

# ED 9 : protéomique

Constance Delaby  
Caroline Kannengiesser

Décembre 2007

Faculté de médecine X. Bichat-PCEM2

# Plan général de l'ED

- Généralités

- Stratégies d'identification d'une protéine,  
Les méthodes

- Exercices

- Avantages et limites des méthodes

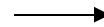
# Génomique & Protéomique

- **Génomique** : **ADNg** : Relativement constant
    - mutations somatiques (réparation), recombinaison V-D-J dans lymphocytes...)
    - environ 30 000 gènes Homme
  - **Protéomique** : monde dynamique
    - molécules hétérogènes
    - variabilité pour un gène donné
    - > 500 000 protéines Homme
- Grande diversité protéique :
- séquence
  - modifications pré, co et post -traductionnelles
  - repliement
  - assemblage : complexes de 2 à 80 partenaires

# Expression d'un gène

## Génome

constant dans toutes les  
cellules d'un organisme  
(sauf évènements somatiques)



## taux d'ARNm :

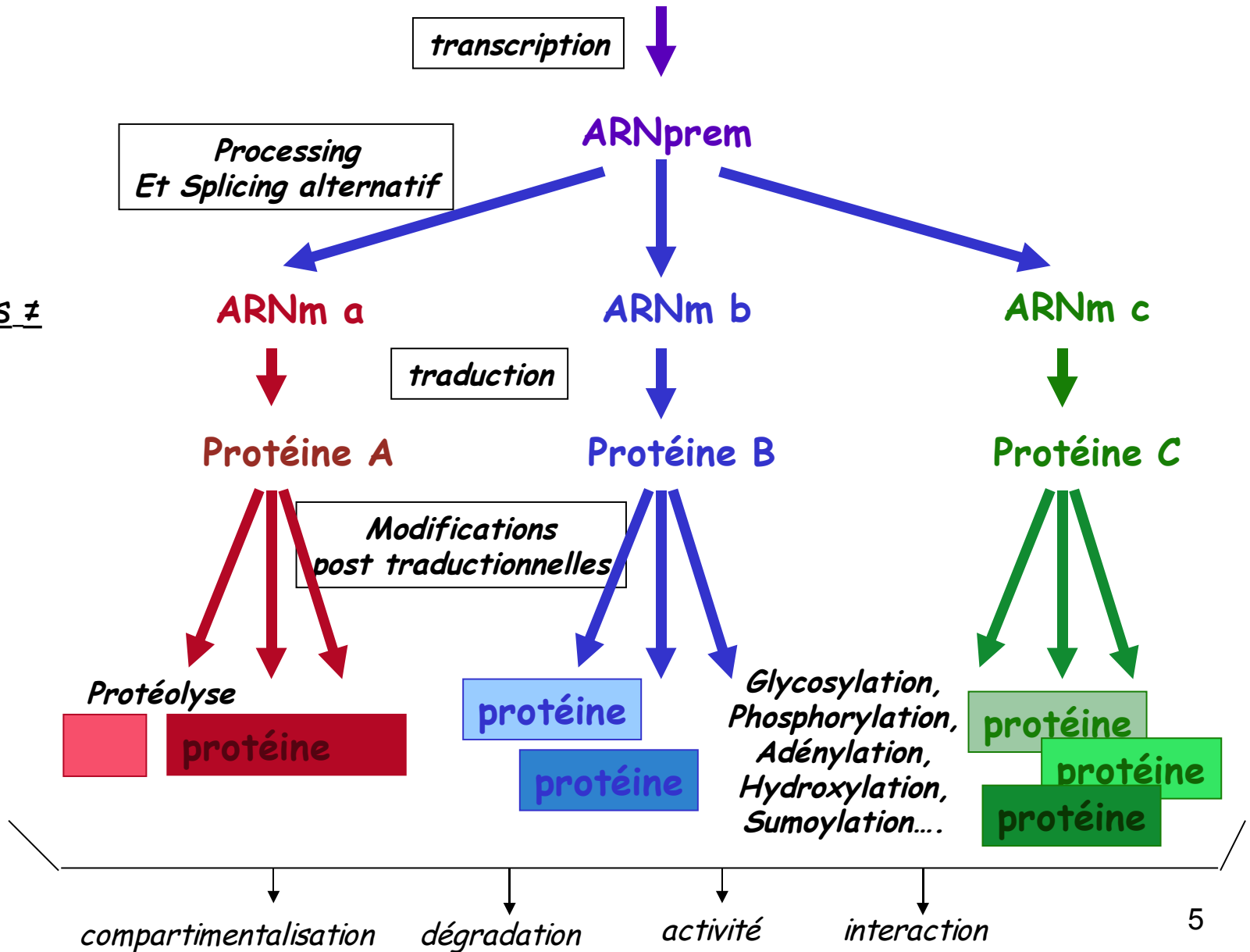
N'informe pas sur degré  
d'expression/activité des  
protéines dans une cellule



