiques et benzoïques. Classiquement, l'acide dihydroxybenzoïque (DHB), l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -HCCA) (**Beavis et Chait, 1989**).

La méthode de désorption et d'ionisation laser assistée par matrice couramment utilisée lors des analyses protéomique et est devenue une méthode incontournable pour l'analyse de molécules de haut poids moléculaire comme les bio polymères (peptides, protéines, oligonucléotides, oligosaccharides...). L'obtention majoritaire d'espèces mono-chargées permet de générer des spectres de masses simples et facilement interprétables. Quelques ions multichargés, quelques multimères et une faible fragmentation peuvent également être observés en fonction des matrices utilisées (**Dubois, 2008**).

L'innovation se poursuit par le développement de nouvelles techniques :

- **DIOS** (*desorption-ionisation on porous silicon*) pour les molécules de faibles masse moléculaires, le **SALDI** (*surface activated laser desorption ionisation*) qui utilise le graphite comme surface.
- **SELDI** (*surface Enhanced Laser Desorption Ionization*) (**Merchant et Weinberger 2000**) pour la purification d'échantillons biologiques à même la cible qui est fonctionnalisée par des anticorps.
- **APMALDI** (*atmospheric pressure-MALDI*) qui permet d'appliquer cette méthode d'ionisation à pression atmosphérique.

- Enfin, le **MALDI** permet de réaliser une cartographie de la répartition de certains peptides ou protéines dans un organe. L'imagerie moléculaire par MALDI de coupes de biopsie ou de tissus va devenir un outil clé pour étudier les pathologies (**Pierson and al., 1997**) en fournissant des cartes moléculaires des échantillons.

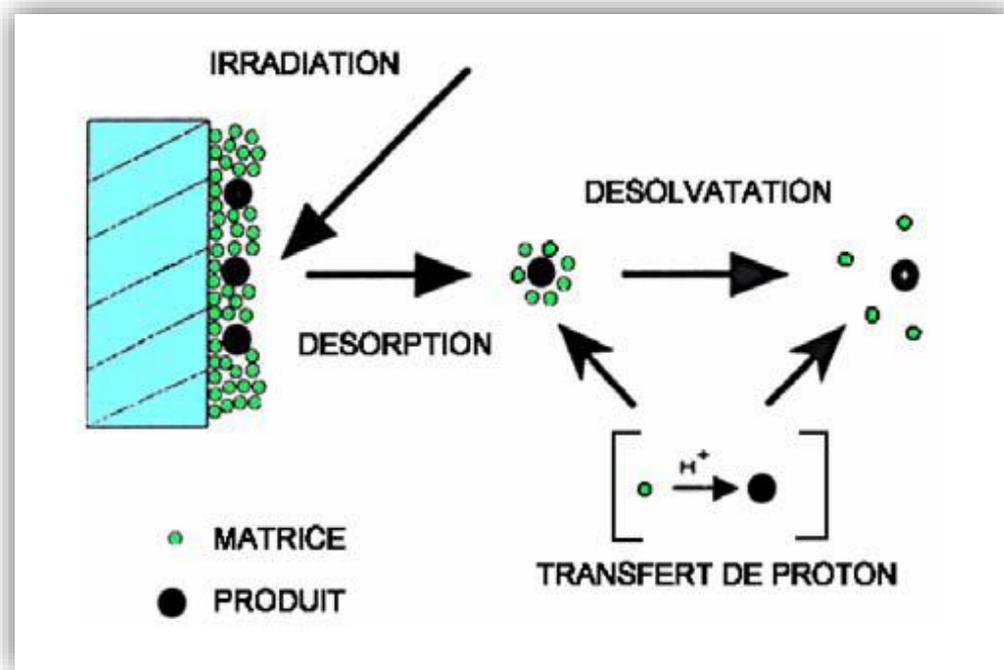


Figure 06 : Principe de la désorption/ionisation MALDI (de Hoffmann et Stroobant, 2005)

2.4.1.2 Les sources électrospray (ESI : ElectroSpray Ionisation)

L'électrospray est une source d'ions à pression atmosphérique (**Figure 07**) qui peut facilement être couplée à la chromatographie liquide. Cette technique, proposée par M. Dole en 1968, a été développée par J.B. Fenn au milieu des années 80 et est utilisée en spectrométrie de masse pour produire des ions à partir de composés en solution (**Dubois, 2008**). Considérée au début comme une source de désorption-ionisation dédiée à l'analyse de polymères, et appliquée ensuite aux protéines, son utilisation s'est rapidement élargie non seulement à d'autres biopolymères, mais également à l'analyse de petites molécules. Cette technique d'ionisation-désorption, n'induit quasiment pas de fragmentation. C'est la raison pour laquelle la méthode électrospray est considérée comme une technique d'ionisation désorption douce (**Dubois, 2008**).



Figure 07: Photographie d'une source electrospray (Thermo) (Dubois, 2008).

Les mécanismes conduisant à la formation d'ions en phase gazeuse par electrospray peuvent être résumés en trois étapes principales: (1) La formation de gouttelettes chargées à partir de l'extrémité d'un capillaire métallisé, (2) L'évaporation du solvant et les explosions coulombiennes, (3) Formation d'agrégats chargés, (4) Finalement obtention d'ions désolvatés en phase gazeuse (positifs, négatifs et adduits, en fonction du mode d'ionisation) (Figure 08) (Dubois, 2008).

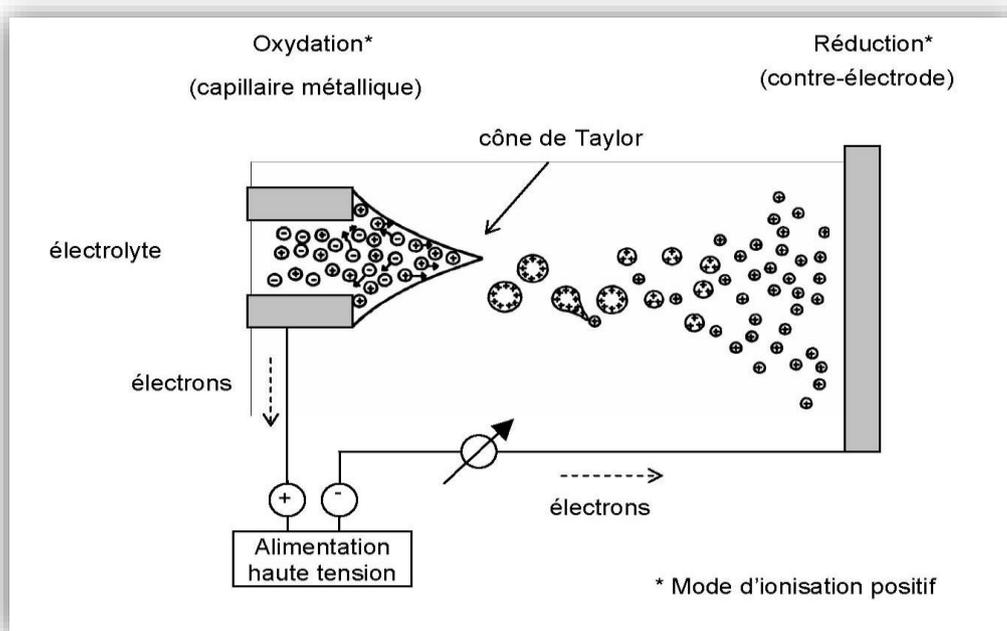


Figure 08 : Schéma simplifié du fonctionnement d'une source électrospray (Kearle, 2000).

2.4.1.3 Comparaison des deux techniques d'ionisation

Les deux techniques d'ionisation utilisées pour l'étude du protéome donnent des informations différentes sur les protéines. En effet le MALDI est préférentiellement utilisé pour obtenir des informations sur la séquence des protéines alors que l'ESI permet de déterminer la masse des analytes. Toutefois, la spectrométrie en tandem permet d'utiliser l'ESI pour la détermination de séquences. En effet une analyse en MALDI est 10 fois plus rapide que l'ESI, Par contre l'ESI est une technique plus sensible permettant d'obtenir des mesures de masses beaucoup plus précises (Regula et al., 2000).

2.4.2 Les analyseurs et spectrométrie de masse

2.4.2.1 Analyseur utilisant un champ électrique constant analyseur à temps de vol (TOF)

Le principe de fonctionnement de ce spectromètre de masse est simple dans le TOF, les ions sont formés dans une région relativement limitée de la source en présence d'un champ électrique E qui accélère les ions sur la longueur s de la source avant leur parcours dans une région sans champ et de longueur D beaucoup plus élevée jusqu'à un détecteur (Figure 09) (Hainque et al., 2008).

Un des problèmes majeurs des premiers analyseurs TOF était la faible résolution qu'ils pouvaient présenter ; En effet, les ions de même rapport m/z formés dans la source présentent des hétérogénéités temporelles, spatiales et cinétique qui provoquent un élargissement des pics puisqu'ils n'arriveront pas de même temps au détecteur.

Les ions les plus légers ont une plus grande vitesse et arrivent au détecteur plus rapidement que les plus lourds de plus faible vitesse. L'analyseur à temps de vol peut être couplé aux sources ESI et MALDI. En théorie, le domaine de masse d'un instrument TOF n'a pas de limite supérieure, ce qui le rend particulièrement bien adapté aux techniques d'ionisation douce comme les sources MALDI qui produisent des ions de rapport m/z élevé (Hainque et al., 2008).

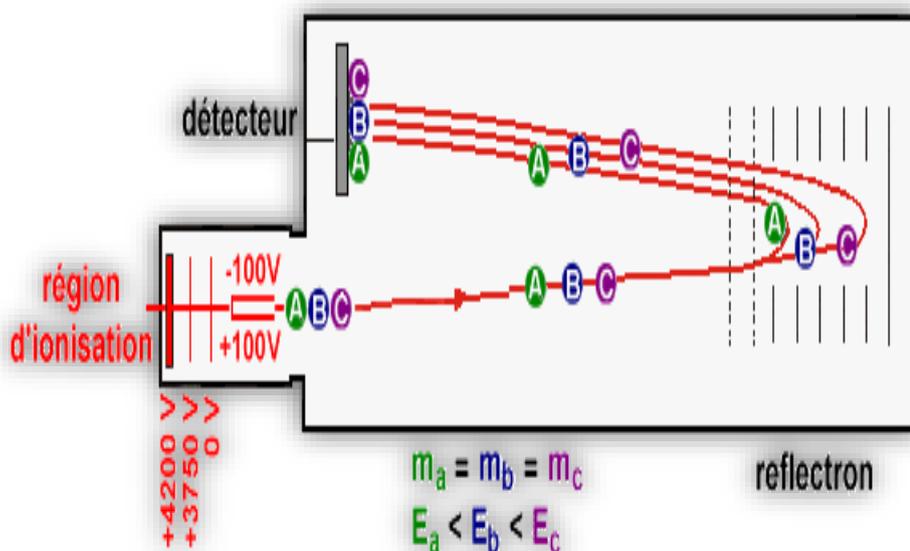


Figure 09 : Principe L'analyseur à temps de vol (TOF) (Hainque et al., 2008).

2.4.2.2 Les triples quadripôles

❖ Le quadripôle

Il utilise la stabilité des trajectoires dans un champ électrique oscillant pour séparer les ions selon leur rapport m/z . Il est constitué de quatre barres parallèles (Ferguson et al., 1965) ayant idéalement une section hyperbolique, auxquelles on applique une tension continue additionnée d'un potentiel modulé en radio fréquence, déphasés de 180° .

L'application de ces potentiels crée un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant entre les électrodes. Les ions extraits de la source, sont accélérés et focalisés par un jeu de lentilles électrostatiques jusqu'à leur entrée dans l'analyseur quadripolaire. Seuls les ions dont le rapport m/z permet une trajectoire stable dans l'analyseur (par résonance) atteignent le détecteur. Les autres, dont la trajectoire n'est pas stable, entrent en contact avec les barres et s'y déchargent avant d'atteindre l'extrémité de l'analyseur et ne sont pas détectés (Figure 10) (Bouchoux et Sablier, 2005).

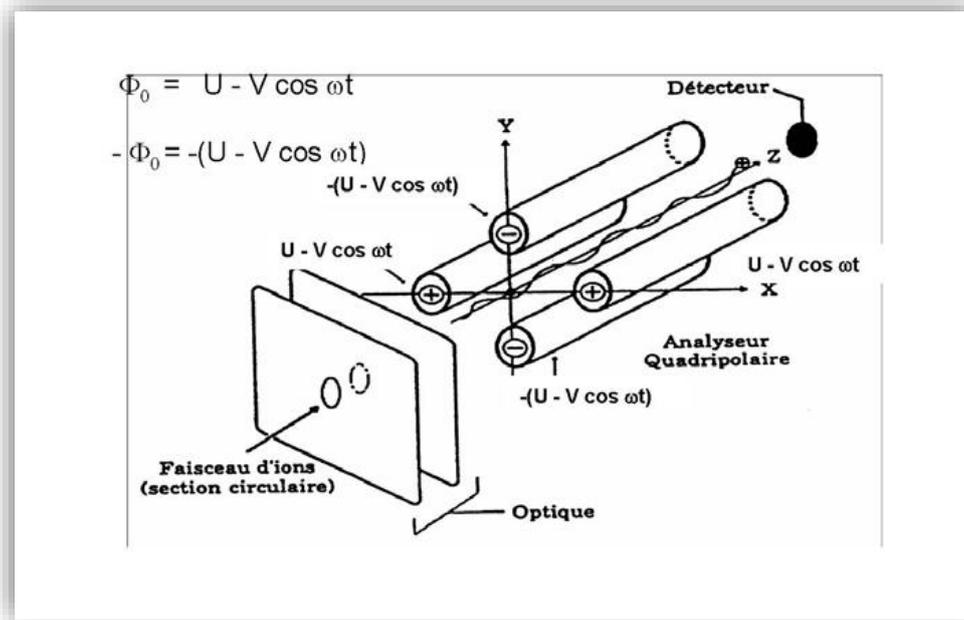


Figure 10 : Schéma d'un analyseur quadripolaire avec la représentation de la trajectoire des ions selon l'axe du spectromètre (Campana 1980).

❖ **Les triples quadripôles (TQ ou QqQ)**

- Dans le quadripôle central, qui est souvent remplacé par un hexapôle pour des raisons de transfert optimal d'ions, on peut introduire un gaz de collision à une pression telle qu'un ion entrant dans la cellule de collision subisse en moyenne une collision. La fragmentation dans les quadripôles est donc obtenue par CID. Dans le triple quadripôle, l'énergie de fragmentation est transmise à l'ensemble des ions contenus dans la cellule par application d'une différence de potentiel.
- Les triples quadripôles permettent diverses configurations d'analyse : les balayages d'ions fragments d'un parent constant, d'ions précurseurs d'un fragment constant, de perte de neutre (perte d'un fragment de rapport m/z constant) et SRM qui fixe les analyseurs pour isoler un ion précurseur et un ion fragment. Cette dernière configuration est la plus utilisée pour la quantification puisqu'elle permet d'atteindre une grande spécificité à partir de mélange complexe comme les matrices biologiques. En effet, même si les analyseurs de type quadripôle sont de faible résolution, la probabilité pour que deux composés aient un rapport m/z identique à la fois pour leur ion précurseur et pour un ion fragment est faible. Si une séparation chromatographique

est appliquée en amont, le paramètre temps de rétention permet d'augmenter la spécificité de l'analyse (Bouchoux et Sablier ,2005).

2.4.2.3 Le spectromètre de masse de type Orbitrap (OT)

Depuis sa commercialisation en 2005, l'Orbitrap est devenu l'un des instruments de Choix dans de nombreuses applications protéomique. Sa haute **précision** de mesure de masse (2-5 ppm) et son pouvoir de **résolution** élevé (jusqu'à 150 000) le rendent très intéressant pour l'analyse de mélanges complexes. Ces nouveaux spectromètres de masse hybrides (Orbitrap XL, Vélos, Vélos Pro) dont les performances s'améliorent continuellement, permettent de superposer les modes d'analyse MS et MS/MS. Ils fournissent ainsi à la fois des informations quantitatives sur l'abondance des différents peptides mesurés avec une grande exactitude ainsi que des informations sur la séquence des peptides. Ces instruments répondent assez bien aux exigences d'analyses de plus en plus importantes en termes de sensibilité et permettent d'atteindre des protéines de faible abondance. En augmentant ainsi la profondeur d'analyse, ils génèrent des centaines, voire des milliers, de spectres de fragmentation par heure d'acquisition. L'attribution d'une séquence peptidique à ces spectres, la déduction des protéines représentées par les peptides identifiés et la détermination de leur abondance dans l'échantillon étudié sont autant de défis informatique et statistique à résoudre (Nesvizhskii et al ., 2007) .

