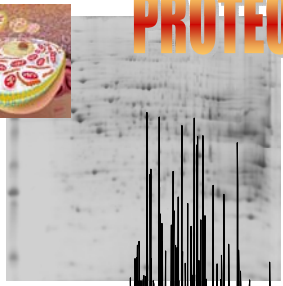
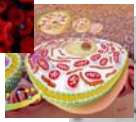


PROTEOMIQUE



Protéomique: Stratégies basées sur la Spectrométrie de Masse

WASSELIN Thierry, BARTHELEMY Nicolas

Directeur: VAN DORSSELAER Alain
Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique
Institut Pluridisciplinaire Hubert CURIEN
IPHC-DSA, ULP, CNRS, UMR 7178
ECPM- 25, rue Becquerel
F- 67087 STRASBOURG

Introduction à la protéomique

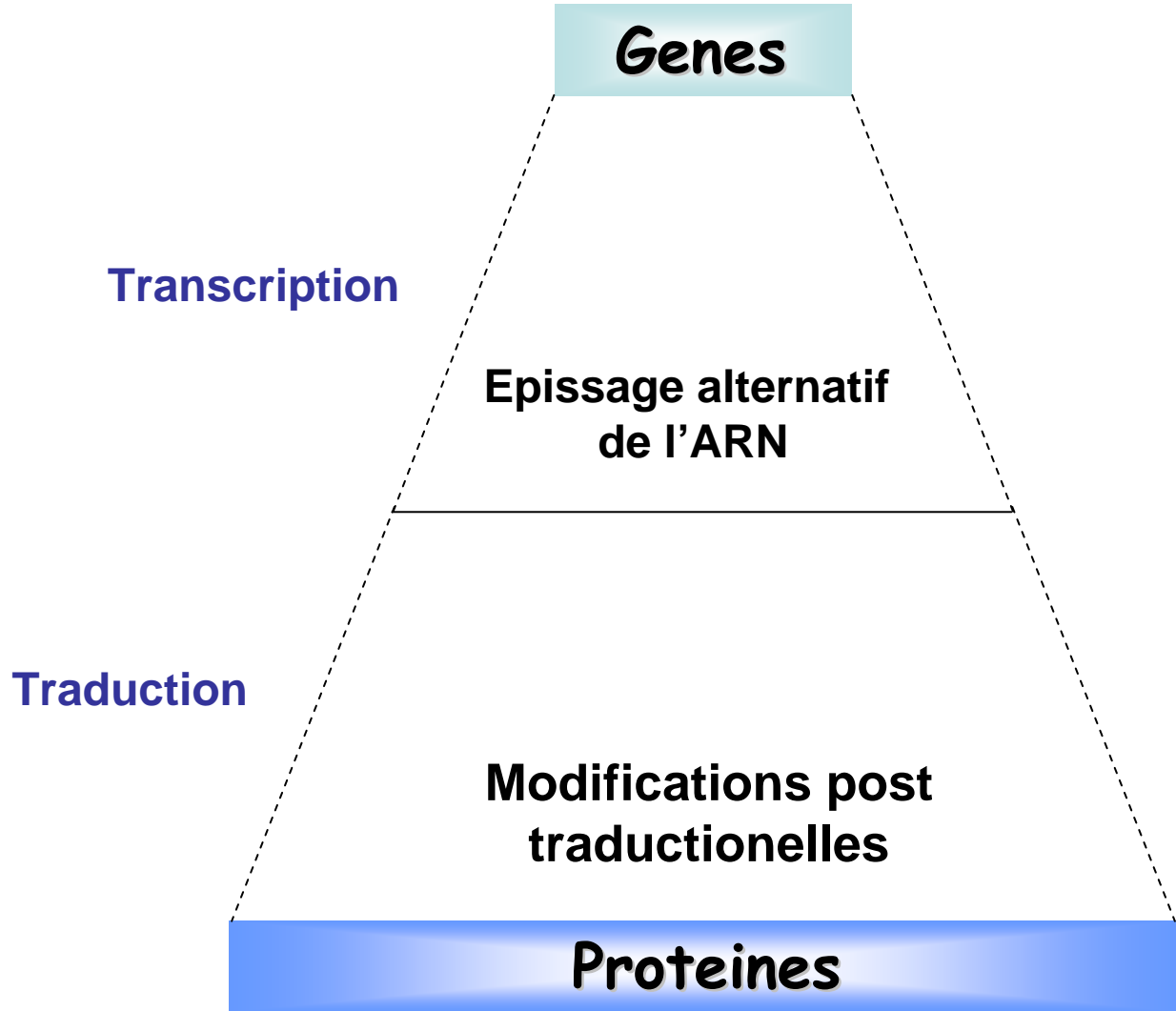
Le postulat :



On a longtemps pensé que connaître le génome c'était connaître tous les mécanismes du vivant