## Protéome : dynamique

- varie au cours du développement
- varie d'un type cellulaire à l'autre (spécificité tissulaire)
- varie selon état physiologique vs pathologique

# ADN génomique



Isoformes ≠

# Analyse du protéome au cours du développement

## 1 GENOME



**PROTEOME 1**  
Éclosion des oeufs



**PROTEOME 2**  
chenille



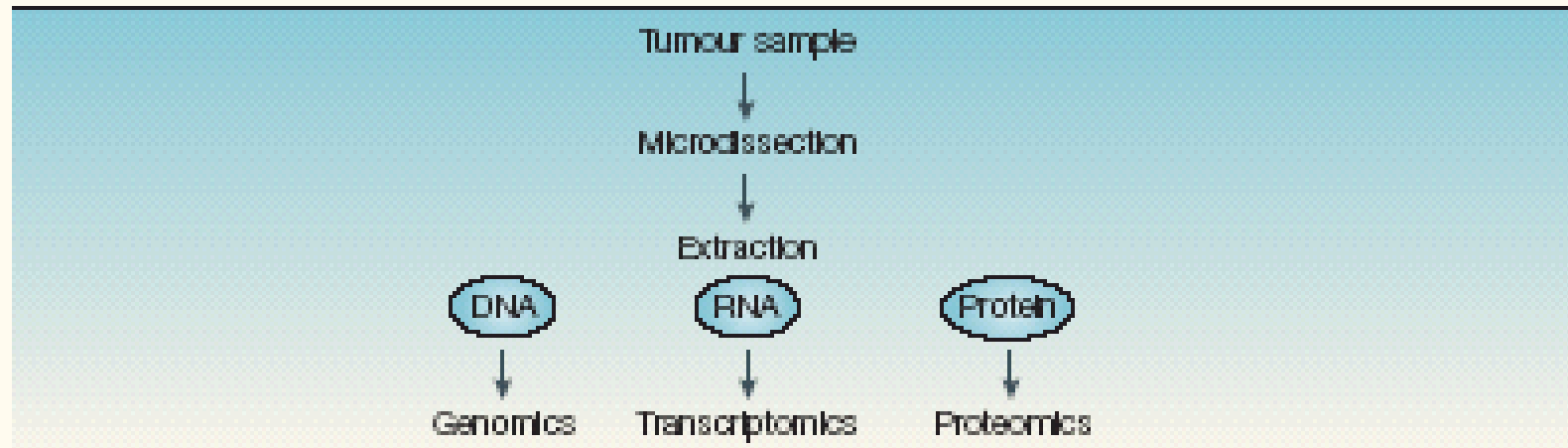
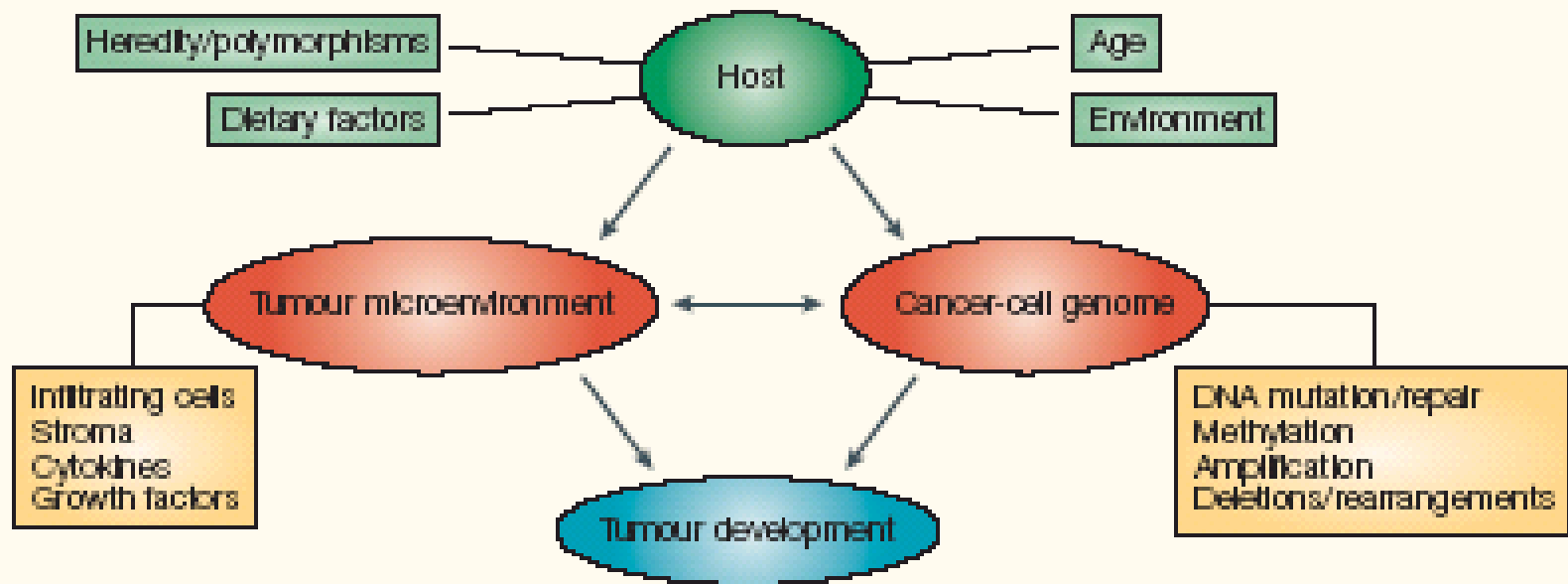
**PROTEOME 3**  
chrysalide