2.5 Le principe de fonctionnement des principaux analyseurs de masse

2.5.1 Le spectromètre MALDI-TOF

Cet appareil associe une source d'ionisation de type MALDI à un analyseur de type Temps de Vol (Time Of Flight ou TOF). Il présente l'avantage d'avoir une gamme de masse pratiquement illimitée (supérieure à 1 MDa) car les ions ne sont déviés par aucun champ magnétique ou électrique. Ceci permet donc d'obtenir les masses de l'ensemble des ions provenant d'un échantillon complexe. De plus, toutes les étapes, de la préparation de l'échantillon au traitement du spectre de masse, peuvent être entièrement automatisées. La gamme de masses mesurées va usuellement de 600 Da à 300 kDa, avec une limite de sensibilité de détection de l'ordre d'une centaine de femtomoles et avec une précision de mesure de plus ou moins 50 ppm (Karas, 1996).

2.5.2 Le spectromètre ESI-MS/MS

La spectrométrie de masse tandem (ou mode MS/MS), permet de fragmenter partiellement un ion préalablement sélectionné (dans le premier quadripôle) par collision sur des molécules de gaz neutre situé dans la chambre de collision (second quadripôle). Ce mode permet ainsi d'obtenir des informations quant à la structure et la stabilité en phase gazeuse de l'ion sélectionné. Les ions issus de la fragmentation sont analysés par le troisième quadripôle. Le spectre de masse ainsi obtenu fait apparaître l'ion parent et les ions fragments dont les intensités varient en fonction de l'énergie de collision (tension appliquée entre le premier et le second quadripôle). Plus l'énergie de collision augmente, plus l'ion n'a des chances de se casser. C'est l'ion qui se casse à la plus faible énergie de collision qui est le moins stable (**Dewald, 1999**)

2.5.3 Analyseur à résonance cyclotronique et à transformée de Fourier (FT-ICR)

La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique et Transformée de Fourier (FT-ICR, Fourier Transform ion Cyclotron Resonance) fut développée en 1974 par Comisarow et Marshall. Cette technique trouve des applications dans des domaines variés, de récents développements technologiques de cet analyseur ont permis de l'adapter aux sources d'ionisation douces comme l'ESI et le MALDI, et en ont fait un outil extrêmement puissant pour l'analyse de macro biomolécules (**Senko et al ., 1996**), dans un champ magnétique, la trajectoire des ions est incurvée, l'ion peut ainsi être « piégé » sur une trajectoire circulaire : c'est le principe du cyclotron.

FT-ICR est actuellement l'appareil le plus versatile, adaptable à une large variété d'analyses MS et MS/MS, il s'agit actuellement de la méthode de spectrométrie ayant la plus large gamme de masse analysable (valeur de m/z de 30 à plus de 300 000), la meilleure résolution et la plus forte précision (2 ppm) pour des quantités de protéine injectées de 100 femtomoles. Cette précision en masse et la capacité à piéger des ions de haut poids moléculaire permettent également de s'intéresser à l'étude de complexes non covalents en conditions natives par ESI combinée à la FT-ICR.

Une réelle flexibilité dans l'analyse de masse est désormais atteinte avec ces appareils très polyvalents et très sensibles (particulièrement le FT-ICR). La diffusion de ce type

d'instruments et leur disponibilité croissante permettent d'envisager des stratégies d'analyses à la fois sur une très large échelle (plusieurs milliers de peptides analysés par 24 heures) mais avec des précisions compatibles avec l'analyse des modifications post-traductionnelles ou des complexes protéiques (Amster, 1996).

2.6 Stratégie d'identification des protéines par spectrométrie de masse : nanoLC-MS/MS

L'analyse protéomique par spectrométrie de masse couplée aux méthodes de séparation des protéines et des peptides, permet d'identifier les protéines contenues dans un échantillon grâce à l'ensemble des spectres MS et MS/MS. En fonction du nombre de protéines contenues dans l'échantillon, des centaines voire des milliers de spectres MS et MS/MS sont alors enregistrés. L'interprétation de ces spectres MS et MS/MS est indispensable pour identifier les protéines correspondantes. Cette interprétation va consister en la mise en relation des spectres de masse avec les séquences peptides et/ou protéiques correspondantes contenues dans la banque protéique. Face à cette quantité de spectres, des outils bioinformatiques ont été développés pour faciliter l'interprétation des données. Selon le type de spectres à interpréter (MS ou MS/MS) on distingue deux approches d'interprétation des données d'analyse protéomique par spectrométrie de masse.

- La première approche (Pappin *et al.*, 1993) consiste à interpréter les données MS (expérience MS de première dimension), c'est-à-dire l'empreinte massique uniquement de la MS. Par exemple dans d'une stratégie "bottom-up", seule la masse des peptides obtenus par analyse en MS, c'est-à-dire l'empreinte peptidique massique (PMF, "Peptide Mass Fingerprinting").

Cette approche d'interprétation de données présente beaucoup de limites comme :

- L'identification de faux positifs, les difficultés d'interprétation de données des échantillons complexes où les empreintes massiques des peptides sont complètement superposées (confusion des peptides de mêmes masses et peptides avec des PTMs par exemple).

- La nécessité d'utiliser des spectromètres de masse de haute résolution et précision de masse comme MALDI FT-ICR bien évidemment plus onéreux et surtout difficiles à utiliser en routine (Horn *et al.*, 2004).

- La deuxième approche consiste à interpréter les données MS/MS, c'est-à-dire à la fois l'information sur l'empreinte massique MS et les fragments obtenus dans la deuxième

dimension MS (MS/MS). Cette approche va permettre d'identifier non seulement les peptides (ions parents) mais l'enchaînement en acide aminés (ions fragments) de ces peptides permettant ainsi de distinguer entre différents peptides de mêmes masses par leur empreinte de fragmentation peptidique (**PFF**, "**Peptide Fragmentation Fingerprinting**").

Cette dernière approche d'identification des protéines basée sur l'interprétation des spectres MS/MS est la plus utilisée car elle offre l'avantage de donner une meilleure fiabilité sur la séquence des peptides, plus d'informations sur la séquence des peptides identifiées et donc des résultats d'identification de protéines beaucoup plus fiables (**Eng et al., 1994**) et (**Mann, et al., 1994**).

2.7 Quantification des protéines par spectrométrie de masse

L'efficacité d'ionisation et la réponse de détection dépendent des caractéristiques physicochimiques des molécules d'intérêt. Ainsi, la réponse en spectrométrie de masse diffère d'un peptide à un autre, rendant la technique non quantitative entre molécules différentes. Cependant plusieurs procédures ont été développées ces dernières années pour quantifier les variations d'expression de protéines entre deux ou plusieurs états physiologiques différents, en comparant les peptides spécifiques à une protéine donnée. Ces méthodes reposent en général sur la comparaison de l'intensité de molécule de formules développées identiques.

La plupart des méthodes de quantification emploient des isotopes stables pour créer un marqueur de masse (tag) spécifique, qui est capable d'être reconnu et quantifié en spectrométrie de masse (**Ong et al., 2002**), ces marqueurs isotopiques peuvent être introduits à différents niveaux de l'expérience. D'autres techniques de quantification sans marquage (label-free) sont d'un intérêt particulier puisqu'elles ne nécessitent aucun réactif de marquage parfois coûteux, et ne sont pas limitées en termes de nombres d'échantillons.

La quantification de protéines par spectrométrie de masse peut être relative ou absolue. La quantification relative permet de comparer l'abondance d'une protéine entre plusieurs échantillons et d'en déduire des variations du niveau d'expression et/ou de dégradation. La quantification absolue permet, grâce à l'utilisation d'un standard de concentration connue, de déterminer la quantité et la concentration d'une protéine dans un échantillon.

2.7.1 Les méthodes pour une quantification relative

2.7.1.1 2D-DIGE (Fluorescence In Gel Electrophoresis)

La complexité des échantillons à analyser et à quantifier en protéomique quantitative ont suscités le développement de nouvelles approches plus sensibles et beaucoup plus résolutive. Parmi celles-ci la DIGE (Differential Gel Electrophoresis), est une des avancées de la protéomique quantitative très utilisé en protéomique du fait de sa fiabilité de quantification dans les tissus complexes.

Le principe de cette technique réside en la comparaison de deux profils électrophorétique 2D, par l'utilisation de marqueurs fluorescents spécifiques servant à marquer les protéines pour chacun des échantillons. Le marquage est de type covalent par une réaction spécifique, sur le groupement ϵ amines des chaînes latérales des lysines par des fluorophorecyanines (Cy3, Cy5 et Cy2) (Figure 11)

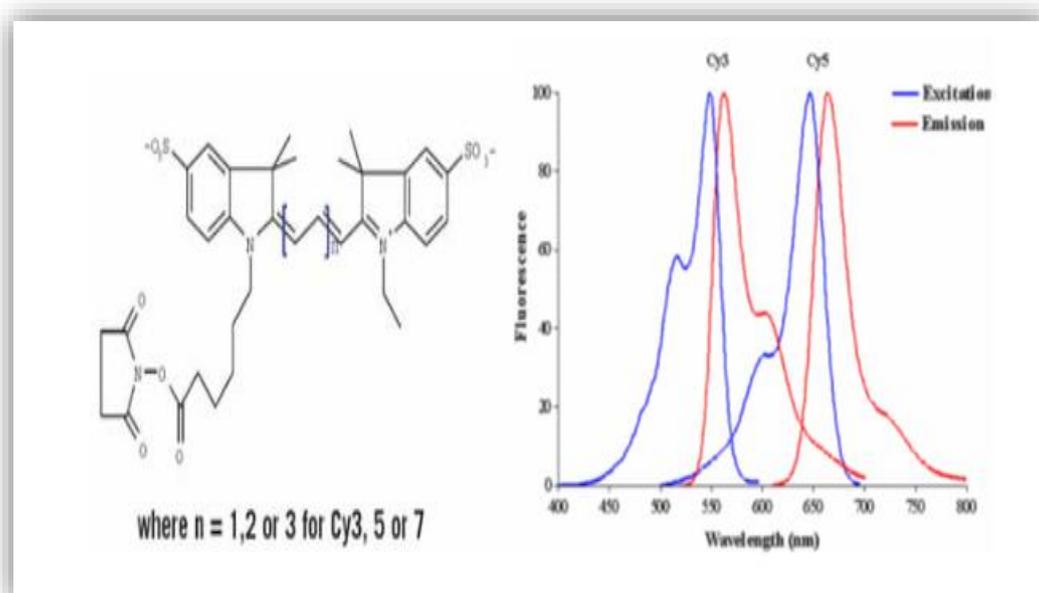


Figure 11 : Propriétés structurales et chimiques des Cyanines (Couderc ,2006).

La procédure expérimentale de la DIGE se divise en sept étapes. Les deux échantillons protéiques à analyser sont marqués par les cyanines, l'un Cy3 et l'autre Cy5 ainsi qu'un standard interne avec le Cy2.

Après le marquage, les trois échantillons sont déposés sur un même gel 2D ou les protéines seront séparées dans une dimension en fonction de leur point isoélectrique et ensuite dans une deuxième dimension en fonction de leur taille. Notons que les deux échantillons comigrent sur le même gel. L'analyse se fait dans un premier temps par excitation de fluorescence du gel aux longueurs d'ondes d'excitation des marqueurs Cy3, Cy5 et Cy2. La superposition des deux colorations révélera l'expression protéique globale de chaque échantillon. L'analyse quantitative se fait par imagerie, elle est effectuée généralement à l'aide de logiciel spécifique (Decyder™ software (Amersham), elle consistera dans un premier temps en la mesure de la différence de quantité de protéines de chaque spots présents sur le gel et enfin chaque spot sera excisé, digéré et analysé par LC-MALDI-TOF MS/MS pour identifier la protéine quantifiée correspondantes (Unlu *et al.*, 1997).

2.7.1.2 Technologies de marquage isotopique stable

2.7.1.2.1 Marquage isotopique : technologie « Isotope-Coded Affinity Tags » ou ICAT

Décrite en (1999) par Gygi *et coll.*, 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 de masse en tandem.

Le marquage chimique consiste en la formation d'une liaison covalente par alkylation entre la fonction thiol d'un résidu cystéine et un *tag* composé de spectrométrie trois groupes fonctionnels distincts :

- Un groupe réactif alkylant (iodoacétamide) pour la liaison covalente du *tag* au groupe Thiol (-SH) du résidu cystéine.
- Un groupe de liaison incorporant huit atomes d'un isotope lourd ou léger de L'hydrogène (couple 1H / 2H) ou du carbone (couple 12C / 13C).
- Un groupe d'affinité (biotine) pour l'isolation des peptides marqués par chromatographie d'affinité avec l'avidine (**Figure 12**).

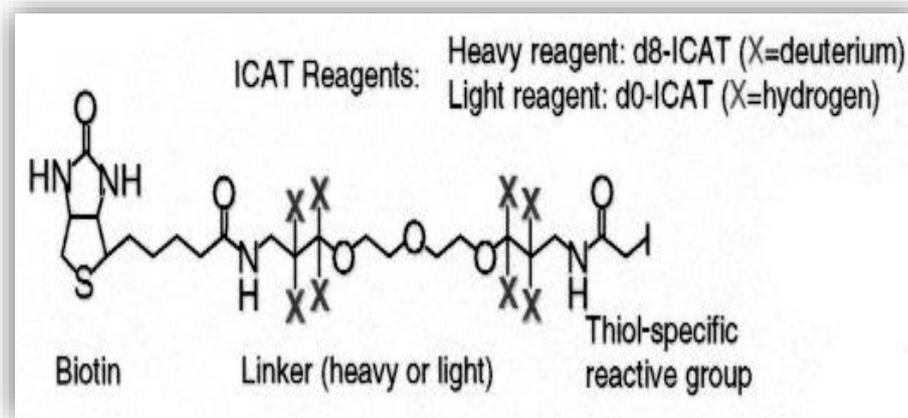


Figure 12: Structure du réactif ICAT (Gygi et al., 1999).

- L'étape de marquage est précoce au cours de la préparation des échantillons protéiques, succédant directement à l'exposition aux deux conditions expérimentales étudiées. Chacun des deux échantillons est alors incubé soit en présence des *tags* légers, soit en présence des *tags* lourds, avant d'être combinés en un mélange équimolaire et digérés en peptides tryptiques. Les peptides sont alors isolés par chromatographie d'affinité sur colonne d'avidine, puis séparés et analysés par LC-MS/MS.
- Au cours de l'expérience MS, des peptides de séquence identique marqués par deux tags de composition isotopique différente apparaissent comme deux signaux MS correspondant à deux ions précurseurs de masse différente, en raison d'un décalage de masse dû à l'enrichissement différentiel en isotopes légers ou lourds. La quantification relative est alors possible en comparant les intensités des signaux obtenus pour l'ion précurseur léger et l'ion précurseur lourd (**Figure 13**) (Gygi et al., 1999).

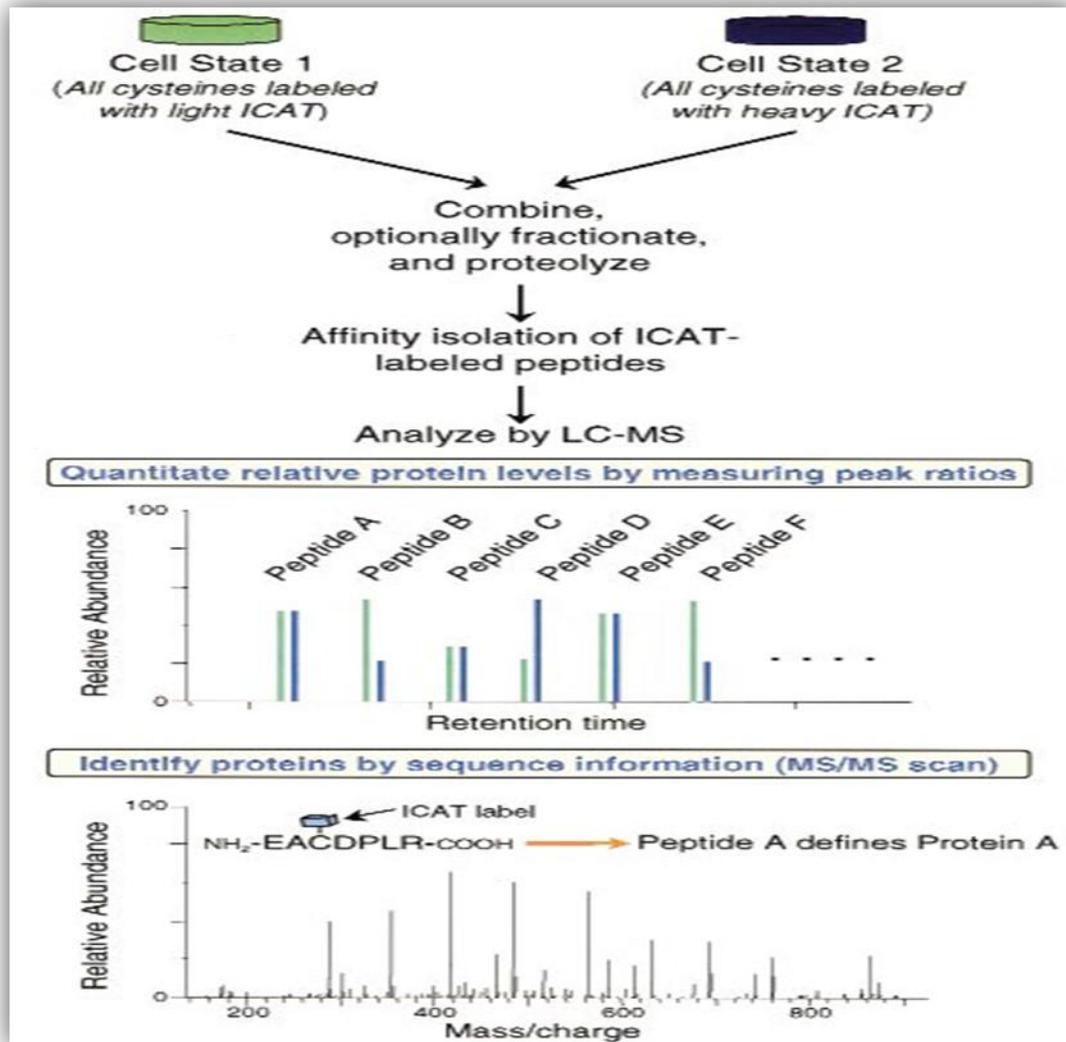


Figure 13 : Principe de l'ICAT (Gygi *et al.*, 1999).