➔ Course au séquençage des génomes

Humain : environ 25000 gènes

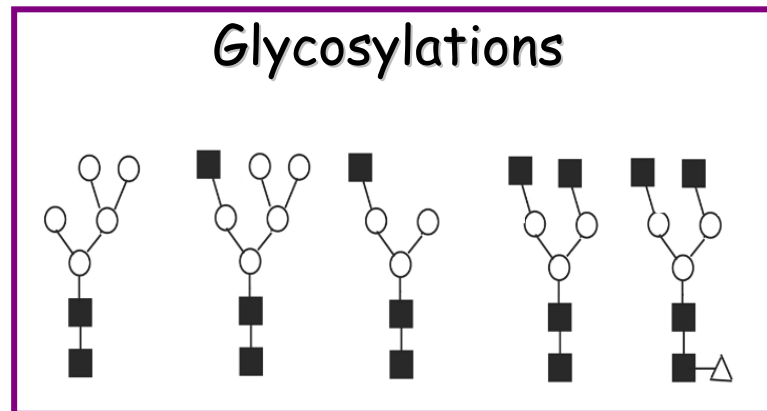
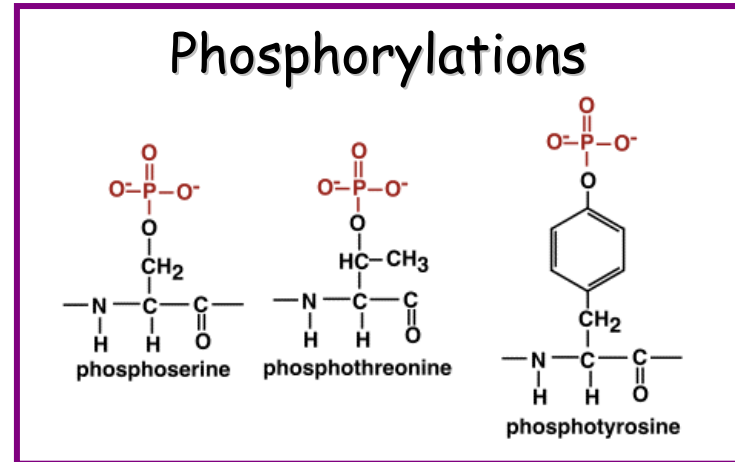
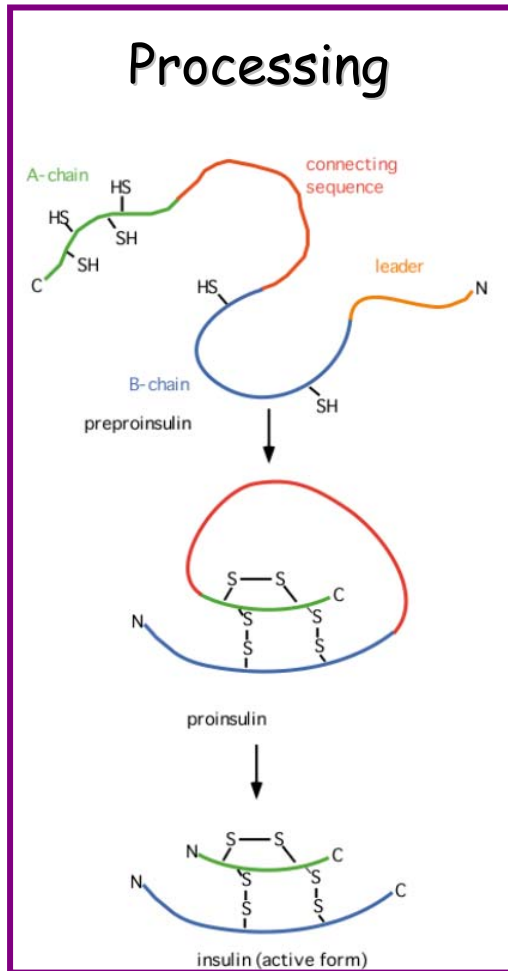


Augmentation de la complexité

Humain : environ 1 million de protéines

Augmentation de la complexité après la traduction :

Modifications post-traductionnelles



Et bien d'autres ...

Un génome ...



... différents protéomes !

Etudier le protéome c'est :

Etudier l'ensemble des **protéines** produites par un **génom**

Identifier : quelles sont les protéines ?

Caractériser : comment sont-elles modifiées ?