**PROTEOME 4**  
papillon

développement

# Bases moléculaires des cancers



# La protéomique

= l'étude du protéome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines constituant

- un compartiment cellulaire (ex: les protéines nucléaires),
- une cellule,
- un tissu
- ou un organisme vivant entier...

-permet notamment :

- la recherche et l'identification systématique de l'ensemble des protéines constituant un organisme, un tissu...
- l'identification des protéines constituant un complexe protéique (interactions protéines-protéines)
- la recherche et l'identification de protéines impliquées dans des voies de signalisation par exemple par une analyse différentielle (sauvage/mutant).



# Stratégies d'identification d'une protéine

- **1 Méthodes séparatives :**
  - a) chromatographie bidimensionnelle
  - b) électrophorèse bidimensionnelle
- **2 Méthodes de purification :** chromatographie d'affinité
- **3 Méthodes d'identification :**
  - a) MALDI-TOF
  - b) ESI
- **4 Autres approches :** SELDI-TOF

# Stratégies d'identification d'une protéine

- 1 Méthodes séparatives :
  - • a) chromatographie bidimensionnelle
  - b) électrophorèse bidimensionnelle (E2D)
- 2 Méthodes de purification : chromatographie d'affinité
- 3 Méthodes d'identification :
  - MALDI-TOF
  - ESI
- 4 Autres approches : SELDI-TOF

# 1 a) méthodes séparatives : chromatographie bidimensionnelle des protéines : 2D-LC

## 2 dimensions

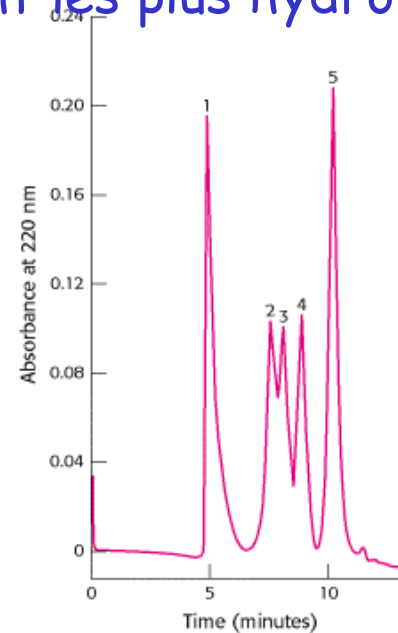
- 1ère dimension : chromatofocalisation
  - équilibration de la colonne avec un tampon basique
  - injection de l'échantillon
  - injection de tampons de plus en plus acide
  - les protéines les plus basiques éluées en premier car non retenues
- Elution progressive des protéines en fonction de leur  $pH_i$  (gradient de pH linéaire dans la colonne)
- Etape très résolutive, très reproductible

# 1 a) méthodes séparatives : chromatographie bidimensionnelle des protéines : 2D-LC

- 2ème dimension : chromatographie en phase inverse HPLC
  - injection dans la colonne des protéines récupérées de la première dimension
  - équilibration de la colonne avec H<sub>2</sub>O
  - gradient H<sub>2</sub>O-acéto-nitrile (éluant de plus en plus hydrophobe)
  - les protéines récupérées en premier sont les plus hydrophiles

→ Elution en fonction de l'hydrophobicité

• Très résolutif, rapide



## Stryer Figure 4.6. High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC).

(1) thyroglobulin (669 kd), (2) catalase (232 kd), (3) bovine serum albumin (67 kd), (4) ovalbumin (43 kd), and (5) ribonuclease (13.4 kd).