Une seconde génération avec un marquage au carbone 13, appelée cICAT (cleavable ICAT), a donc été développée. Il comprend un bras espaceur clivable en milieu acide permettant de se débarrasser de la partie biotinylée et d'obtenir des fragmentations de meilleure qualité (Hansen *et al.*, 2003).

Plus récemment, un autre réactif réagissant également sur le thiol a été développé par l'équipe de Thomson en 2003, nommé l'IodoTMT (iodoacetamide-Tandem Mass Tags) permettant de comparer plus de deux protéome à la fois. (Murray *et al.*, 2012).

Le réactif est lui aussi composé de trois parties, avec une partie réactive envers les résidus Cystéines, un bras espaceur qui va servir de balance de masse et un groupement

rapporteur marqué ou non. Contrairement à l'ICAT et cICAT où la quantification relative se fait par intégration du signal MS des isotopes lourds versus légers Co-élués, les marqueurs de masse (Mass tags) apportés par les réactifs IodoTMT ont tous la même masse et ne sont donc pas Différentiables en MS. La différence de masse ne sera visible qu'après fragmentation MS/MS. La quantification relative s'effectue alors sur les ions rapporteurs spécifiques à chaque.

2.7.1.2.2 Marquage métabolique : technologie « Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture » ou SILAC

Décrite en 2002 par Ong et coll., la technologie SILAC fait évoluer le marquage isotopique vers un marquage métabolique, reposant sur l'incorporation différentielle d'analogues enrichis d'acides aminés essentiels au cours de la biosynthèse protéique de cellules en culture *in vitro*, de tissus ou d'organes *in vivo*, qui consiste à mettre en culture des cellules d'intérêts et des cellules contrôles, dans deux conditions différentes, dans un environnement aérobique et à température contrôlés (en général en 5% CO₂ et 37°C) : l'une avec un milieu de culture contenant des acides aminés normaux (isotopes légers), l'autre contenant des acides aminés marqués par des isotopes stables : le carbone 13 et l'azote 15 (isotopes lourds) (Ong *et al.*, 2002).

En protéomique classique, il s'agit souvent du couple d'acides aminés lysine et arginine, sites basiques de coupure tryptique. Pour incorporer ces acides aminés et disposer de cellules sous une condition unique (Ong et Mann, 2007). Un nombre minimum de passages est nécessaire (généralement 6 passages). Chaque type de cellule présente donc une composition déterminée en acides aminés (lourd ou léger). Les lysines et arginines marquées ¹³C / ¹⁵N (dans la majorité des cas) sont incorporées à la structure des protéines. La trypsine coupant les protéines après la lysine (K) et l'arginine (R), chaque peptide se retrouve marqué par un acide aminé «lourd». On mesure alors une différence de masse de +8 Da avec K et de +10 Da avec R entre les peptides lourds et les légers.

Dans les protocoles standards, les deux cultures 'légère' et 'lourde' sont mélangées avec un ratio de 1 pour 1 (Figure 14). Un même peptide issu de chaque échantillon aura la même structure (et donc les mêmes caractéristiques physico-chimiques en première approximation) et pourra être quantifié grâce à la différence d'abondance de 2 espèces comparables et différenciées par la différence de masse entre les isotopes lourds et légers qui seront Co-élués en chromatographie. Le mélange des deux échantillons étant réalisé très tôt

dans la procédure, toutes les erreurs dues à la manipulation, les conditions opératoires de la chromatographie ou la mesure de masse, se répercutent de la même manière sur les deux conditions. Le rapport d'intensité des signaux MS des deux espèces donne une information sur la variation d'expression des protéines d'une condition par rapport à une autre.

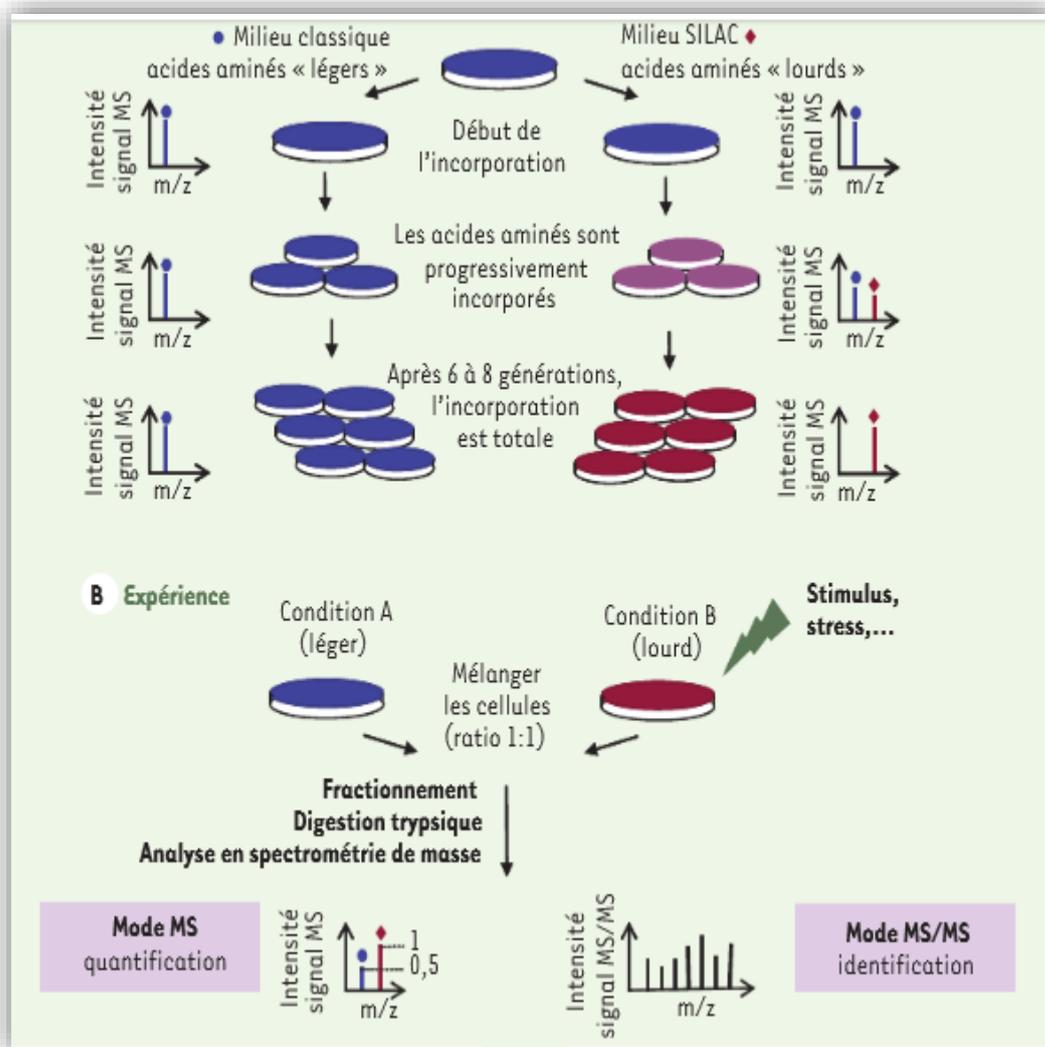


Figure14 : Principe de SILAC (Anouk et al., 2009)

2.7.1.2.3 Marquage isobare : « isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation » (iTRAQ)

La technologie iTRAQ a été décrite dès 2004 par Ross et coll, dans l'optique de multiplexer l'analyse de protéomique quantitative par spectrométrie de masse en tandem en permettant la comparaison de profils d'expression protéique provenant de 2 à 8 conditions

expérimentales distinctes. Le marquage iTRAQ consiste en la formation d'une liaison covalente et d'une fonction amide (similaire à une liaison de type peptidique) entre l'amine N-terminale d'un peptide

(Ou l'amine ϵ d'un résidu Lysine) et l'ester de N-hydroxysuccinimide d'un *tag* isobare composé de trois groupes fonctionnels :

- Un groupe réactif amine-spécifique, (amine specific peptide reactive group), ester de NHS responsable de la liaison au peptide.
- Un groupe d'équilibre (balance group) de 28, 29, 30 ou 31 Da, selon la substitution progressive d'isotopes légers de carbone (^{12}C) et d'oxygène (^{16}O) par leurs équivalents lourds (^{13}C et ^{18}O) au sein d'un groupe carbonyle. Ce groupe est chargé de Compenser la variation de masse.
- Un groupe rapporteur (reporter group), dont la masse est de 114,1, 115,1, 116,1 ou 117,1 Da selon la substitution progressive d'isotopes légers de carbone (^{12}C) et d'azote (^{14}N) par leurs équivalents lourds (^{13}C et ^{15}N) au sein d'une Nméthylpiperazine, pour une masse totale constante « groupe rapporteur – groupe d'équilibre » de 145,1 Da.
- Une déclinaison 8-plex complète la déclinaison 4-plex par l'ajout de 4 tags isobares intégrant des groupes rapporteurs de masse 113, 118, 119 et 121 Da.
- Au cours de la préparation d'échantillon, le *tag* est introduit après digestion trypsique des protéines. Les peptides tryptiques marqués sont mélangés en proportions équivalentes entre les différentes conditions expérimentales étudiées (1 :1 :1 :1) avant d'être analysés par LC-MS/MS.
- L'expérience MS caractérise l'ensemble du mélange peptidique, indépendamment de l'origine du peptide. Des peptides identiques marqués par quatre tags isobares différents apparaissent sous un seul signal MS, correspondant à un ion précurseur unique en raison d'un rapport masse/charge m/z identique et unique.
- En MS/MS, la CID fragmente les peptides au niveau des liaisons amide peptidiques, peptide-*tag* et groupe d'équilibre-groupe rapporteur. A chaque ion précurseur en MS, sont alors associés quatre ions groupe rapporteur de masses distinctes (114,1, 115,1, 116,1 et 117,1 Da), spécifiques d'une condition expérimentale initiale et un ensemble d'ions fragments permettant le séquençage du peptide (**Figure 15**).

La quantification relative est alors possible en comparant les signaux MS/MS, proportionnels au nombre d'ions rapporteurs détectés et à la concentration condition-

dépendante d'ions précurseurs (ou peptides tryptiques), pour chaque ion rapporteur et chaque condition expérimentale initiale.

Deux stratégies de quantification majeures existent.

- La première consiste en la comparaison des aires des pics MS/MS (intégration trapézoïdale) relatifs aux ions rapporteurs de masse.
- La seconde consiste en la comparaison des sommes des intensités des pics MS/MS des ions rapporteurs de masse (Ross *et al.*, 2004)

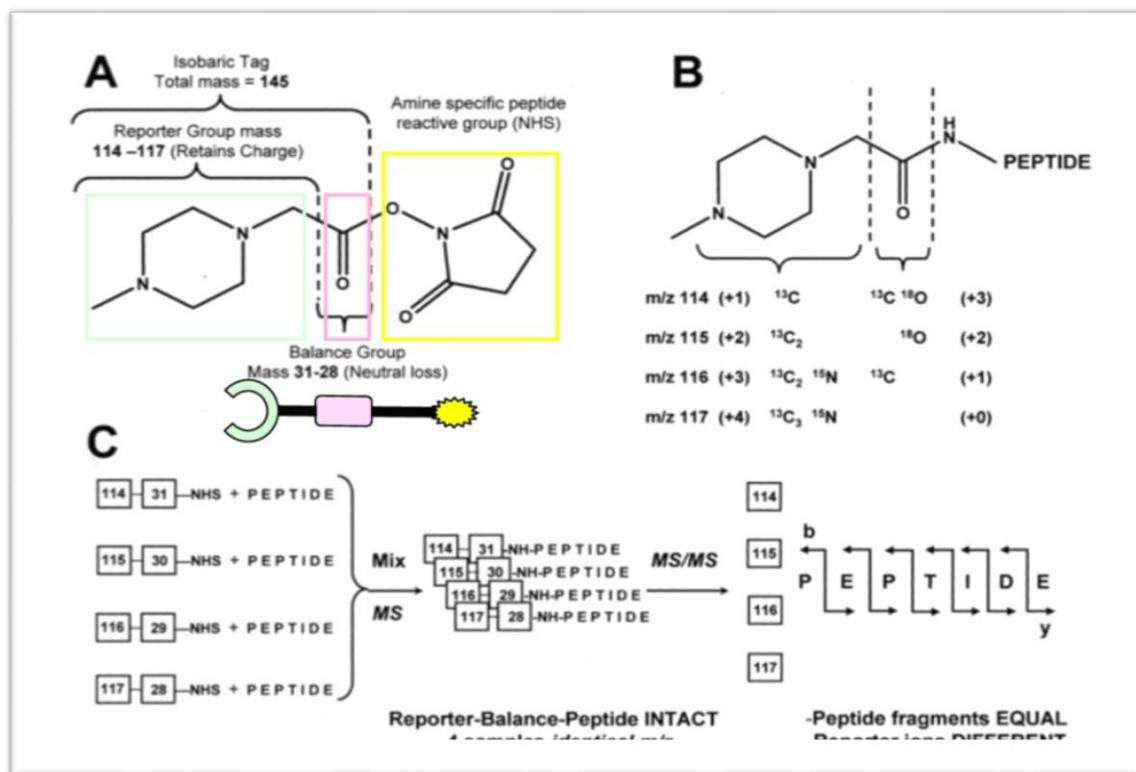


Figure 15: Principe d'iTRAQ (Ross *et al.*, 2004).

2.7.1.4 Quantification « label-free » (LFQ)

Bien que devenus des techniques de référence en protéomique quantitative, les approches basées sur un marquage isotopique stable complexifient la préparation d'échantillons, rallongent le temps d'analyse et augmentent les coûts expérimentaux. Ainsi, des approches label-free ont été développées pour permettre une analyse d'échantillons simple et rapide, label-free, a été exploitée ces dernières années. Du fait de l'absence de réactif de

marquage, cette quantification permet de comparer un nombre infini d'échantillons quelle que soit leur nature (tissu, cellule).

Cependant pour que cette quantification soit la plus représentative possible, il est impératif de contrôler chaque étape pour limiter les différents biais dus à la manipulation des échantillons. Il est alors important de limiter le nombre d'étapes de préparation des échantillons et si possible de les préparer en parallèle.

Contrairement aux approches de marquage isotopique stable, où les échantillons à comparer sont préparés, marqués, mélangés après marquage et analysés par LC-MS/MS en une seule fois, les approches label-free reposent sur la comparaison d'analyses LC-MS/MS d'échantillons préparés et analysés séparément.

Deux méthodes de quantification relative ont été développées :

- La comparaison des intensités des signaux MS des ions précurseurs après l'extraction des chromatogrammes d'ions et l'intégration des aires de pics MS sur le temps de rétention chromatographique, pour chaque peptide identifié.
- La comparaison du nombre de spectres MS/MS relatifs aux ions fragments, pour chaque peptide identifié (spectral counting) (Zhu et al., 2010).