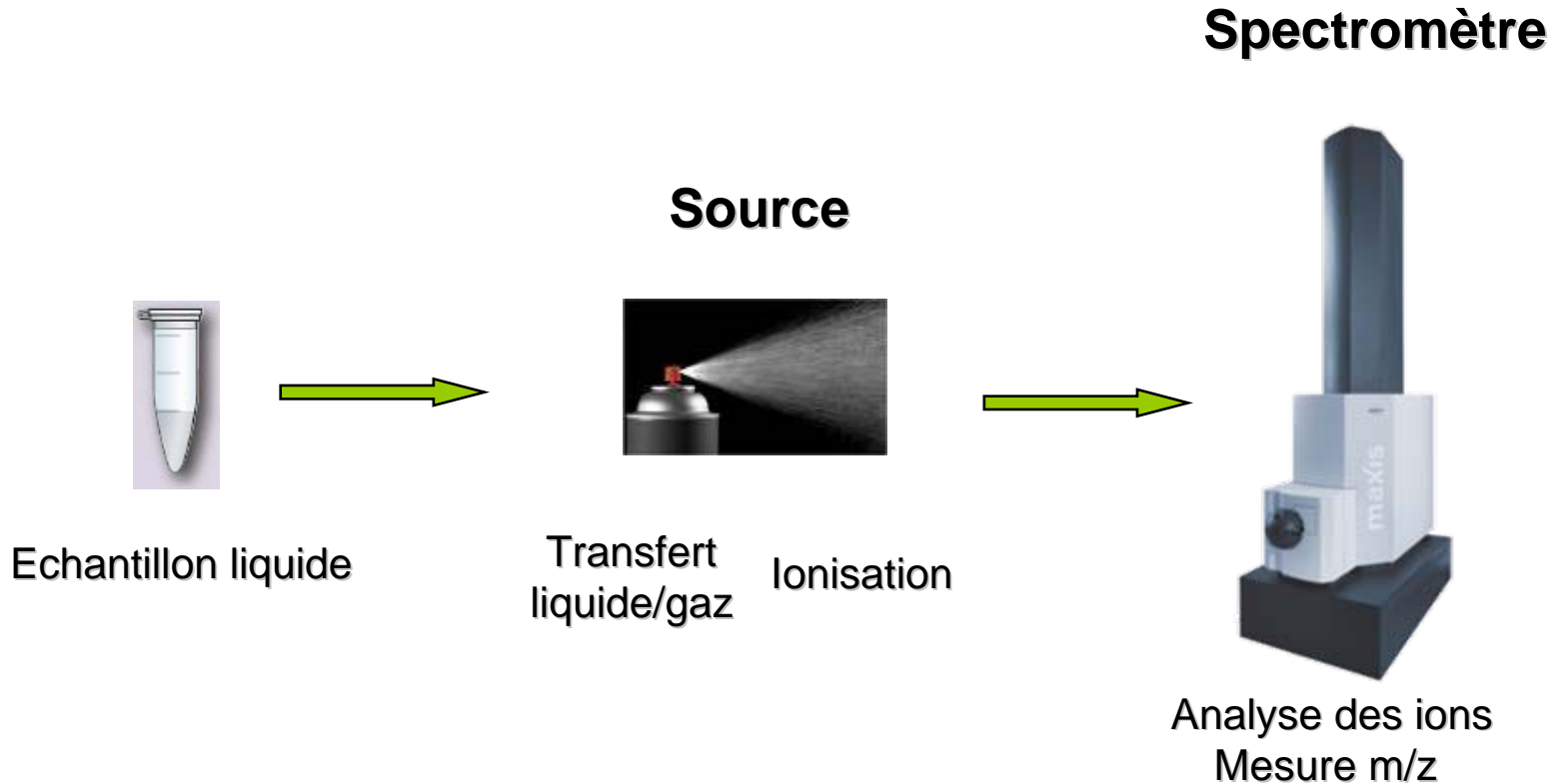
Quantifier : quelles quantités sont exprimées ?

Répondre à ces questions dans des contextes :

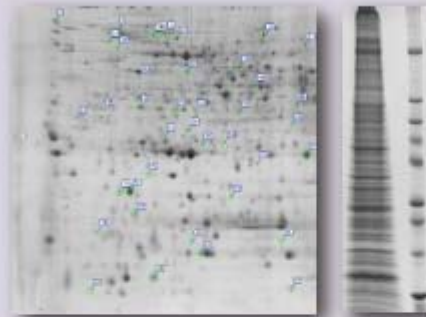
d'**espace**, de **temps**, d'**états physiologiques**

Comment accéder à ces informations ?

Outil de choix : la spectrométrie de masse



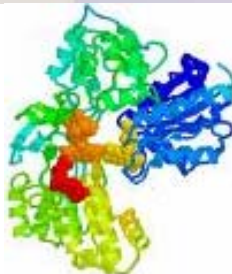
Électrophorèse sur gel



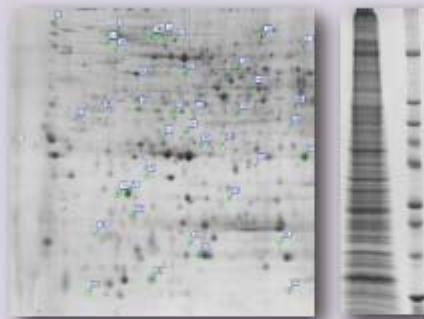
Approche
'shotgun'



Extrait total



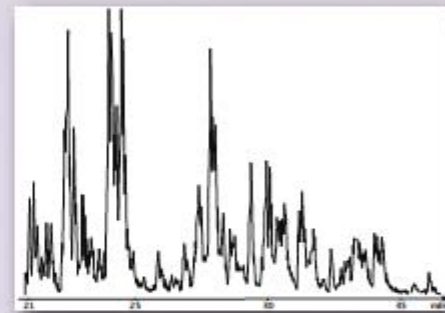
Électrophorèse sur gel



Digestion enzymatique



RP-LC



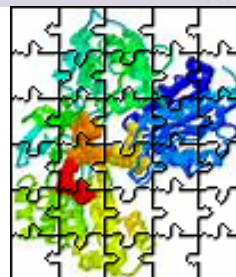
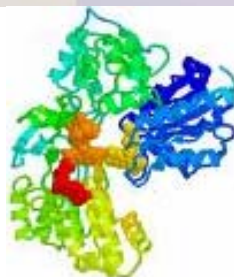
2D-LC