❖ La mesure de l'intensité MS

La quantification par mesure de l'intensité MS est analogue à la quantification UV en HPLC basée sur la mesure de l'aire d'un pic. Lorsqu'un peptide est élué de la colonne, il va être ionisé et détecté par le spectromètre de masse. Le profil d'élution de ce peptide peut être illustré par le courant ionique mesuré en fonction du temps. L'aire sous la courbe correspond au chromatogramme de l'ion extrait (XIC pour eXtracted Ion Chromatogram) et est proportionnelle à la quantité de peptide. Plusieurs milliers de XICs correspondant à des peptides différents peuvent être générés pour chaque analyse. Ainsi, en comparant les XICs de deux échantillons on peut identifier les peptides et donc les protéines dont la quantité varie. En utilisant une courbe étalon, une quantité absolue peut être calculée.

La mesure de l'intensité MS nécessite une reproductibilité irréprochable en LC et une procédure de normalisation des variations entre les analyses par ajout d'un standard interne (Steen et al., 2005). Classiquement il faut au minimum 10 points pour dessiner correctement un pic chromatographique.

❖ Le « spectral counting »

La quantification par « spectral counting » est une méthode simple qui consiste à utiliser le nombre d'évènements de fragmentation d'un peptide pour estimer la quantité d'une protéine. Ainsi pour un peptide abondant dans la condition A, le nombre de spectre MS/MS sera plus élevé que dans la condition B où le même peptide sera en plus faible quantité. Le spectral-counting est typiquement utilisé pour la quantification relative et sur une petite gamme dynamique (**Schilling et al., 2012**). Il n'est pas adapté aux variations d'abondance faible. Le spectral-counting nécessite quelques paramétrages lors de l'acquisition, notamment de ne pas utiliser de liste d'inclusion (liste prédéfinie de m/z qui seront fragmentés) ou d'exclusion dynamique (critère selon lequel un peptide, qui a été fragmenté une fois par le spectromètre de masse, ne sera pas fragmenté de nouveau). Avec l'avènement de la HRMS, l'approche par mesure de l'intensité MS est devenue nettement plus précise et est donc souvent préférée à l'approche par « spectral counting ».

2.7.1.5 Apports et limites de la technologie iTRAQ par rapport aux technologies ICAT, SILAC et LFQ

- La possibilité de multiplexer l'analyse protéomique représente l'évolution majeure apportée par la technologie iTRAQ. Auparavant, les études menées à l'aide des technologies ICAT et SILAC devaient se limiter à la comparaison de deux conditions expérimentales distinctes puisque ces marquages protéiques reposent sur un principe binaire d'enrichissement en isotopes légers et lourds.
- Plusieurs études comparatives ont permis d'établir une hiérarchie des techniques de protéomique « shotgun » (**Bantscheff et al., 2007 ; Bantscheff et al., 2012**).
- Comparé à l'ICAT, l'iTRAQ offre une meilleure sensibilité, une meilleure couverture du protéome d'intérêt tout en n'étant pas limité par le marquage biaisé des seules protéines possédant un résidu Cystéine (avantage partagé par le SILAC et la LFQ) (**Wu et al., 2006**).
- À sensibilité équivalente, l'iTRAQ assure une meilleure couverture que le SILAC tout en bénéficiant d'une gamme plus large d'applications (le recours au SILAC est restreint à des cellules en culture) et d'un temps de préparation d'échantillons plus court. Toutefois, le SILAC a l'avantage d'un marquage extrêmement stable (incorporation du marquage au cours de la synthèse protéique) et virtuellement total (six à huit doublements cellulaires pour marquer l'ensemble des protéines) (**Pütz et al., 2012 ; Chen et al., 2015**).

- Bien que la LFQ bénéficie d'une couverture supérieure, d'une gamme dynamique plus large et de temps de préparation et d'analyse significativement plus courts (pas d'étape de marquage), l'iTRAQ, et de manière générale l'ensemble des techniques reposant sur un marquage isotopique stable, surpasse ses performances par une meilleure précision, une plus grande justesse de mesure et une plus grande reproductibilité (**Patel et al. , 2009**) , (**Wang et al. , 2012**) .
- La technologie iTRAQ possède une variabilité (dispersion des valeurs expérimentales par rapport à une valeur théorique) à trois composantes : une variabilité technique, une variabilité expérimentale et une variabilité biologique. (**Gan et al. , 2007**).
- La variabilité technique traduit la dispersion résultant de l'analyse d'un échantillon donnée dans des conditions données et peut être compensée par la répétition au sein de réplicats techniques. Dans le cas de l'iTRAQ, il s'agit majoritairement de la variabilité introduite lors de la préparation et du marquage des échantillons. La variabilité technique comprend l'erreur relative au marquage par deux tags différents et est évaluée à environ 11-12% de variation (**Redding et al. , 2006**).
- La variabilité expérimentale traduit la dispersion observée entre deux expériences identiques mais indépendantes et peut être résumée à l'écart observé entre deux marquages iTRAQ par deux jeux de *tags* différents pour un même échantillon. La variabilité telle s'élève à environ 23 % de variation et peut être appréhendée par des réplicats expérimentaux et la répétition de marquages.
- La variabilité biologique résulte des variations aléatoires propres à tout système biologique vivant. Il s'agit de la source de variabilité la plus importante, à hauteur de 25 % de variation. Cette variabilité multifactorielle conditionne la reproductibilité et la précision des quantifications protéiques et s'ajoute aux limites intrinsèques à la technologie iTRAQ telles que décrites par (**Ow et al. , 2009**) Le marquage iTRAQ permet de visualiser des variations d'expression protéique dans la limite de deux ordres de grandeur en raison d'un écrasement des ratios et d'une sous-estimation systématique résultant de :
 - ✚ La présence d'« impuretés » au sein des différents tags, des contaminations croisées, dues aux abondances relatives des isotopes constitutifs, amenant à des contributions croisées M-1/M+1 lors en MS/MS. Ce problème est résolu par l'application de facteurs de correction isotopique correspondant aux pourcentages de chaque tag contaminant pour un tag donné.

- ✚ la contribution du bruit de fond en MS/MS, lorsque l'intensité de l'ion rapporteur de masse est faible, contribution d'autant plus importante que l'échantillon est complexe ou que la masse du tag considéré est élevée.

Cette contamination peut être partiellement contournée en se focalisant sur les signaux MS/MS de plus haute intensité tout en gardant à l'esprit que plus l'ion rapporteur de masse a une masse élevée plus son signal a une intensité faible.

2.7.2 .Les méthodes pour une quantification absolue

La quantification absolue est capable de :

- Déterminer le nombre de copies des protéines dans une cellule, ce qui constitue une information précieuse pour la modélisation des processus biologiques (**Bennett et al., 2010**).
- Déterminer la stœchiométrie de complexes protéiques (**Schmidt et al., 2010**).

La méthode de quantification absolue est basée sur la découverte d'une relation inattendue entre la réponse du signal de SEP et la concentration en protéine: la réponse du signal de SEP moyenne pour les trois peptides tryptiques les plus intenses par mole de protéine est constante dans les limites d'un coefficient de variation inférieur à 10%. Étant donné un standard interne, cette relation est utilisée pour calculer un facteur de réponse de signal universel. Le facteur de réponse du signal universel (comptes / mol) s'est avéré identique pour toutes les protéines testées (**Anonyme A**).

La quantité absolue d'une protéine dans un échantillon peut être déterminée par la comparaison de l'intensité de son signal à celui d'un standard externe ou interne

a- Etalonnage externe

La quantification absolue par étalonnage externe consiste à réaliser une courbe d'étalonnage représentant le signal mesuré d'un standard en fonction de sa concentration.

L'échantillon inconnu est ensuite analysé et sa concentration est déterminée en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage.

b- Etalonnage interne

La détermination de la quantité absolue d'une protéine via l'étalonnage interne consiste à comparer son signal à celui d'un standard interne ajouté en quantité connue dans l'échantillon. Afin de corriger les sources de variation des différentes étapes du protocole, le standard interne doit à la fois avoir des propriétés physico-chimiques très proches de l'analyte à quantifier (même temps de rétention chromatographique, même efficacité d'ionisation, même profil de fragmentation MS/MS) et être distinguable en spectrométrie de masse, c'est-à-dire avoir une masse différente de l'analyte. (Zhang et al., 2001).

Le meilleur standard interne pour la quantification en spectrométrie de masse est l'analyte marqué avec des isotopes stables ^{13}C et/ou ^{15}N . Le marquage au deutérium a également été utilisé mais des décalages dans les temps de rétention LC ont été observés, ce qui n'est pas recherché (Zhang et al., 2001).

Trois méthodes de référence sont utilisées aujourd'hui suivant que le standard interne est introduit avant une étape de fractionnement, avant la protéolyse ou après la protéolyse : PSAQ, QconCAT et AQUA, respectivement (Figure 16).

2.7.2.1 AQUA

La stratégie de quantification absolue AQUA (Absolute Quantitation) utilise des peptides synthétisés chimiquement et marqués avec des isotopes stables, Ces peptides AQUA, également appelés peptides SIL (stable isotope labeled), sont ajoutés en quantité connue dans les échantillons après l'étape de protéolyse. Classiquement, le marquage du peptide est réalisé par l'incorporation d'un acide aminé marqué tel que la leucine, la lysine ou l'arginine.

Les peptides AQUA sont classiquement générés par synthèse chimique, purifiés par HPLC et Quantifiés par une analyse des acides aminés. Les peptides AQUA sont généralement fournis sous forme lyophilisée ce qui nécessite une étape de solubilisation avant utilisation.

Il faut noter que cette étape peut affecter les résultats expérimentaux car il n'est pas facile de déterminer si le peptide contenu dans le flacon a été entièrement solubilisé.

Bien que cette méthode AQUA soit très utilisée, notamment grâce à la disponibilité de nombreux peptides AQUA, le standard interne est ajouté assez tardivement dans le protocole de quantification (Gerber et al., 2003).

Ceci peut entraîner des biais de quantification si les variations liées au fractionnement de l'échantillon, souvent nécessaire lors de la manipulation d'échantillon biologique, et à l'étape de Fractionnement Protéolyse Standards internes protéolyse ne sont pas évaluées et prises en compte. Par ailleurs, le coût des peptides AQUA n'est pas négligeable (~160€ les 100 pmol), notamment lorsque l'on souhaite quantifier plusieurs protéines (**Gerber et al., 2003**).

La stratégie AQUA concerne des protéines et de leurs états de modification.

Ces peptides synthétiques peuvent également être préparés avec des modifications covalentes (par exemple, phosphorylation, méthylations, acétylation, etc.) qui sont chimiquement identiques aux modifications post-traductionnelles naturelles.

De tels peptides standards internes AQUA sont ensuite utilisés pour mesurer précisément et quantitativement les niveaux absolus de protéines et de protéines modifiées après traduction, après protéolyse, en utilisant une analyse de suivi de réaction sélectionnée dans un spectromètre de masse en tandem (**Anonyme A**).

2.7.2.2 Quantification concatamer (QconCAT)

Dans l'optique de quantifier plusieurs protéines en même temps (quantification multiplexée) et de minimiser les coûts, l'approche QconCAT Introduit un concept original de quantification absolue des protéines à grande échelle basé sur la synthèse et le marquage métabolique d'un concatémère artificiel de peptides protéotypiques (QconCAT pour "quantification concatamer"). Contrairement aux peptides AQUA, les structures QconCAT sont synthétisées biologiquement, ce qui élargit la gamme des peptides protéotypiques accessibles (peptides hydrophobes, peptides à résidus chimiquement réactifs, etc.).

L'ordre des peptides ainsi que l'utilisation de codons sont des paramètres chimiques à optimiser pour minimiser l'occurrence de la structure secondaire de l'ARNm afin de maximiser le rendement d'expression. (**Brun et al., 2009**).

Les Concatamères, qui peuvent être fabriqués maison ou obtenus dans le commerce, sont généralement ajoutés à l'échantillon juste avant la protéolyse.

Les peptides marqués par un isotope sont libérés par clivage d'endoprotéases et servent dans l'analyse par LC-MS comme standards pour la quantification de la protéine cible. Cette méthodologie mesure un moyen ingénieux et rentable d'augmenter l'échelle de

quantification des protéines, car 50 peptides tryptiques peuvent être inclus dans la construction de QconCAT, La possibilité d'inclure plusieurs peptides protéotypiques de la même protéine cible dans un QconCAT construct améliore la robustesse de la quantification (Brun *et al.*, 2009).

Le standard QconCAT ne permet pas de corriger de manière fiable un rendement de protéolyse inférieur à 100% car le rendement de protéolyse dépend de la structure tridimensionnelle d'une protéine et que le standard interne QconCAT et les protéines à quantifier n'ont pas la même conformation. L'utilisation d'une étape de dénaturation en amont de la protéolyse tend à réduire ses différences mais le problème des absences de coupure (MC : missed cleavage) liées à des sites de coupures trop proches subsiste (Beynon *et al.*, 2005).

Enfin, l'un des principaux avantages de la stratégie QconCAT est qu'une fois le QconCAT gène cloné, la protéine correspondante peut être produite, étiquetée et quantifiée à la demande. L'étalonnage de la norme QconCAT est une préoccupation majeure qui influe directement sur la précision de la quantification finale. Cet étalonnage nécessite une structure QconCAT construite hautement purifiée et a été initialement effectué par titrage au thiol de cystéine (Brun *et al.*, 2009).

2.7.2.3 Quantification absolue en protéines standard(PSAQ)

Afin de surmonter les limitations des approches AQUA et QconCAT, l'équipe de Jérôme Garin a développé la stratégie PSAQ (Protein Standard Absolute Quantification), Cette approche est basée sur l'utilisation d'une protéine entière marquée uniformément avec l'isotope ^{15}N ou avec des acides aminés isotopiques stables.

- Cette protéine marquée est identique à la protéine à quantifier en termes de séquence et de conformation (sous réserve de la présence/absence de PTM sur la protéine non marquée).
- Après purification, le taux d'incorporation est contrôlé, la concentration est déterminée précisément par analyse d'acides aminés et la protéine est ajoutée en quantité connue à l'échantillon avant un fractionnement éventuel. Le fait que ce standard interne soit introduit tôt dans le protocole de quantification permet de corriger les variations liées aux différentes étapes en amont de l'analyse MS : pertes, rendement d'enrichissement et rendement de protéolyse.

- Sous réserve de pouvoir produire une protéine soluble et suffisamment pure La stratégie PSAQ constitue actuellement le meilleur standard interne pour une quantification absolue d'une protéine (**Brun et al., 2007**).

Cette nouvelle stratégie de quantification, appelée PSAQ, Elle découle de deux avantages clés:

- Premièrement PSAQ compatible avec tout type de pré-fractionnement d'échantillon, à condition que les propriétés biochimiques "critiques" impliquées dans le processus de partitionnement soient partagées par le standard recombinant et la protéine cible naturelle.
- Deuxièmement a été démontré que le PSAQ est compatible avec la SDS-PAGE, la capture de protéines hydrophobes et l'immunocapture (**Brun et al., 2009**).

De plus, le PSAQ offre la plus grande couverture de séquences disponibles pour la quantification (tous les peptides protéotypiques détectables sont pris en compte) et conduit ainsi à une quantification robuste.

Curieusement, si des interférences, telles que la compétition d'ionisation, empêchent la détection d'un peptide protéotypique dans une matrice complexe, le PSAQ permet de passer à différents peptides rapporteurs. Sur la même ligne, un standard PSAQ donné peut être utilisé indifféremment avec la trypsine ou tout autre endoprotease conventionnel. (**Brun et al., 2009**).

Pour approfondir ce point, les normes PSAQ constituent également les normes de quantification pertinentes pour les tests de "quantification" de quantification.

Enfin, grâce à la couverture accrue de la séquence, les isoforme et les variables peuvent également être distingué, Encore une fois, pour une quantification précise, l'étalonnage des étalons PSAQ est un problème important qui est résolu en quantifiant la purification hautement purifiée. Normes protéiques (**Brun et al., 2009**).

Une des limites actuelles de la méthode PSAQ :

- Premièrement est le coût et la difficulté de produire des standards de protéines. Cependant, des milliers de protéines recombinantes ont déjà été synthétisées et purifiées dans le cadre de la génomique structurale. Dans une récente enquête sur les initiatives de biologie structurale, les taux de succès de production et de purification

déclarés pour les protéines bactériennes et eucaryotes étaient respectivement de 30% et 19%. Cependant, ce domaine évolue rapidement et la ressource dite "Human Protein Factory" pourrait produire des protéines recombinantes individuelles à l'échelle du protéome.

- Deuxièmement elle n'est pas très adaptée à la quantification multiplexée qui nécessiterait la production de plusieurs protéines marquées très coûteuses et à l'obtention de protéine modifiée (Brun *et al.*, 2009).

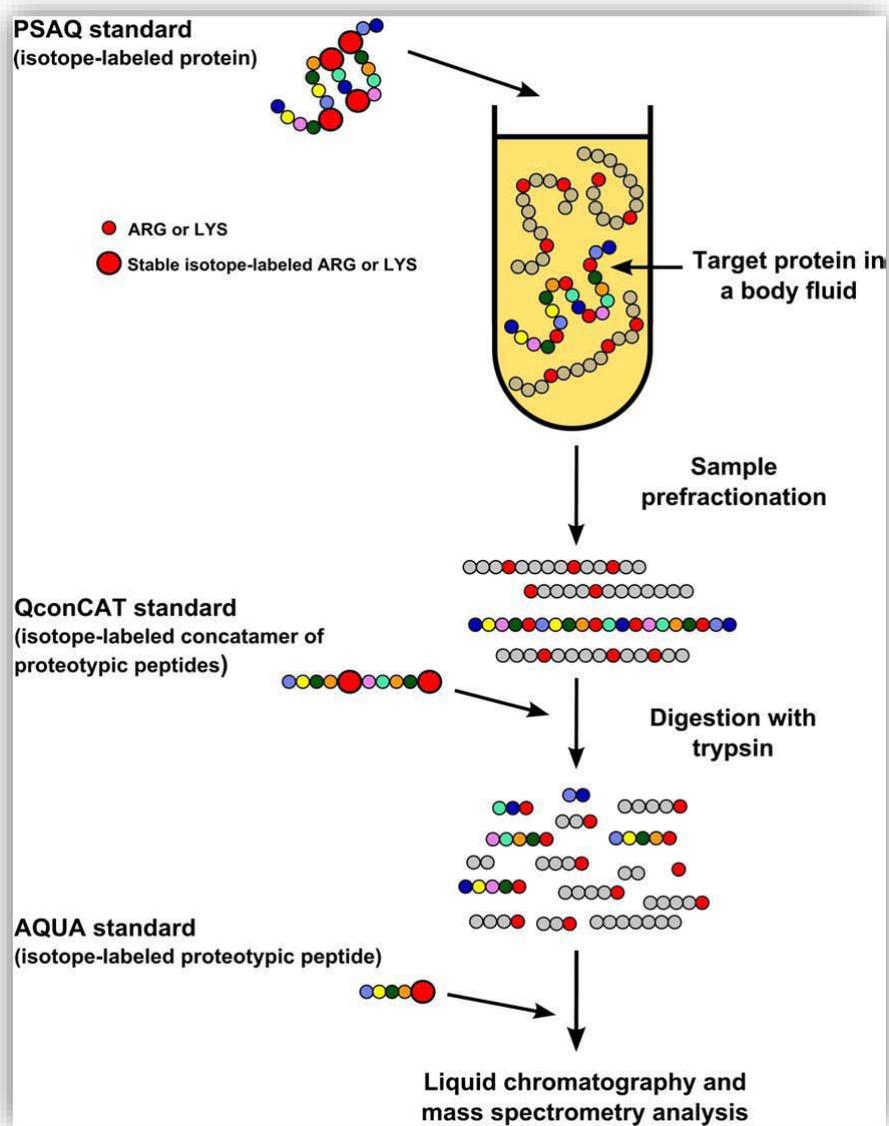


Figure 16: Stratégies de dilution isotopique pour la quantification absolue ciblée des protéines basée sur la SEP (Brun *et al.*, 2009).

Tableau Avantages et limitations des standards internes utilisés en quantification absolue (Boja et Rodriguez, 2012).

	Avantages	Limitations
AQUA	<ul style="list-style-type: none"> - De nombreux peptides commercialement disponibles. - Correction des variations LC-MS. - Capacité de multiplexage mais pour un nombre limité de protéines 	<ul style="list-style-type: none"> - Les peptides synthétiques sont coûteux - Selon la séquence, la synthèse peut prendre du temps voire ne pas aboutir - La solubilisation du peptide lyophilisé n'est pas toujours de 100% - Les peptides ne sont pas compatibles avec un fractionnement de l'échantillon au niveau protéique - Pas de correction des rendements de protéolyses, ce qui affecte la précision de la quantification
QconQAT	<ul style="list-style-type: none"> - Permet de quantifier plusieurs protéines simultanément (quantification multiplexée) à moindre coût et de manière plus simple que les peptides AQUA. - Correction des variations LC-MS voire même de la protéolyse si les rendements de protéolyses sont identiques entre les protéines à quantifier et le standard QconQAT 	<ul style="list-style-type: none"> - Plusieurs constructions QconQAT peuvent être nécessaires pour avoir une production d'un polypeptide artificiel soluble - Il est difficile de produire des polypeptides contenant plus que 30-40 peptides. - La génération d'un mélange équimolaire de peptides nécessite une protéolyse trypsique complète, ce qui nécessite une optimisation des conditions de protéolyse - L'introduction de modification (phosphorylation ou glycosylation) est possible mais nécessite une étape enzymatique additionnelle
PSAQ	<ul style="list-style-type: none"> - Correction des variations lors des étapes de fractionnement, protéolyse et LC-MS - Permet d'utiliser facilement et de manière fiable plusieurs peptides pour quantifier une protéine. - Standard de référence pour les approches topdown 	<ul style="list-style-type: none"> - Une protéine PSAQ est onéreuse - Peu compatible avec une quantification multiplexée - Pureté élevée parfois difficile à atteindre - L'introduction de modification est possible mais nécessite une étape enzymatique additionnelle

Chapitre 3 :
Application de spectrométrie de
masse chez les plantes

3.1 Effet des stress abiotique sur le protéome

3.1.1 Effet du stress hydrique sur le protéome

3.1.1.1 Analyse protéomique des feuilles de riz sous stress hydrique (Salekdeh et al ., 2002)

Une étude réalisée par Salekdeh et al .(2002), visait à évaluer une comparaison entre un cultivar de montagne CT9993-10-5-1-M et un cultivar de plaine IR62266-42-2-1 des plantes de riz (*Oryza sativa L. cv*) pour mettre en évidence les changements des protéines pendant la sécheresse et rétablissement de la sécheresse , les protéines ont été séparées en 2D-PAGE par et analysées par MALDI-MS qui a montré que :

- Une seule protéine (la chloroplaste Cu-Zn superoxyde dismutase) a changé de manière significative dans des directions opposées chez les deux cultivars en réponse à la sécheresse.
- La plus grande différence commune était que les protéines étaient régulées par la sécheresse dans CT9993 et n'étaient pas affectées dans IR62266; ou atténué par la sécheresse dans IR62266 et non affecté dans CT9993.
- Dix jours après le réarrosage, toutes les protéines étaient complètement ou largement revenues à l'abondance du témoin bien arrosé, et le processus d'identification a été réalisé par MALDI-MS.

Cependant comme la MALDI-MS n'est pas adaptée pour l'analyse des protéines supplémentaires ESI-Q-TOFMS / MS a été choisie et combinée avec des recherches dans différentes bases de données. La première approche consistait à chercher dans les bases de données SWISS-PROT et TrEMBL avec PepIdent logiciel avec Viridiplantae comme catégorie taxonomique et la deuxième approche consistait à la recherche dans NCBIInr et pdbEST avec Protein Prospector avec *Oryza sativa* comme catégorie taxonomique a permis d'identifier des protéines sensibles à la sécheresse, y compris un facteur de dépolymérisation de l'actine, qui était l'une des trois protéines détectables sous stress chez les deux cultivars mais indétectables dans les puits plantes ou chez les plantes 10 jours après le réarrosage.

3.1.1.2 Analyse protéomique des feuilles de betterave à sucre sous stress hydrique (Hajheidari et al., 2005).

Conformément aux cultures céréalières sensibles pendant le stade de reproduction, la betterave à sucre (*Beta vulgaris L.*) est relativement tolérante à la carence d'eau, mais la sécheresse provoque néanmoins de graves pertes de rendements en sucre dans de nombreuses régions insuffisamment approvisionnées en eau alors dans cette condition **Hajheidari et al. (2005)**, ont réalisés une comparaison entre deux génotypes de betterave à sucre (7112 et 7219-P.69) avec en ce qui concerne les Changements induits dans les protéines des feuilles par la sécheresse. Cette analyse est effectuée par électrophorèse sur gel bidimensionnelle en accouplée avec chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse en tandem (LC-MS / MS) ce qui a permis identifier RuBisCO et 11 autres protéines impliquées dans la régulation rédox, le stress oxydatif, la transduction du signal et les activités chaperon. Sur les huit protéines spécifiques à la sécheresse, trois étaient uniques à un seul génotype (7112). De même, 7112 a également montré des ensembles de protéines régulées positivement et négativement qui n'étaient pas exprimées de manière différentielle chez le génotype 7219.

La prédominance des protéines liées à la gestion des ROS souligne l'importance de la gestion des ROS et des dommages oxydatifs pour le maintien du fonctionnement des plantes en période de sécheresse.

D'autres protéines identifiées impliquées dans la stabilité et le repliement des protéines reflètent également l'importance de traiter les dommages oxydatifs dans des conditions de stress. Ces informations suggèrent que ces protéines, ou des protéines ayant une fonction similaire, pourraient constituer des cibles de sélection importantes pour l'amélioration de la tolérance au stress abiotique. Et aussi dans ce contexte deux petites protéines de choc thermique (HSP) induites dans les feuilles de betterave à sucre après un déficit en eau progressif.

3.1.1.3 Analyse des protéines sensibles au stress hydrique chez le blé (*Triticum durum*) (Caruso et al., 2009)

D'une autre part, La sécheresse a un impact important sur la production agricole de blé parce que, bien que le blé soit relativement tolérant aux stress abiotiques, il est fréquemment cultivé dans des environnements où le déficit en eau est une circonstance fréquente **Caruso et**

al .(2009), il est également intéressant d'analyser les modifications du protéome du blé (*Triticum durum*) dans des conditions de stress pour appliquer un traitement de déficit hydrique.

Les modifications du protéome induites par le stress ont été analysées par l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de Polyacrylamide (2D-PAGE) en association avec désorption laser / ionisation-spectrométrie de masse en temps de vol (MALDI-TOF MS) et / ou ESI-MS / MS, combinées avec des recherches dans différentes bases de données telles que MSDB et NCBInr, ce qui a permis d'identifier 21 protéines différentes, y compris certaines de leurs isoforme et sous-unités, pour lesquelles le changement du niveau d'expression avait été associé à une perte d'eau. Ces protéines sont liées à la biosynthèse des glucides et des acides aminés, aux activités des kinases, à la photosynthèse, au métabolisme énergétique, au piégeage des espèces réactives de l'oxygène, au traitement des acides nucléiques et des protéines, car tous ces mécanismes biologiques sont strictement influencés par la perte d'eau.

La plupart des protéines identifiées sont impliquées dans le métabolisme énergétique, en particulier dans les voies de la glycolyse et de la gluconéogenèse (18%), ce qui montre que chez les plantes, le métabolisme primaire peut être modulé pour l'établissement d'une nouvelle homéostasie sous stress hydrique.

De plus, les plantes peuvent réagir au stress lié à la perte d'eau en modifiant la régulation post-transcriptionnelle. La régulation post-transcriptionnelle est un mécanisme cible potentiel qui pourrait être étudié en profondeur afin d'élucider la réponse de la sécheresse chez les plantes ; Il est également rapporté à partir de l'étude sur le blé que :

- Plusieurs sous-unités et isoforme de la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase / oxygénase (RuBisCO), une enzyme clé du cycle de Calvin, se sont avérées altérées en réponse à la sécheresse.
- L'implication plus importante de RuBisCO dans les processus de réponse permettant de lutter contre la réduction de la photosynthèse.
- Le niveau d'expression de certaines protéines liées aux processus de la biosynthèse des acides aminés a été altéré dans les échantillons stressés.

En guise de conclusion, les auteurs souhaitent attirer l'attention des scientifiques que la connaissance des protéines liées au stress du blé pourrait aider à comprendre le fondement moléculaire de la réponse à la sécheresse et pourrait constituer la clé de la sélection des gènes marqueurs afin de développer des variétés de blé présentant une tolérance accrue au stress

hydrique, donc ces protéines pourraient être choisies comme biomarqueurs potentiels pour comprendre les effets physiologiques au niveau moléculaire et pour améliorer les lignées de blé résistantes à la sécheresse.

3.1.1.4 Analyse du protéome du grain sensible à la sécheresse du blé (Jiang et al., 2012).

Une étude réalisée par **Jiang et al. (2012)**, visait à explorer une analyse protéomique comparative des protéines sensibles à la sécheresse au cours du développement des graines de deux variétés de blé Kausz (forte résistance au stress hydrique) et Janz (sensible au stress hydrique) à l'aide des technologies de 2-DE, parmi lesquels les spots protéiques ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et MALDI-TOF / TOF combinées la base de données de plantes vertes non redondantes du NCBI ont démontré que :

Les protéines identifiées étaient principalement impliquées dans le métabolisme des glucides (26%), la détoxification et la défense (23%) et les protéines de stockage (17%).

En particulier l'isoenzyme 1 de la catalase, la protéine de répétition WD40, la LEA, les inhibiteurs de l'alpha-amylase, Présentaient un modèle d'expression hautement régulé chez Kausz, alors qu'ils étaient régulés négativement ou non chez Janz.

L'ADP glucose pyrophosphorylase de petite et grande taille, l'ascorbate peroxydase, la protéine de type bêta, le sucrose synthase étaient toutes régulées négativement sous le stress de la sécheresse à Janz, mais ne présentaient aucun changement d'expression à Kausz ce qui est corrélé au fait que Janz est une variété sensible à la sécheresse et le saccharose synthase.

Le précurseur triticine a montré un modèle d'expression hautement régulé sous déficit hydrique chez les deux variétés, mais leur niveau de régulation était beaucoup plus élevé chez Kausz que chez Janz.

Sous l'effet de la sécheresse, ces protéines, notamment APX, les inhibiteurs de l'alpha-amylase, la serpine, l'AGPase des petites et grandes sous-unités, la protéine de type G bêta et l'OEE1, qui sont liées à divers processus métaboliques, ont présenté une baisse significative chez la variété sensible à la sécheresse Janz et une régulation positive expressions de la variété Kausz résistante à la sécheresse.

3.1.2 Effet du stress thermique sur le protéome

3.1.2.1 Analyse protéomique du stress thermique lié à la réponse de la luzerne (Li et al., 2013)

Les réponses du protéome au stress thermique n'ont pas été bien comprises ; dans ce contexte Li et al. (2013), visait à déterminer les effets du choc thermique au niveau d'expression des protéines chez la luzerne (*Medicago sativa L. cv. Huaiyin*), les protéines ont été extraites et séparées par électrophorèse sur gel de Polyacrylamide à deux dimensions (2-DE) et des taches de protéines exprimées de manière différentielle ont été identifiées par spectrométrie de masse (MS) de type MALDI-TOF / TOF et combinées avec des recherches dans différentes bases de données tel que la masse peptidique à été recherché dans les bases de données de protéines NCBI ; en outre, les voies et les réactions biologiques éventuellement impliquées étaient recherchées chez Uniprot et Genome- Net Indiquait que les protéines impliquées dans un large éventail de processus biologiques y compris le métabolisme, énergie, synthèse des protéines, destination / stockage des protéines, transporteurs, trafic intracellulaire, structure cellulaire, transduction du signal et maladie / défense ; la majorité ayant un rôle putatif dans la production d'énergie, le catabolisme, le stress et les réactions de défense

Ces protéines de réponse à la défense ont été impliquées dans de nombreux processus tels que la régulation de l'homéostasie redox, la réponse au stress thermique et la détoxification des peroxydes.

La catégorie protéine maladie / défense contenait un vaste ensemble de protéines chaperonnes et de protéines impliquées dans la régulation de la liaison disulfure. Ces protéines peuvent également contribuer à une meilleure thermotolérance chez la luzerne.

3.1.2.2 Profilage du protéome de *Populus euphratica Oliv* sous stress thermique (Ferreira et al., 2006).

Populus euphratica peut être considéré comme une espèce végétale importante pour étudier les événements responsables de la survie des plantes ligneuses sous stress thermique alors dans cette condition Ferreira et al. (2006), ont indiquent que :

- Les protéines hautement régulées sont liées à la déstabilisation des membranes et à la restructuration du cytosquelette, à l'assimilation du soufre, à la synthèse de la thiamine et des acides aminés hydrophobes et à la stabilité des protéines.
- Les protéines régulées positivement sont impliquées dans l'homéostasie redox et la photosynthèse.
- Les protéines médiocrement régulées sont principalement impliquées dans le métabolisme du carbone.

À cette fin, tout d'abord les effets de la chaleur ont été évalués par une fuite d'électrolyte sur les disques foliaires dans un phytotron puis ont été déterminés par 2D-PAGE couplée spectrométrie de masse MALDI-TOF / TOF combinées avec la recherche dans la base de données dans tous les Viridiplantae les entrées de NCBI.

En guise de conclusion, la photostase est obtenue par un ajustement du métabolisme du carbone, une diminution de l'abondance du photosystème II (PSII) et une augmentation de la contribution du PSI au flux d'électrons linéaire photosynthétique. La thiorédoxine h peut jouer un rôle particulier dans ce processus chez *P euphratica* lors d'une exposition modérée à la chaleur.