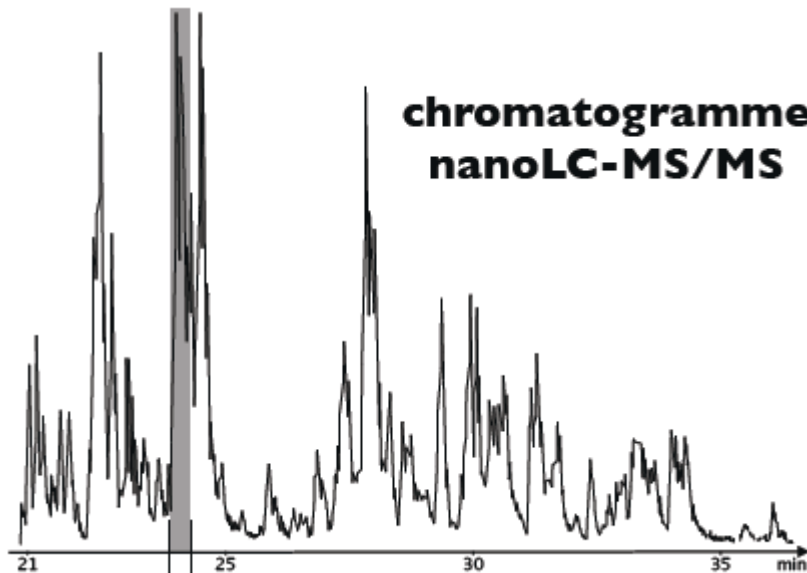
Approche
'shotgun'



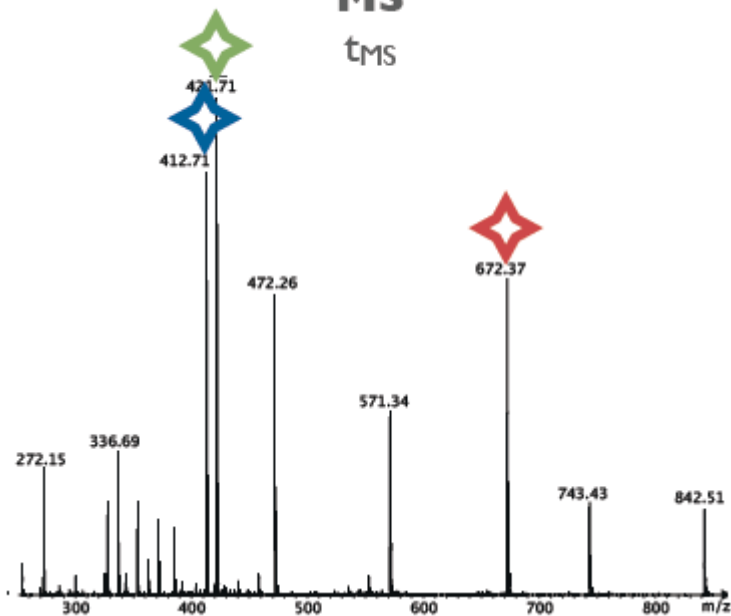
Extrait total



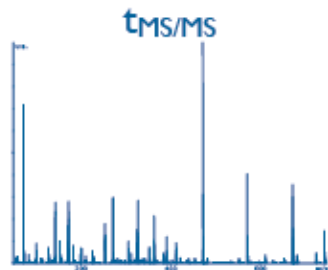
chromatogramme nanoLC-MS/MS



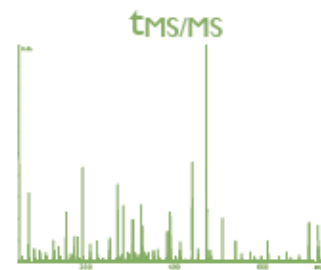
MS
tms



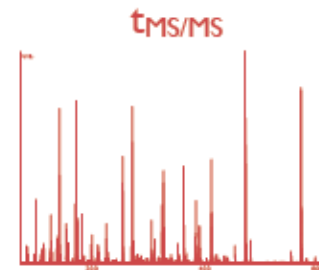
MS/MS #1
tms/MS



MS/MS #2
tms/MS



MS/MS #3
tms/MS



Acquisition données MS



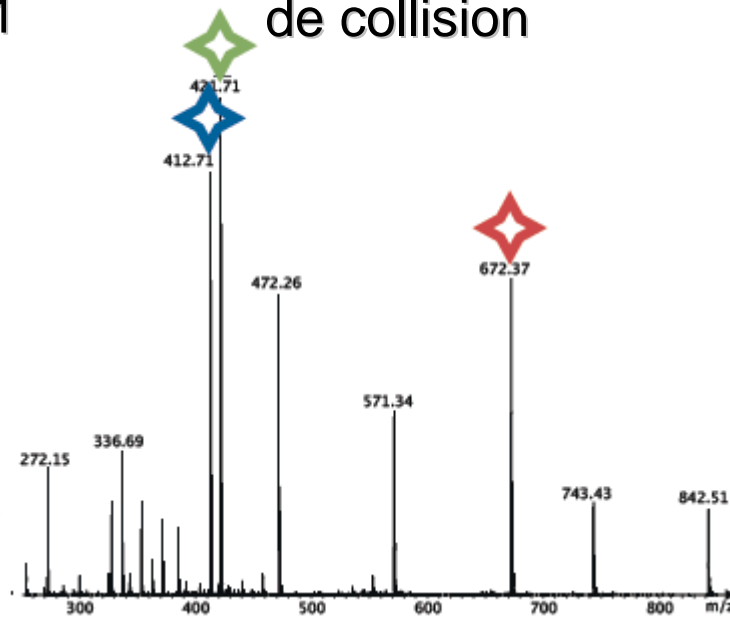
Analyseur
de masse 1



Cellule
de collision

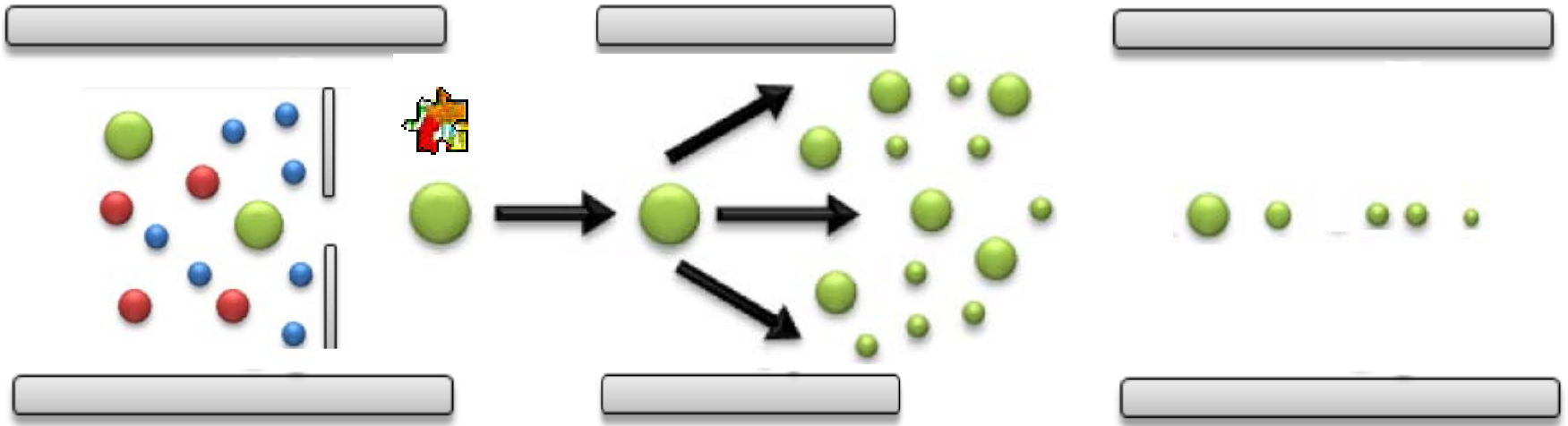


Analyseur
de masse 2



Spectre MS

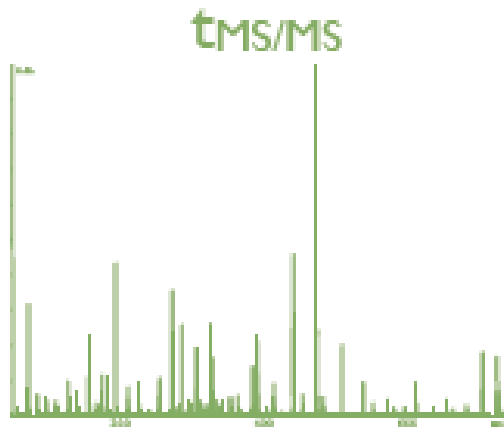
Acquisition données MS/MS



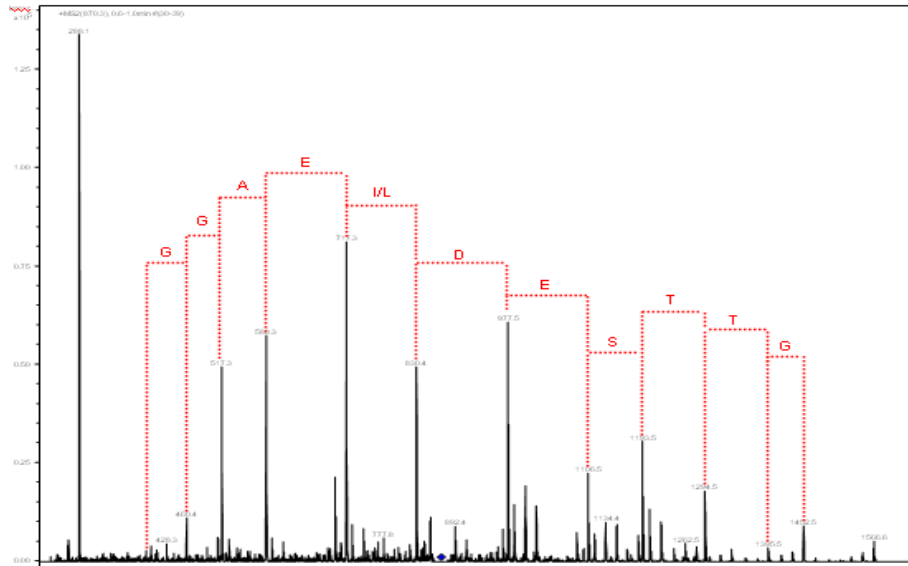
Analyseur de masse 1

Cellule de collision

Analyseur de masse 2



Spectre MS/MS



- 546,45
- 789,67
- 876,43
- 987,49
- 999,12
- 1018,98
- 1342,34
- 1597,09
- 1678,97
- 1987,65
- 2202,22