3.1.2.3 Analyse protéomique de l'effet du stress thermique sur grain de blé hexaploïde: caractérisation de protéines thermosensibles de l'endosperme total (Majoul et al., 2003).

Les températures élevées pendant le remplissage des grains ont été signalées comme l'un des facteurs qui peut affecter les propriétés de la pâte et les caractéristiques de qualité du blé. Dans ce cadre **Majoul et al. (2003)**, ont constaté que la synthèse des HSP se produit dans tous les tissus de blé, y compris le grain en développement et le grain mature.

La synthèse des HSP dans le grain de blé mûr a été liée à l'affaiblissement de la pâte pendant le stress thermique, Le poids du grain serait réduit par une diminution de la synthèse de l'amidon: l'une des premières enzymes de la synthèse de l'amidon, la glucose-1-phosphate adényltransférase était significativement réduite.

En ce qui concerne les propriétés de la pâte, il est bien connu que les gliadines et les gluténines sont associées à l'extensibilité et à l'élasticité de la pâte, respectivement. Plusieurs gliadines ont augmenté alors que les gluténines n'ont pas augmenté après un stress thermique.

De plus, il convient de souligner que dans cette variété de blé, pas de différence significative concernant les tache de gluten entre les plantes stressées et non ; pour cela, les protéines ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) et analysées par désorption / ionisation laser assistée par matrice spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS et spectrométrie de masse en tandem MS/MS couplées à une recherche dans une base de données dans SWISS-PROT, TrEMBL et NCBI.

3.1.2.4 Une approche protéomique pour l'analyse des protéines sensible sous stress thermique dans les feuilles de riz (Lee et al., 2007)

Une Etude réalisée par Lee et al.(2007), visait à explorer le protéome de feuille de riz en réponse au stress thermique, Les effets de la chaleur dans les feuilles de riz ont été déterminés par 2D-PAGE couplée avec l'analyse MALDI-TOF MS combinées avec des recherches dans différentes bases de données à l'aide de Protein Prospector ces recherche ont permis de déterminer que les protéines identifiées ont été principalement regroupées dans les catégories suivantes: (i) protéines de choc thermique (HSP), (ii) énergie et métabolisme - protéines apparentées, (iii) homéostasie rédox, et (iv) protéines régulatrices .

Parmi celles-ci, plus de 37% des protéines identifiées en tant que HSP étaient impliquées dans la stabilité et le repliement des protéines, ce qui suggère que les températures élevées ont des effets graves sur la dénaturation et la régulation des protéines.

3 .1.3 Effet du froid sur le protéome

3 .1.3.1 les analyses protéomiques révèlent des différences d'acclimatation au froid chez les cultivars de luzerne tolérants et sensible au gel (Chen et al., 2015).

L'acclimatation au froid chez la luzerne (*Medicago sativa* L.) joue un rôle crucial dans la tolérance au froid des hivers rigoureux Chen et al.(2015), ont examiné les mécanismes d'acclimatation au froid de la luzerne résistante au gel et de la luzerne sensible au gel (W5), les holoprotéines et protéines peu abondantes des feuilles ont été analysées à l'aide de l'électrophorèse sur gel bidimensionnelle (2-DE) couplée avec MALDI_TOF / TOF et combinée avec des recherches dans différentes bases de données tel que NCBI Medicago , Uniprot a révélé que les protéines impliquées dans la photosynthèse, le métabolisme des

protéines, le métabolisme énergétique, le stress et l'oxydoréduction, ainsi que d'autres protéines, étaient mobilisées pour l'adaptation au stress accablant.

En ZD a démontré qu'un grand nombre de protéines se mobilisent pour s'adapter aux basses températures, le métabolisme autologue et la biosynthèse sont ralentis pour réduire consommation pour l'homéostasie.

W5 améliore sa capacité de repliement des protéines et la biosynthèse des protéines pour surmonter le stress de refroidissement.

La perception de basse température est plus sensible dans luzerne tolérante à la congélation que dans la luzerne sensible à la congélation.

3.1.3.2 Analyse protéomique de la réponse au stress du froid dans les feuilles de bouleau *Betula platyphylla* Suk (WU et al., 2014)

Bouleau (*Betula platyphylla* Suk) est une espèce de *Betula* (*Betulaceae*) avec une forte résistance au froid, Dans ce contexte **WU et al. (2014)**, ont analysé la différence d'expression des protéines dans les feuilles de bouleau qui sont soumises à un traitement de stress dû au froid à 4 ° C pendant 0, 4 et 14 jours et à l'aide de la méthode 2-DE couplé à ESI-MS-MS en conjonction avec LC MS / MS. La fonction de la protéine a été récupérée et analysée par la base de données UniProtKB / TrEMBL qui a permis de démontrer que les protéines peuvent être divisées en 2 grandes catégories:

La première catégorie comprend les protéines régulatrices, Comme les protéines impliquées dans la transduction du signal.

La deuxième catégorie est constituée de protéines fonctionnelles pouvant jouer un rôle dans la réponse à la résistance.

Quatre nouvelles protéines de réponse au froid ont été détectées pour la première fois dans cette étude y compris PrxD (type II) , protéine Sc-3, la β -conglycinine et la formation de protéines thylakoïdes 1 ; Ces protéines ont été impliquées dans plusieurs processus physiologiques *in vivo* et leur action combinée aide à établir un nouveau bilan protéique afin de permettre à *Betula platyphylla* de s'adapter au stress du froid.

3.1.3.3 analyse d'une approche d'identification des protéines peu abondantes induites par le froid dans les feuilles de riz (Lee et al., 2007)

La basse température est l'un des facteurs environnementaux limitant les plus importants pour les plantes, ce qui peut entraîner une réduction importante de la croissance et du rendement de nombreuses cultures importantes sur le plan agricole, notamment le riz. Lee et al. (2007), ont également étudié les protéines peu abondantes dans les feuilles de riz en réponse au stress dû au froid. À l'aide de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF et / ou par balise de séquence utilisant un ESI-MS / MS couplée à l'électrophorèse 2D et combinées avec des recherches dans la bases de donnée NCBIInr ont identifié certaines nouvelles protéines telles que ; la cystéine protéinase, la thiorédoxine peroxydase ; protéine ressemblant à une protéine à doigts de zinc RING, une protéine semblable à la fibrilline.

Il est intéressant de noter que sa réponse au froid n'a été trouvée qu'à 5-C mais pas à 10 ° C. Ces résultats nous amènent à penser que l'induction d'une protéine semblable à la fibrilline dans une feuille de riz sous stress froid est due à des augmentations de synthèse d'ABA endogène.

3.1.3.4 Analyse protéomique de protéines sensibles au stress froid dans les feuilles de rosette *Thellungiella* (Gao et al., 2009).

Thellungiella halophila est un précieux modèle pour étudier les mécanismes en jeu dans les plantes tolérance au stress froid. Dans ce contexte Gao et al. (2009), ont examiné une approche protéomique comparative basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) couplée à la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF et / ou par balise de séquence utilisant un ESI-MS / MS en conjonction avec LC MS / MS et combinée aussi avec des recherches dans différentes bases de données tel que NCBIInr , Swiss-Prot.

Ils constaté que les protéine identifiées participent principalement à la photosynthèse, au métabolisme de l'ARN, à la défense, à la voie de l'énergie, à la synthèse, au repliement et à la dégradation des protéines, à la paroi cellulaire et au cytosquelette et à la transduction du signal. Ces protéines pourraient travailler en coopération pour établir une nouvelle homéostasie sous froid, les protéines ont été associées à divers aspects de la physiologie des chloroplastes Suggérant que la tolérance au stress froid de *T. halophila* est obtenue au moins en partie par la régulation de la fonction des chloroplastes .

Tous les spots protéiques impliqués dans le métabolisme de l'ARN, la réponse à la défense, la synthèse, le repliement et la dégradation de la protéine se sont nettement régulés positivement par un traitement au froid, indiquant qu'une augmentation du métabolisme de l'ARN, de la défense et du métabolisme de la protéine pourrait jouer un rôle crucial dans le mécanisme de tolérance au froid chez *T. halophila*.

3.1.4 Effet du stress salin sur le protéome

3.1.4.1 Etude de l'effet à court terme de l'exposition au sel sur le profil protéique du chloroplaste de maïs (Zörb et al. 2009)

Dans le but de comprendre les différences physiologiques conduisant au sel Zörb et al. (2009), ont pu mettre au point une comparaison quantitative des protéines du protéome des chloroplastes de maïs dans la phase initiale de stress dû au sel basée sur l'approche 2-DE couplée à la spectrométrie de masse de MALDI-TOF MS et combinée avec des recherches dans différentes bases de données tel que NCBI, la base de données de protéome de plantes. Indique qu'un :

- Ensemble de protéines chloroplastes spécifiques dans le maïs ont été modifiées instantanément en réponse au stress salin telles que CF1_ε et un récepteur sensible à Ca²⁺ montrent une réponse plutôt transitoire pendant les 4 premières heures d'exposition au sel
- L'abondance accrue de la ferrédoxine NADPH réductase, du polypeptide de 23 kDa du photosystème II et de la protéine de type FtsH pourrait refléter un mécanisme permettant d'atténuer les effets néfastes du Na⁺ sur la machinerie photosynthétique.
- Augmentation transitoire observée et la diminution subséquente de protéines sélectionnées peuvent présenter un effet d'équilibrage des protéines cibles dans ce contexte. Curieusement, plusieurs sous-unités du complexe CF1-CF0 sont affectées de manière inégale, alors que d'autres ne répondent pas du tout.

En guise de conclusion le sodium, les ions s'accumulent rapidement et excessivement dans les chloroplastes de maïs sur le stress salin modéré à court terme.

3.1.4.2 Analyse protéomique de feuilles de tabac sous stress salin (Razavizadeh et al., 2009)

Le tabac est un modèle utile et un important système en biologie végétale, dans ce contexte **Razavizadeh et al. (2009)**, ont examiné les protéines impliquées dans la photosynthèse, la défense, le métabolisme (en particulier le métabolisme des acides gras), le repliement des protéines et le transport des protéines.

Des expériences dépendant de la dose et du temps ont montré que la protéine de choc thermique stromale de 70 kDa.

Une protéine importante dans la biogenèse du thylakoïde était fortement atténuée par le stress salin. Parce que l'assemblage de chloroplastes dans des cellules végétales nécessite transport de la protéine du cytosol au stroma, le stress dû au sel peut avoir un effet sur le transport des protéines et la biogenèse des thylakoïdes médiée par la protéine de choc thermique de 70 kDa.

Ces résultats suggèrent que l'exposition à des concentrations élevées de sel provoque une diminution de la régulation des protéines liées à la défense dans les feuilles de tabac, ce qui pourrait expliquer l'échec de la protection des cellules contre le stress salin.

A cette fin, les protéines des feuilles des plantes de tabac ont été analysés par 2-DE et les principales protéines différentiellement exprimées ont été identifiées par moyen de séquençage Edman avec laser assisté par matrice spectrométrie de masse en temps de désorption / ionisation (MALDI-TOF MS) combiné avec des recherches dans la base de données du génome du soja (version 4, 62199 séquences, Institut conjoint du génome du ministère de l'Énergie et le Consortium de séquençage du génome du soja).

3.1.4.3 Protéomique Comparative de la tolérance au sel chez *Arabidopsis Thaliana* et *Thellungiella halophila* (Pang et al., 2010).

Arabidopsis thaliana est un excellent modèle doté de riches ressources génétiques pour la recherche moderne sur la biologie végétale. De nombreux rapports sur la tolérance au sel chez *Arabidopsis*. Toutefois, les résultats de ces travaux sont est plutôt limité en raison du fait qu'*Arabidopsis* est un véritable glycophyte. Récemment, une espèce végétale halophyte, *Thellungiella halophila*, a été proposée comme modèle idéal pour étudier les mécanismes moléculaires de la tolérance au sel chez les plantes en raison de ses caractéristiques "extrémophile" se traduisant par une tolérance extrême à une salinité élevée.

Dans ce contexte **Pang et al. (2010)**, ont mis en point une protéomique foliaire comparative d'*Arabidopsis*, un glycophyte, et de son proche parent, *Thellungiella*, un halophyte, dans différentes conditions de stress salin, les protéines des échantillons de feuilles d'*Arabidopsis* et de *Thellungiella* traitées avec le NaCl et non traitées ont été extraites et séparées par électrophorèse sur gel bidimensionnelle et ont été identifiées par chromatographie en phase liquide à nano flux (LC) couplée à Q-Trap MS / MS et à la recherche dans la base de données Mascot montre que plus de deux fois de protéines chez *Arabidopsis* ont changé d'abondance que celles de *Thellungiella* sous stress salin. Ceci est une observation intéressante Qu'*Arabidopsis* comme un glycophyte plus sensible à l'exposition à NaCl, *Thellungiella* peut tolérer des niveaux de sel beaucoup plus élevés qu'*Arabidopsis*.

Il est également rapportée a partir de cette étude que certaines protéines ont montrée des réponses différentielles au stress salin chez *Arabidopsis* et *Thellungiella* par exemple, l'expression de PR5 a augmenté chez *Arabidopsis*, mais a nettement diminué chez *Thellungiella*. Comme les protéines sensibles au stress salin variaient selon les deux espèces, nous avons pensé que les glycophytes et les halophytes adoptaient des stratégies différentes pour faire face au stress NaCl.

Chez *Arabidopsis*, la majorité d'entre elles étaient impliquées dans le métabolisme, la photosynthèse, les protéines énergétiques et la destination des protéines , À *Thellungiella*, davantage de protéines impliquées dans la synthèse protéique, la photosynthèse, le métabolisme et l'énergie ont présenté des changements d'expression significatifs.

Cette méthode est couplée à une approche complémentaire, l'étiquette isobare pour la quantification relative et absolue (iTRAQ) a été utilisée par LC-MS pour identifier les protéines microsomales. Cette méthode a démontré que : les protéines impliquées dans le jasmonique l'AOC2 était régulé positivement par le NaCl dans les racines d'*Arabidopsis*.

En effet, nos résultats fournissent des preuves supplémentaires que ces AOC facilitent la survie des plantes dans des conditions saines. Cependant, les protéases dépendantes de l'ATP du CLpC impliquées dans la dégradation des protéines ont été régulées à la baisse après stress salin, Au contraire, chez *Thellungiella*, les protéases impliquées dans la dégradation des protéines diminuent l'accumulation en réponse au stress salin, Cela indique que les mécanismes d'élimination les polypeptides mal repliés sous stress salin sont différents entre glycophytes et halophytes.

Il est également rapporté à partir de cette étude qu'à *Thellungiella*, aucune protéine avec des fonctions de transport n'a été identifiée pour montrer des changements significatifs sous stress salin. Ce n'était pas complètement inattendu compte tenu du fait que *Thellungiella* est un halophyte à haute capacité de régulation des ions transport.

3.1.4.4 Identification des modifications du protéome de *Triticum durum* L. feuille en réponse au stress salin (Caruso et al., 2008).

Dans Le but d'identifier les changements dans le profil protéique, dû à l'exposition au stress salin, chez les plantes de blé (*Triticum durum* 'Ofanto') Caruso et al. (2008), ont examiné une approche protéomique utilisant une électrophorèse bidimensionnelle et une spectrométrie de masse combinée avec bases de données NCBIInr,

Démontre que toutes ces protéines sont impliquées dans la régulation du métabolisme des glucides, des acides aminés, de l'azote et de l'énergie, le piégeage des ROS et le traitement des acides nucléiques et des protéines.

Sous le stress de NaCl, les plantes diminuent le métabolisme de l'énergie pour conserver l'énergie et limiter la génération de ROS .

Il a également été rapporté à partir de cette étude chez le blé de l'abondance de fructose 1,6-bisphosphate aldolase est une enzyme métabolique clé a été réduite dans les plantes traitées au sel par rapport aux témoins.

3.2 Effet des stress biotique sur le protéome

3.2.1 Symbiose

3.2.1.1 Analyse protéomique et identification des protéines liées à la symbiose de *Medicago Truncatula Gaert* (Bestel-Corre et al., 2002).

Les racines des plantes interagissent avec un grand nombre de micro-organismes du sol, dont certains sont pathogènes et conduisent souvent à des maladies des plantes, tandis que d'autres sont symbiotiques, comme les champignons mycorhiziennes arbusculaires et les bactéries rhizobiennes. Conformément à l'étude réalisée par Bestel-Corre et al. (2002), l'analyse temporelle des profils protéiques des racines a été étudiée par électrophorèse sur gel bidimensionnelle chez la plante modèle *Medicago truncatula*, inoculée avec le champignon mycorhiziennes arbusculaires *Glomus mosseae* ou avec la bactérie fixatrice d'azote

Sinorhizobium meliloti, plusieurs symbiotes les protéines apparentées ont été identifiées par prise d'empreinte peptidique après spectrométrie de masse de type MALDI-TOF ont indiqué qu'un polypeptide induit dans les racines nodulées sous la forme d'une leghémoglobine de *M. truncatula*.