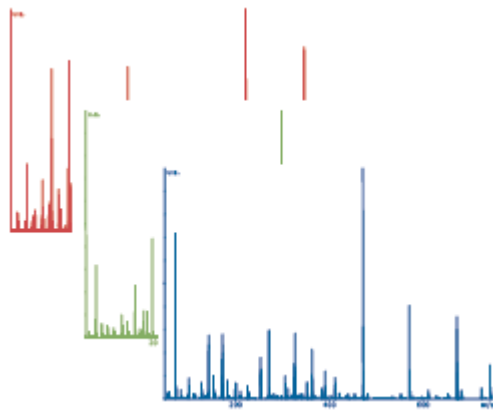
Peptide sequence : Fragmentation



➤ **Masse du précurseur + Liste de masses de fragments**

Confrontation des données expérimentales aux données théoriques

Liste de masses expérimentales



Données expérimentales



546,45

789,67
876,43
987,49
999,12
1018,98
1342,34
1597,09
1678,97
1987,65
2202,22



576,32

516,90
634,79
612,75
752,93
879,89
999,78
1134,48
1368,84
1596,28
1675,89
1888,44

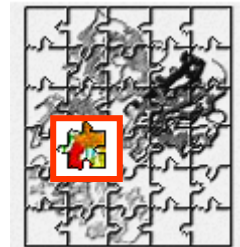


678,09

712,43
750,09
812,34
933,66
978,55
1207,45
1327,87
1387,23
1505,72
1678,06
1835,79
1944,55



Comparaison
Algorithmes
de recherche



Identification

Genome
sequence



Algorithme
de prédiction
des gènes

Banques
protéiques

MGHIDCKMLIEDMLKPI
C MGHIDCKMLIEDMLKPI
C C MGHIDCKMLIEDMLKPI
Y C CEKQIUDCGIEKCKIIE
T Y CKKKEGQNLEI IUKNDS
T Y YCIQNLVDCS QLSDCID
T TNQCLODLCQIKKOF



digestion et
fragmentation
In silico



546,45

789,67
876,43
987,49
999,12
1018,98
1342,34
1597,09
1678,97
1987,65
2202,22



576,32

516,90
634,79
612,75
752,93
879,89
999,78
1134,48
1368,84
1596,28
1675,89
1888,44



678,09

712,43
750,09
812,34
933,66
978,55
1207,45
1327,87
1387,23
1505,72
1678,06
1835,79
1944,55

Listes de masses théoriques

Données théoriques

Instruments utilisés



ESI Trappe (HCT)



ESI Q-TOF (Synapt HDMS)

Couplage LC-MS/MS



ESI Q-TOF (MicroQTOF)

Différents instruments pour différentes applications,
(précision, résolution, sensibilité, rapidité)



ESI Q-TOF (MaXis)

Caractérisation avec absence du génome de l'espèce étudiée dans les banques

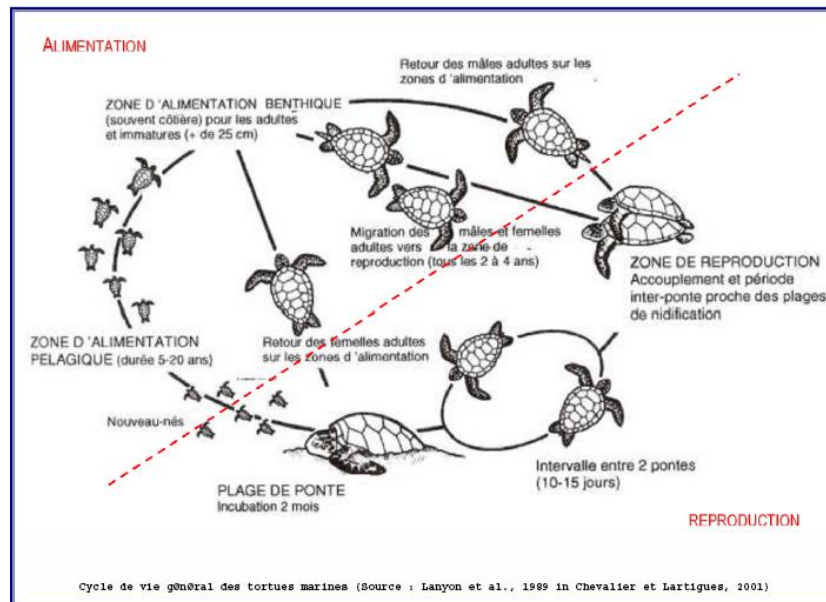
Projet VTG en collaboration avec le DEPE



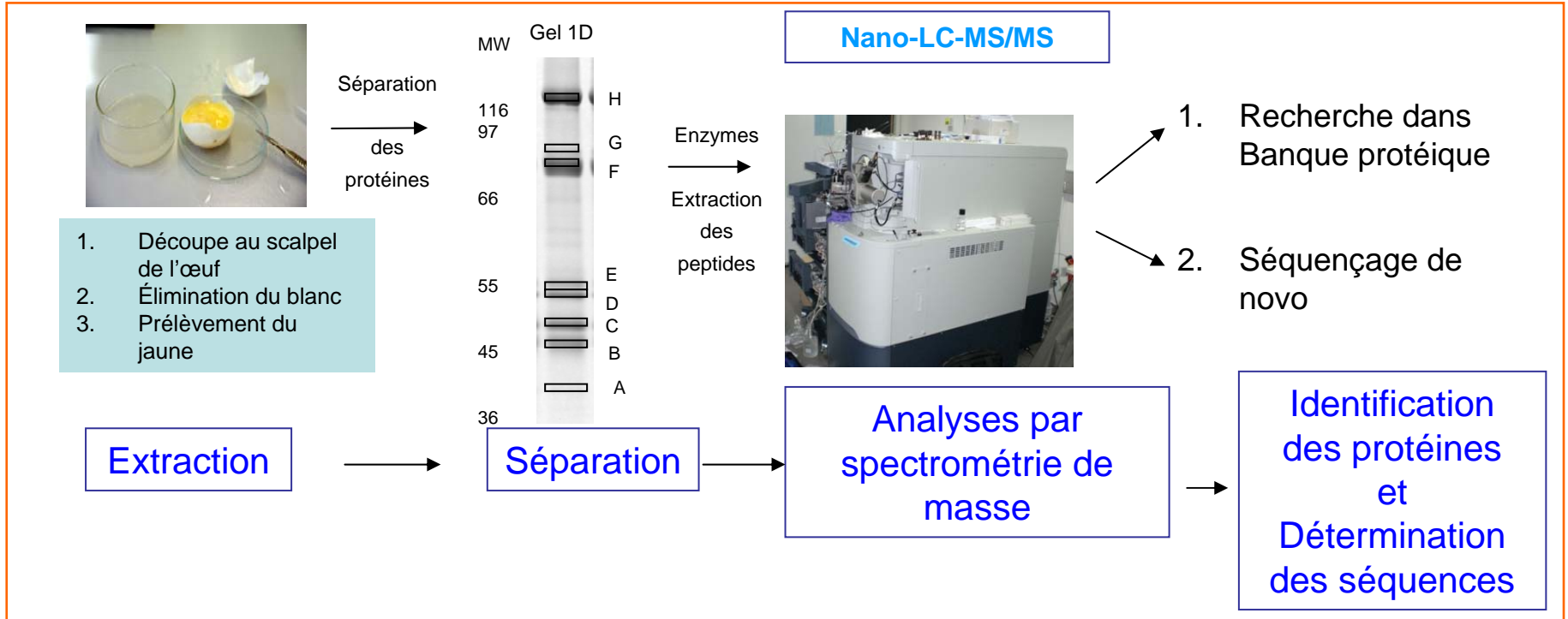
La vitellogénine (VTG) joue un rôle dans la reproduction des espèces ovipares et peut être un indicateur du statut reproducteur de ces espèces. Il s'agit de développer un test ELISA et/ou western blot pour quantifier la VTG présente dans le plasma

↳ nécessite la production d'anticorps

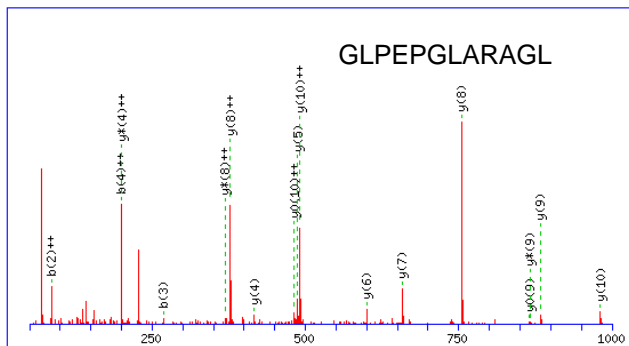
↳ nécessite de déterminer précisément la séquence de la VTG



Stratégie d'analyse



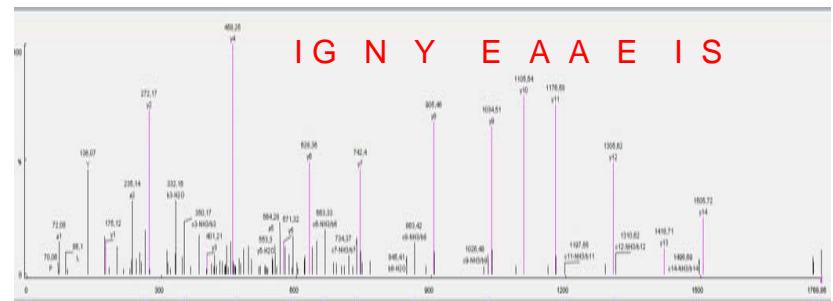
1. Recherche dans banque protéique



Monoisotopic mass of neutral peptide $M_r(\text{calc})$: 1149.6506
 Ions Score: 29 Expect: 6.8e-005
 Matches (**Bold Red**): 18/88 fragment ions using 43 most intense peaks

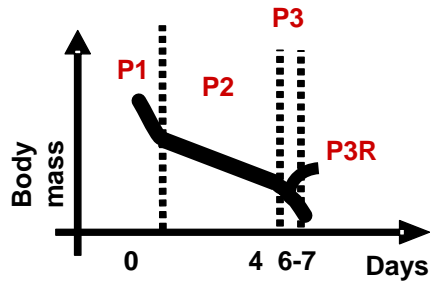
2. Séquençage de novo

VY**SI**EAAEYNGIG**EP**R



La quantification en protéomique : Etude différentielle

Jeûne prolongé et réponse musculaire



P1 : Mobilisation des réserves glucidiques

P2 : Forte mobilisation des lipides

P3 : Utilisation des protéines

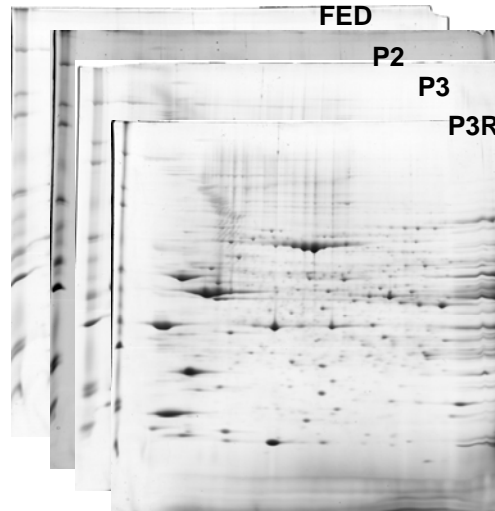
P3R : Réalimentation

- Identifier les étapes des voies métaboliques qui sont affectées dans ces situations