Cette méthode qui a combiné le séquençage interne avec un spectromètre de masse quadripolaire à temps de vol et des recherches dans la base de données SWISS-PROT et TrEMBL ont permis de démontrer que dans les racines nodulées, un polypeptide a été identifié comme facteur d'allongements Tu de *S. meliloti*, alors qu'une autre ne pouvait pas se voir attribuer une fonction.

Dans les racines mycorrhiziennes, les protéines analysées comprenaient également une protéine de fonction inconnue, ainsi qu'une glutathion-S-transférase, une fucosidase, une protéine ressemblant à la myosine, une sérine hydroxy méthyl transférase et un cytochrome c-oxydase.

En conclusion, nous souhaitons attirer l'attention sur le fait que les protéines liées à la nodulation étaient d'origine végétale ou bactérienne, les protéines associées aux mycorhizes étaient exclusivement d'origine végétale.

3.3 Effet de la fonction cellulaire sur le protéome

3.3.1 Analyse protéomique sous-cellulaire d'une fraction microsomale racinaire de *Medicago truncatula* (Valot et al., 2004).

Dans l'objectif était d'accéder aux protéines associées aux structures membranaires totales, c'est-à-dire les microsomes, une étude sous-cellulaire visait à caractériser les protéines de racine microsomales de la plante modèle *M. truncatula* a été effectuée par **Valot et al. (2004)**, A partir du profil électrophorétique 2-DE et ont été identifiées par empreinte de masse peptidique (FMP) de matrice de désorption / ionisation-temps de vol au laser assistée par matrice (MALDI-TOF) en utilisant une base de données EST en cluster pour les requêtes indiquant que les protéines identifiées ont été classées selon leurs différentes fonctions biologiques 28% appartenaient au transport membranaire, 25% au métabolisme primaire, 13,5% à la fonction inconnue, 11,5% à la synthèse et au traitement des protéines, 6,2% au métabolisme secondaire, 5,2% aux divers fonction et 4,2% aux systèmes de défense et de sauvetage cellulaire et Pour les catégories correspondant au cyclosquelette, vésiculaire. Trafic, métabolisme de l'ARN, Transduction du signal, cycle de la division cellulaire et stimuli

abiotiques et développement, une seule identification a été obtenue et a ont montré que ces protéines microsomales étaient soit connues pour avoir un emplacement possible sur la membrane, soit pour présenter un domaine TM.

3.3.2 Analyse protéomique du gravitropisme racinaire d'*Arabidopsis* (Kamada et al., 2005).

Les plantes ont la capacité de s'adapter à divers environnements. Parmi les divers facteurs environnementaux, tels que la gravité, l'humidité et le toucher, la gravité est une force constante qui guide la direction de la croissance des plantes et lorsque les plantes à croissance verticale sont placées dans une orientation horizontale, la stimulation dite gravitationnelle agit sur les plantes. , entraînant la croissance vers le haut et le mois de rosée de la tige apicale et de la pointe de la racine, respectivement.

Ce phénomène chez les plantes s'appelle le gravitropisme ; Donc **Kamada et al.,(2005)**, visait à tester le gravitropisme de la racine d'*Arabidopsis*, les protéines de la racine d'*Arabidopsis* induites et / ou modifiées par stimulation gravitationnelle ont été analysées à l'aide d'électrophorèse en deux dimensions couplé MALDI-TOF MS.

Ils ont constaté que les niveaux d'expression de certaines protéines liées au cytosquelette et au système de transmission du signal de calcium ont changé pendant la stimulation gravitationnelle.

De plus, la sous-unité β du composant E1 du pyruvate déshydrogénase, du fructose bisphosphate aldolase et de la protéine E1 de la sous-unité protéasome β 20S est apparue dans deux types de poids moléculaire différents au cours de la stimulation gravitationnelle.

Les modifications transitoires du poids moléculaire de ces trois protéines identifiées constituaient des découvertes importantes, bien que leurs fonctions dans la réponse gravimétrique des racines des plantules d'*Arabidopsis* demeurent incertaines.

Les mécanismes dynamiques impliqués dans la réponse gravitationnelle peuvent être régulés par l'activation et / ou l'inactivation des systèmes chaperon et protéasome dus à une stimulation gravitationnelle.

3.3.3 Une étude protéomique de la prolifération de cultures Protoplastes de *Medicago truncatula* (De Jong, et al., 2007).

Les protoplastes mésophylles de *Medicago truncatula* sont capables de former des embryons somatiques par culture de cals **De Jong, et al. (2007)**, il est intéressant d'étudier les modifications moléculaires intervenant au cours de la prolifération des protoplastes de deux génotypes différents de *M. truncatula*.

Une lignée embryogénique (2HA) et une lignée non embryogénique (A17) ont été utilisées pour la comparaison des modèles d'accumulation de protéines en utilisant l'approche protéomique à base de 2-DE couplée soit par MALDI-TOF, soit par l'analyse MALDI-TOF-TOF, combinée avec des recherches dans différentes bases de données tel que le MTGI (*M. truncatula* Gene Index sur TIGR, la base de données de protéines IMGAG des données de séquence de BAC séquences, Uniprot.

Les résultats ont démontrant que la majorité des protéines identifiées faisaient partie de quatre processus cellulaires principaux pouvant être impliqués dans :

- la prolifération des protoplastes
- métabolisme énergétique
- métabolisme secondaire de la défense
- la réponse au stress
- synthèse et repliement de protéines

Le profil d'accumulation de ces protéines indique des modifications importantes du métabolisme énergétique des cellules, accompagnées de l'activation des voies de réponse au stress et de modifications de la paroi cellulaire.

De plus, sept protéines de type PR10 (liées à la pathogénèse) ont été identifiées. Le protocole d'accumulation de ces sept protéines de type PR10 suggère qu'elles pourraient jouer un rôle dans le développement au cours de la prolifération des protoplastes.

3.3.4 Analyse protéomique des méristèmes de racine et des effets les herbicides inhibiteurs d'Acétohydroxyacide synthase sur la racine de *Medicago Truncatula* (Holmes et al., 2006)

Une étude portant a été effectué par **Holmes et al. (2006)** sur les méristèmes apicaux des racines et des pousses (RAM et SAM) sont établis au cours de l'embryogenèse et servent

de source de cellules souches pour la croissance des plantes et l'organogenèse et dans cette étude, ils ont utilisé Acétohydroxyacide synthase -inhibant les herbicides qui entravent la croissance des plantes et finissent par provoquer la mort. Des analyses quantitatives du protéome de tissus méristématique et non méristématique des racines primaires et latérales de *Medicago truncatula* et des tissus de méristème de plantes traitées avec des herbicides inhibiteurs de l'acétohydroxyacide synthase ont été effectuées à l'aide d'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de Polyacrylamide (2D-PAGE) couplée a MALDI-TOF / TOF-MS, ou par tandem LC ont permis de constaté que les protéines identifiées indiquent deux tendances: (i) augmentation de la division cellulaire et de l'accumulation des protéines médiatrices d'oxydo-réduction dans les méristèmes par rapport aux tissus non méristématique et (i) augmentation de l'accumulation de protéines liées au pathogène et diminution de l'accumulation de protéines métaboliques dans les racines traitées à l'herbicide.

Conclusion

Conclusion

L'aire de la biologie actuelle traverse une phase de transition, la génomique provient d'une symbiose à la protéomique.

La protéomique met en jeu de nombreuses expériences, d'identifications, de caractérisations, de quantifications, de mapping protéiques, celles-ci comprennent l'abondance des protéines, les activités, états de modification, emplacement subcellulaire et plus. Malheureusement, à l'exception des profils de protéines quantitatifs et interactions protéines – protéines aucune de ces propriétés ne peuvent actuellement être mesurées systématiquement, quantitativement et à haut débit. Mais les progrès rapides dans la technologie suggèrent que cette limitation peut être transitoire.

La protéomique quantitative, elle utilise préférentiellement les techniques de coloration (immunologiques IDAT) sur gel.

Les avancées scientifiques proviennent d'une symbiose des techniques physico-chimique telle que la spectrométrie de masse, de techniques biochimiques comme la chromatographie (souvent couplées aux MS) ou encore des techniques électrophorétique comme l'IEF.

Parmi ces techniques analytiques, la spectrométrie de masse représente la technique de pointe, elle assure de meilleures résolutions et une meilleure sensibilité.

Les industriels travaillent sur des outils d'analyse de plus en plus automatisables pour que les études de protéomique, qui aujourd'hui motivent de nombreuses équipes de recherches, puissent utiliser des techniques d'analyses qui s'améliorent constamment en se miniaturisant et pour offrir du haut débit d'analyse. La biologie doit miser aussi sur la bioinformatique pour exploiter des bases de données (Swiss-Prot ou trEMBL) et logiciels d'analyses de séquences soit protéiques soit génomiques (Sequest, Mascot, Peptide Search, Protein Prospector, Sequence retrieval system, Genbank). Cet outil, à l'interface des différentes disciplines de biotechnologie, apparaît comme un élément moteur de la recherche scientifique. Les données provenant de ces études doivent pouvoir être stockées, échangées pour les transferts de connaissances et des technologies.

Actuellement, les principales investigations de recherche dans ce secteur sont :

- La détermination du catalogue protéique des échantillons analysés.
- L'analyse des interactions entre protéines et l'étude des réseaux protéiques.
- L'analyse des modifications post-traductionnelles des protéines.

Conclusion

- La quantification des protéines.

Malgré les nombreux progrès réalisés ces 20 dernières années, l'analyse protéomique se trouve encore confrontée à des défis techniques et méthodologiques. Il apparaît donc nécessaire de développer des méthodologies et des stratégies d'analyse protéomique adaptées au contexte de l'étude, en combinant souvent différents outils de l'analyse protéomique.

*Référence
bibliographiques*

Référence bibliographiques

- **Alves, S., Fournier, F., Afonso, C., Wind, F., & Tabet, J. C.** (2006). Gas-phase ionization/desolvation processes and their effect on protein charge state distribution under matrix-assisted laser desorption/ionization conditions. *European Journal of Mass Spectrometry*, 12(6), 369-383.
- **Amster, I. J.** (1996). Fourier Transform Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 31, 1325-1337.
- **Anonyme A** Görg, A., A laboratory manual, Technical University of Munich, <http://www.wzw.tu-muenchen.de/blm/deg/manual/manualwork2html02test.html> (consulté 27/07/2019, 9.30)
- **Arnesen, T.** (2011). Towards a functional understanding of protein N-terminal acetylation. *PLoS biology*, 9(5), e1001074.
- **Ballihaut, G.** (2007). *Détection et identification de sélénoprotéines par électrophorèse sur gel associée aux spectrométries de masse atomique et moléculaire* (Doctoral dissertation, Université de Pau et des Pays de l'Adour)
- **Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M. M., & Kuster, B.** (2012). Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404(4), 939-965.
- **Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., & Kuster, B.** (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(4), 1017-1031.
- **Bayro, M. J., Mukhopadhyay, J., Swapna, G. V. T., Huang, J. Y., Ma, L. C., Sineva, E., ... & Ebright, R. H.** (2003). Structure of antibacterial peptide microcin J25: a 21-residue lariat protoknot. *Journal of the American Chemical Society*, 125(41), 12382-12383.
- **Beavis, R. C., Chait, B. T., & Fales, H. M.** (1989). Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 3(12), 432-435.
- **Beltrao, P., Bork, P., Krogan, N. J., & van Noort, V.** (2013). Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications. *Molecular systems biology*, 9(1).
- **Bennett, E. J., Rush, J., Gygi, S. P., & Harper, J. W.** (2010). Dynamics of cullin-RING ubiquitin ligase network revealed by systematic quantitative proteomics. *Cell*, 143(6), 951-965.
- **Bernot, A.** (2001). Analyse de génomes ,transcriptome et protéome ,139-140

Référence bibliographiques

- **Bestel-Corre, G., Dumas-Gaudot, E., Poinso, V., Dieu, M., Dierick, J. F., Tuinen, D. V., ... & Gianinazzi, S.** (2002). Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*, 23(1), 122-137.
- **Beynon, R. J., Doherty, M. K., Pratt, J. M., & Gaskell, S. J.** (2005). Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nature methods*, 2(8), 587.
- **Boja, E. S., & Rodriguez, H.** (2012). Mass spectrometry-based targeted quantitative proteomics: achieving sensitive and reproducible detection of proteins. *Proteomics*, 12(8), 1093-1110.
- **Bouchoux, G., & Sablier, M.** (2005). *Spectrométrie de masse: principe et appareillage*. Techniques de l'ingénieur.
- **Brosson, D.** (2006). *Analyse protéomique et caractérisation de nouvelles protéines de paroi chez Encephalitozoon cuniculi* (Doctoral dissertation, Clermont-Ferrand 2).
- **Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M., Thomas, D., Vandenesch, F., & Garin, J.** (2007). Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(12), 2139-2149.
- **Brun, V., Masselon, C., Garin, J., & Dupuis, A.** (2009). Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics. *Journal of proteomics*, 72(5), 740-749.
- **Campana, J. E.** (1980). Elementary theory of the quadrupole mass filter. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 33(2), 101-117.
- **Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Laganà, A.** (2009). Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science*, 177(6), 570-576.
- **Caruso, G., Cavaliere, C., Guarino, C., Gubbiotti, R., Foglia, P., & Laganà, A.** (2008). Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(1), 381-390.
- **Chen, J., Han, G., Shang, C., Li, J., Zhang, H., Liu, F., ... & Zhang, Y.** (2015). Proteomic analyses reveal differences in cold acclimation mechanisms in freezing-tolerant and freezing-sensitive cultivars of alfalfa. *Frontiers in plant science*, 6, 105.
- **Chen, X., Wei, S., Ji, Y., Guo, X., & Yang, F.** (2015). Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *Proteomics*, 15(18), 3175-3192.

Référence bibliographiques

- Chevallet, M., Santoni, V., Poinas, A., Rouquié, D., Fuchs, A., Kieffer, S., ... & Rabilloud, T. (1998). New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 19(11), 1901-1909.
- Choudhary, C., & Mann, M. (2010). Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(6), 427.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., ... & Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, 325(5942), 834-840.
- COUDER.C. (2006). Quelques développements de l'analyse protéomique en spectrométrie de masse
- Csete, M. E., & Doyle, J. C. (2002). Reverse engineering of biological complexity. *science*, 295(5560), 1664-1669.
- Davis, M. T., Beierle, J., Bures, E. T., McGinley, M. D., Mort, J., Robinson, J. H., ... & Patterson, S. D. (2001). Automated LC-LC-MS-MS platform using binary ion-exchange and gradient reversed-phase chromatography for improved proteomic analyses. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 752(2), 281-291.
- de Graauw, M., Hensbergen, P., & van de Water, B. (2006). Phospho-proteomic analysis of cellular signaling. *Electrophoresis*, 27(13), 2676-2686.
- de Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2005). Spectrométrie de masse. Dunod éditeur. *Sciences Sup, Paris, France*.
- De Jong, F., Mathesius, U., Imin, N., & Rolfe, B. G. (2007). A proteome study of the proliferation of cultured *Medicago truncatula* protoplasts. *Proteomics*, 7(5), 722-736.
- Deribe, Y. L., Pawson, T., & Dikic, I. (2010). Post-translational modifications in signal integration. *Nature structural & molecular biology*, 17(6), 666.
- Dewald, H. D. (1999). *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications* (ed. Cole, Richard B.).
- Dreisewerd, K. (2003). The desorption process in MALDI. *Chemical reviews*, 103(2), 395-426.
- Dubois, M. (2008). *Développement de techniques analytiques pour l'évaluation des protéines thérapeutiques et des biomarqueurs par spectrométrie de masse* (Doctoral dissertation).
- Edman, P. (1949). A method for the determination of the amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.*, 22, 475-476.