La quantification en protéomique : Etude différentielle



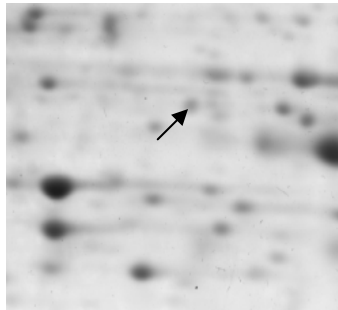
broyage, précipitation des protéines
→
Séparation des protéines par gel 2D



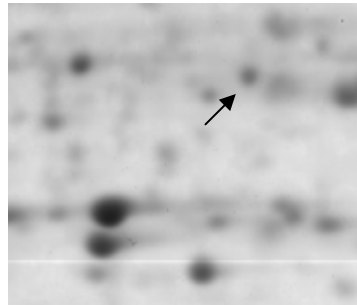
Analyse des images des gels

Détermination des spots différentiels

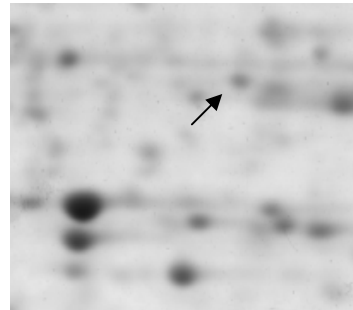
Fed



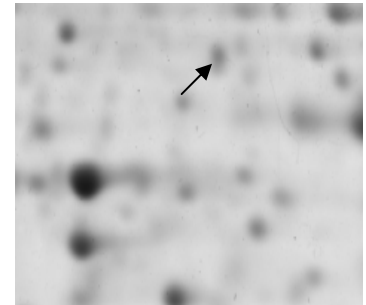
P2



P3

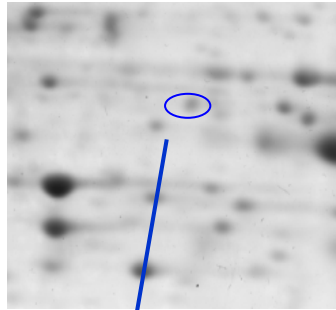


P3R



La quantification en protéomique : Etude différentielle

Exemple d'une protéine impliquée dans le jeûne



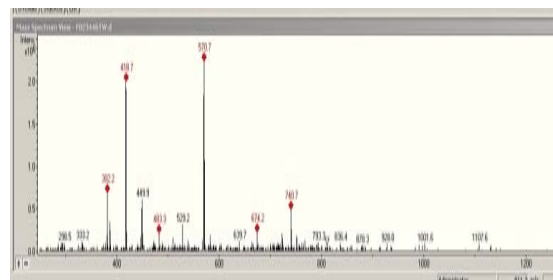
Excision du spot

digestion, extraction des peptides

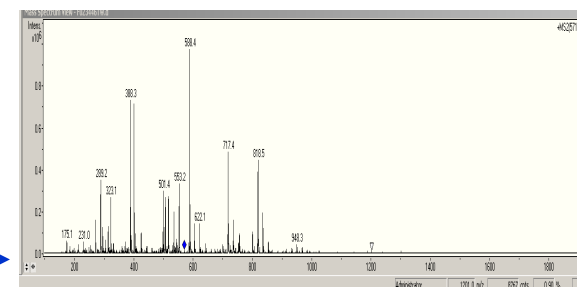
Analyses LC-MS/MS



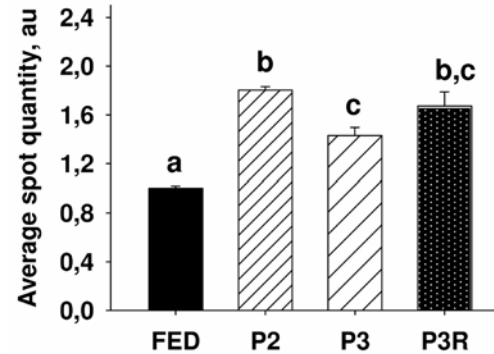
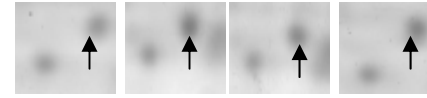
Séparation chromatographique (LC)



Acquisition MS et sélection des ions à fragmenter



Spectre de fragmentation d'un ion sélectionné



Pyruvate dehydrogenase kinase
isozyme 4

- Identification de voies métaboliques affectées dans le jeûne prolongé : métabolisme des glucides, production et conversion de l'énergie

VENEZ NOUS VOIR SI ...

Vous voulez faire de l'analyse de protéines
par masse ?



Vous voulez faire des gels 1D et 2D de
protéines?



Danièle Thiersé et Chrystel Husser pourront
vous aider

Mesure de masse ?
MALDI-MS, GC-MS, ESI-MS, LC-MS



Venez voir Jean-Marc Strub et Christine Schaeffer