Référence bibliographiques

- **Emadali, A., & Gallagher-Gambarelli, M.** (2009). La protéomique quantitative par la méthode SILAC-Technique et perspective. *médecine/sciences*, 25(10), 835-842.
- **Eng, J. K., McCormack, A. L., & Yates, J. R.** (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 5(11), 976-989.
- **Ferguson, R. E., McCulloh, K. E., & Rosenstock, H. M.** (1965). Observation of the Products of Ionic Collision Processes and Ion Decomposition in a Linear, Pulsed Time-of-Flight Mass Spectrometer. *The Journal of chemical physics*, 42(1), 100-106.
- **Ferreira, S., Hjernø, K., Larsen, M., Wingsle, G., Larsen, P., Fey, S., ... & Salomé Pais, M.** (2006). *Proteome profiling of Populus euphratica Oliv. upon heat stress. Annals of botany*, 98(2), 361-377.
- **Flynn, W. G.** (2008). *Biotechnology and bioengineering. Nova Science Publishers (NK)*.
- **Gan, C. S., Chong, P. K., Pham, T. K., & Wright, P. C.** (2007). Technical, experimental, and biological variations in isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). *Journal of proteome research*, 6(2), 821-827.
- **Gao, F., Zhou, Y., Zhu, W., Li, X., Fan, L., & Zhang, G.** (2009). *Proteomic analysis of cold stress-responsive proteins in Thellungiella rosette leaves. Planta*, 230(5), 1033–1046.
- **Geiger, T., Cox, J., Ostasiewicz, P., Wisniewski, J. R., & Mann, M.** (2010). Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nature methods*, 7(5), 383.
- **Gelpí, E.** (2008). From large analogical instruments to small digital black boxes: 40 years of progress in mass spectrometry and its role in proteomics. Part I 1965–1984. *Journal of mass spectrometry*, 43(4), 419-435.
- **Gelpí, E.** (2009). From large analogical instruments to small digital black boxes: 40 years of progress in mass spectrometry and its role in proteomics. Part II 1985–2000. *Journal of mass spectrometry*, 44(8), 1137-1161.
- **Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W., & Gygi, S. P.** (2003). Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 6940-6945.
- **Gervais, M. L.** (2010). *Etude des interactions protéine-protéine par double hybride bactérien: applications en agro-alimentaire et en santé* (Doctoral dissertation).
- **Gibson, G & Muse, S.** (2004). *précis de génomique, Dunod éditeur. Sciences Sup, Paris, France.* 139-198

Référence bibliographiques

- **Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Csordas, A., Diaz, J. J., & Madjar, J. J.** (1997). Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis*, 18(3-4), 328-337.
- **Görg, A., Weiss, W., & Dunn, M. J.** (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12), 3665-3685.
- **Griffiths, J.** (2008). A brief history of mass spectrometry. *Anal Chem*, 80(15), 5678-5683.
- **Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., & Aebersold, R.** (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature biotechnology*, 17(10), 994.
- **Hainque ,B . Baudin ,B .Lefebvre ,P.** (2008). appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire Dunod éditeur. *Sciences Sup, Paris, France* , 130 -131
- **Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S. Y., Ober, E. S., & Hosseini Salekdeh, G.** (2005). Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 5(4), 950-960.
- **Hanash, S. M.** (2000). Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: Current status. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 21(6), 1202-1209.
- **Hansen, K. C., Schmitt-Ulms, G., Chalkley, R. J., Hirsch, J., Baldwin, M. A., & Burlingame, A. L.** (2003). Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low levels using cleavable ¹³C-isotope-coded affinity tag and multidimensional chromatography. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(5), 299-314.
- **Holmes, P., Farquharson, R., Hall, P. J., & Rolfe, B. G.** (2006). Proteomic analysis of root meristems and the effects of acetohydroxyacid synthase-inhibiting herbicides in the root of *Medicago truncatula*. *Journal of proteome research*, 5(9), 2309-2316.
- **Horn, D. M., Peters, E. C., Klock, H., Meyers, A., & Brock, A.** (2004). Improved protein identification using automated high mass measurement accuracy MALDI FT-ICR MS peptide mass fingerprinting. *International Journal of Mass Spectrometry*, 238(2), 189-196.
- **Hunt, D. F., Buko, A. M., Ballard, J. M., Shabanowitz, J., & Giordani, A. B.** (1981). Sequence analysis of polypeptides by collision activated dissociation on a triple quadrupole mass spectrometer. *Biomedical mass spectrometry*, 8(9), 397-408.
- **Ideker, T., Galitski, T., & Hood, L.** (2001). A new approach to decoding life: systems biology. *Annual review of genomics and human genetics*, 2(1), 343-372.

Référence bibliographiques

- **Jensen, O. N.** (2004). Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current opinion in chemical biology*, 8(1), 33-41.
- **Jiang, S. S., Liang, X. N., Li, X., Wang, S. L., Lv, D. W., Ma, C. Y., ... & Yan, Y. M.** (2012). Wheat drought-responsive grain proteome analysis by linear and nonlinear 2-DE and MALDI-TOF mass spectrometry. *International journal of molecular sciences*, 13(12), 16065-16083.
- **Johnson, L. N., & Lewis, R. J.** (2001). Structural basis for control by phosphorylation. *Chemical reviews*, 101(8), 2209-2242.
- **Kamada, M., Higashitani, A., & Ishioka, N.** (2005). Proteomic analysis of Arabidopsis root gravitropism. *Biological Sciences in Space*, 19(3), 148-154.
- **Kebarle, P.** (2000). A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 35(7), 804-817.
- **Kristensen, D. B., Imamura, K., Miyamoto, Y., & Yoshizato, K.** (2000). Mass spectrometric approaches for the characterization of proteins on a hybrid quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 21(2), 430-439.
- **Laemmli, U. K.** (1970) *Nature* 227, 680-5.
- **Lahm, H. W., & Langen, H.** (2000). Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 21(11), 2105-2114.
- **Lee, D. G., Ahsan, N., Lee, S. H., Kang, K. Y., Bahk, J. D., Lee, I. J., & Lee, B. H.** (2007). A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics*, 7(18), 3369-3383.
- **Lee, D. G., Ahsan, N., Lee, S. H., Kang, K. Y., Lee, J. J., & Lee, B. H.** (2007). An approach to identify cold-induced low-abundant proteins in rice leaf. *Comptes rendus biologies*, 330(3), 215-225.
- **Li, W., Wei, Z., Qiao, Z., Wu, Z., Cheng, L., & Wang, Y.** (2013). Proteomics analysis of alfalfa response to heat stress. *PLoS One*, 8(12), e82725.
- **Lu, C. T., Huang, K. Y., Su, M. G., Lee, T. Y., Bretana, N. A., Chang, W. C., ... & Huang, H. D.** (2012). DbPTM 3.0: an informative resource for investigating substrate site specificity and functional association of protein post-translational modifications. *Nucleic acids research*, 41(D1), D295-D305.

Référence bibliographiques

- **Luche, S., Santoni, V., & Rabilloud, T.** (2003). Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, 3(3), 249-253.
- **Mahon, P., & Dupree, P.** (2001). Quantitative and reproducible two-dimensional gel analysis using Phoretix 2D Full. *Electrophoresis*, 22(10), 2075-2085.
- **Majoul, T., Bancel, E., Triboï, E., Ben Hamida, J., & Branlard, G.** (2003). *Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from total endosperm.* *Proteomics*, 3(2), 175-183.
- **Mann, M., & Jensen, O. N.** (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology*, 21(3), 255
- **Mann, M., & Wilm, M.** (1994). Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Analytical chemistry*, 66(24), 4390-4399.
- **Merchant, M., & Weinberger, S. R.** (2000). Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 21(6), 1164-1177.
- **Molloy, M. P.** (2000). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Analytical biochemistry*, 280(1), 1-10.
- **Murray, C. I., Uhrigshardt, H., O'Meally, R. N., Cole, R. N., & Van Eyk, J. E.** (2012). Identification and quantification of S-nitrosylation by cysteine reactive tandem mass tag switch assay. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(2), M111-013441.
- **Nesvizhskii, A. I., Vitek, O., & Aebersold, R.** (2007). Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. *Nature methods*, 4(10), 787.
- **Norbeck, J., & Blomberg, A.** (1997). Two-dimensional electrophoretic separation of yeast proteins using a non-linear wide range (pH 3–10) immobilized pH gradient in the first dimension; reproducibility and evidence for isoelectric focusing of alkaline (pI > 7) proteins. *Yeast*, 13(16), 1519-1534.
- **Ong, S. E., & Mann, M.** (2007). A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nature protocols*, 1(6), 2650
- **Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., & Mann, M.** (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics*, 1(5), 376-386.

Référence bibliographiques

- **Ow, S. Y., Salim, M., Noirel, J., Evans, C., Rehman, I., & Wright, P. C.** (2009). iTRAQ underestimation in simple and complex mixtures: “the good, the bad and the ugly”. *Journal of proteome research*, 8(11), 5347-5355.
- **Pang, Q., Chen, S., Dai, S., Chen, Y., Wang, Y., & Yan, X.** (2010). Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *Journal of proteome research*, 9(5), 2584-2599.
- **Papayannopoulos, I. A.** (1995). The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass spectrometry reviews*, 14(1), 49-73.
- **Pappin, D. J., Hojrup, P., & Bleasby, A. J.** (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current biology*, 3(6), 327-332.
- **Patel, V. J., Thalassinos, K., Slade, S. E., Connolly, J. B., Crombie, A., Murrell, J. C., & Scrivens, J. H.** (2009). A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches. *Journal of proteome research*, 8(7), 3752-3759.
- **Patterson, S. D., & Aebersold, R. H.** (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nature genetics*, 33(3s), 311.
- **Patton, W. F.** (2000). A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 21(6), 1123-1144.
- **Posewitz, M. C., & Tempst, P.** (1999). Immobilized gallium (III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Analytical chemistry*, 71(14), 2883-2892.
- **Pütz, S. M., Boehm, A. M., Stiewe, T., & Sickmann, A.** (2012). iTRAQ analysis of a cell culture model for malignant transformation, including comparison with 2D-PAGE and SILAC. *Journal of proteome research*, 11(4), 2140-2153.
- **Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., & Lunardi, J.** (1997). Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 18(3-4), 307-316.
- **Rabilloud, T., Strub, J. M., Luche, S., Dorsselaer, A. V., & Lunardi, J.** (2001). A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *PROTEOMICS: International Edition*, 1(5), 699-704.
- **Redding, A. M., Mukhopadhyay, A., Joyner, D. C., Hazen, T. C., & Keasling, J. D.** (2006). Study of nitrate stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough using iTRAQ proteomics. *Briefings in Functional Genomics*, 5(2), 133-143.

Référence bibliographiques

- **Regula, J. T., Ueberle, B., Boguth, G., Görg, A., Schnölzer, M., Herrmann, R., & Frank, R.** (2000). Towards a two-dimensional proteome map of *Mycoplasma pneumoniae*. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 21(17), 3765-3780.
- **Righetti, P. G.** (2005). Electrophoresis: the march of pennies, the march of dimes. *Journal of Chromatography A*, 1079(1-2), 24-40.
- **Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., ... & Purkayastha, S.** (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & cellular proteomics*, 3(12), 1154-1169.
- **Salekdeh, G. H., Siopongco, J., Wade, L. J., Ghareyazie, B., & Bennett, J.** (2002). Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *PROTEOMICS: International Edition*, 2(9), 1131-1145.
- **Schaeffer-Reiss, C.** (2008). A brief summary of the different types of mass spectrometers used in proteomics. In *Functional Proteomics* (pp. 3-16). Humana Press.
- **Schilling, B., Rardin, M. J., MacLean, B. X., Zawadzka, A. M., Frewen, B. E., Cusack, M. P., ... & Verdin, E.** (2012). Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MS1 extracted ion chromatograms in skyline: application to protein acetylation and phosphorylation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(5), 202-214.
- **Schmidt, C., Lenz, C., Grote, M., Lührmann, R., & Urlaub, H.** (2010). Determination of protein stoichiometry within protein complexes using absolute quantification and multiple reaction monitoring. *Analytical chemistry*, 82(7), 2784-2796.
- **Seet, B. T., Dikic, I., Zhou, M. M., & Pawson, T.** (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(7), 473.
- **Senko, M. W., Canterbury, J. D., Guan, S., & Marshall, A. G.** (1996). A high-performance modular data system for Fourier transforms ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(14), 1839-1844
- **Shchemelinin, I., Sefc, L., & Necas, E.** (2006). Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia biologica*, 52(3), 81-100.
- **Shen, Y., & Smith, R. D.** (2002). Proteomics based on high-efficiency capillary separations. *Electrophoresis*, 23(18), 3106-3124.
- **Sickmann, A., & Meyer, H. E.** (2001). Phosphoamino acid analysis. *PROTEOMICS: International Edition*, 1(2), 200-206.

Référence bibliographiques

- Sickmann, A., Marcus, K., Schäfer, H., Butt-Dörje, E., Lehr, S., Herkner, A., ... & Meyer, H. E. (2001). Identification of post-translationally modified proteins in proteome studies. *Electrophoresis*, 22(9), 1669-1676.
- Steen, H., Jebanathirajah, J. A., Springer, M., & Kirschner, M. W. (2005). Stable isotope-free relative and absolute quantitation of protein phosphorylation stoichiometry by MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11), 3948-3953.
- Ünlü, M., Morgan, M. E., & Minden, J. S. (1997). Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 18(11), 2071-2077.
- Valot, B., Gianinazzi, S., & Eliane, D. G. (2004). Sub-cellular proteomic analysis of a *Medicago truncatula* root microsomal fraction. *Phytochemistry*, 65(12), 1721-1732.
- Wang, H., Alvarez, S., & Hicks, L. M. (2012). Comprehensive comparison of iTRAQ and label-free LC-based quantitative proteomics approaches using two *Chlamydomonas reinhardtii* strains of interest for biofuels engineering. *Journal of proteome research*, 11(1), 487-501.
- Washburn, M. P., Ulaszek, R., Deciu, C., Schieltz, D. M., & Yates, J. R. (2002). Analysis of quantitative proteomic data generated via multidimensional protein identification technology. *Analytical chemistry*, 74(7), 1650-1657.
- Widgruber, R., Harder, A., Obermaier, C., Boguth, G., Weiss, W., Fey, F. J., Larsen, P. M., Görg, A. (2000). Toward higher resolution : Two dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow pH gradients, *Electrophoresis*, 21, 2610-2616.
- Wildgruber, R., Harder, A., Obermaier, C., Boguth, G., Weiss, W., Fey, S. J., ... & Görg, A. (2000). Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 21(13), 2610-2616.
- Wu, F. Z., Wang, B. C., & Yang, C. P. (2014). Proteomic analysis of the cold stress response in the leaves of birch (*Betula platyphylla* Suk). *Plant Omics*, 7(4), 195.
- Wu, W. W., Wang, G., Baek, S. J., & Shen, R. F. (2006). Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel-or LC-MALDI TOF/TOF. *Journal of proteome research*, 5(3), 651-658.
- Yang, X. J. (2005). Multisite protein modification and intramolecular **signaling**. *Oncogene*, 24(10), 1653

Référence bibliographiques

- **Young, N. L., DiMaggio, P. A., Plazas-Mayorca, M. D., Baliban, R. C., Floudas, C. A., & Garcia, B. A.** (2009). High throughput characterization of combinatorial histone codes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(10), 2266-2284.
- **Zhang, R., Sioma, C. S., Wang, S., & Regnier, F. E.** (2001). Fractionation of isotopically labeled peptides in quantitative proteomics. *Analytical chemistry*, 73(21), 5142-5149.
- **Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., ... & Li, Y.** (2010). Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*, 327(5968), 1000-1004.
- **Zhu, W., Smith, J. W., & Huang, C. M.** (2010). Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *BioMed Research International*, 2010.
- **Zörb, C., Herbst, R., Forreiter, C., & Schubert, S.** (2009). Short-term effects of salt exposure on the maize chloroplast protein pattern. *Proteomics*, 9(17), 4209-4220.

Apport de la protéomique quantitative ciblée à haute résolution : utilisation de la technique spectrométrie de masse chez les plantes

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Génomique Végétale

Résumé :

L'analyse protéomique consiste à l'étude qualitative et quantitative de l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule ou tissu dans des conditions données (protéome), à les séparer par des électrophorèses sur gel de polyacrylamide, à les détecter avec des colorations spécifiques et notamment à les identifier par spectrométries de masse moléculaire. Les progrès instrumentaux en spectrométrie de masse et l'interprétation automatisée des spectres MS/MS des dernières années ont permis d'imposer ce domaine dans les sciences de la vie. Cependant, cette méthodologie s'applique encore difficilement aux organismes dont les génomes n'ont pas été séquencés, et donc pour lesquels il n'existe pas de banques de séquences peptidiques de référence. Diverses stratégies protéomiques permettent ainsi, aujourd'hui, d'identifier et quantifier plusieurs centaines/milliers de protéines dans un échantillon complexe, ce qui permet classiquement de caractériser les états physiopathologiques. En revanche, la protéomique est un outil émergent en biologie évolutive et elle peut être utilisée à grande échelle dans les études des applications de spectrométrie de masse chez les végétaux.

Dans ce mémoire les points les plus importants qu'ont été discutés sont : les techniques, Le principe de fonctionnement les plus importantes analyseurs de masse, La quantification de protéines par spectrométrie de masse relative ou absolue, les innovations scientifiques.

Mots clés : Protéomique, spectrométrie de masse, Protéomique quantitative, iTRAQ

Jury d'évaluation :

Président :	<i>KELLOU Kamel</i>	MAA - UFM Constantine,
Encadrant :	<i>LOUALI Yamouna</i>	MCB- UFM Constantine,
Examinatrice:	<i>HAMLA Chourouk</i>	MCB - UFM Constantine.

Date de soutenance : 26 /09/2019