# Stratégies d'identification d'une protéine

- 1 Méthodes séparatives :



- a) chromatographie bidimensionnelle
- b) électrophorèse bidimensionnelle

- 2 Méthodes de purification : chromatographie d'affinité

- 3 Méthodes d'identification :

- a) MALDI-TOF
- b) ESI

- 4 Autres approches : SELDI-TOF

# 1 b) Les méthodes séparatives : E2D

- Aspect quantitatif
  - Méthode la plus fiable pour étudier
    - l'abondance
    - les modifications post-traductionnelles
  - Différentes étapes :
    - Préparation des échantillons
    - Focalisation isoélectrique
    - SDS-Page
    - Coloration des gels
- } 2 dimensions

# 1 b) Electrophorèse bidimensionnelle : E2D

- **Préparation des échantillons**

- rompre les interactions entre molécules :  
libération des polypeptides individualisés et solubilisés
- ne pas modifier les chaînes polypeptidiques libérées :  
inhibiteur des phosphatases, protéases, glycosidases
- éliminer les sels
- maintenir les protéines sous forme soluble

# 1 b) Electrophorèse bidimensionnelle : E2D

2 dimensions en 2 temps :

- 1ère dimension: Focalisation isoélectrique:

- vitesse de migration des protéines dans un champ électrique proportionnelle à la charge

- charge protéique proportionnelle à la  $\neq$  entre le pH du milieu et le pI de la protéine

→ gradient continu de pH

Ampholytes

(poly-électrolytes ionisables chargés + ou -)



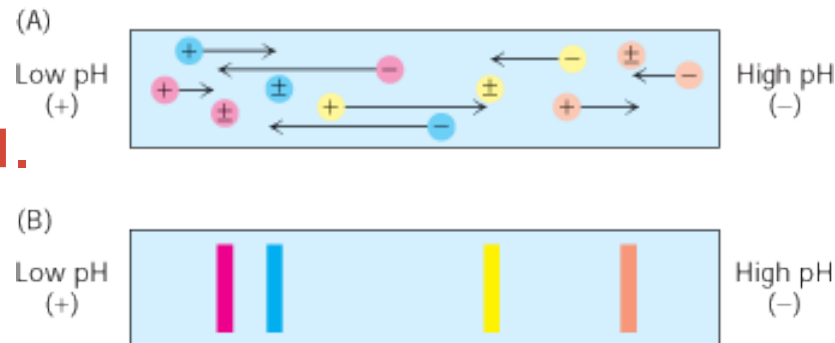
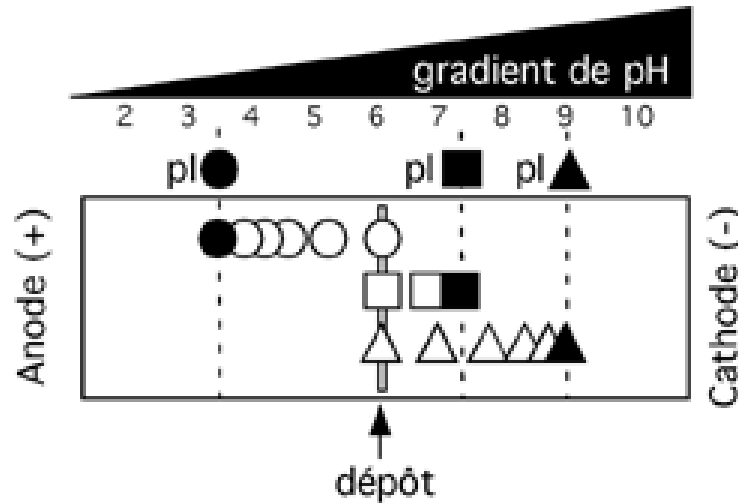
Champ électrique

(borné : acide fort à l'anode, base forte à la cathode)



# 1 b) Electrophorèse bidimensionnelle : E2D

- 1ère dimension: Focalisation isoélectrique:

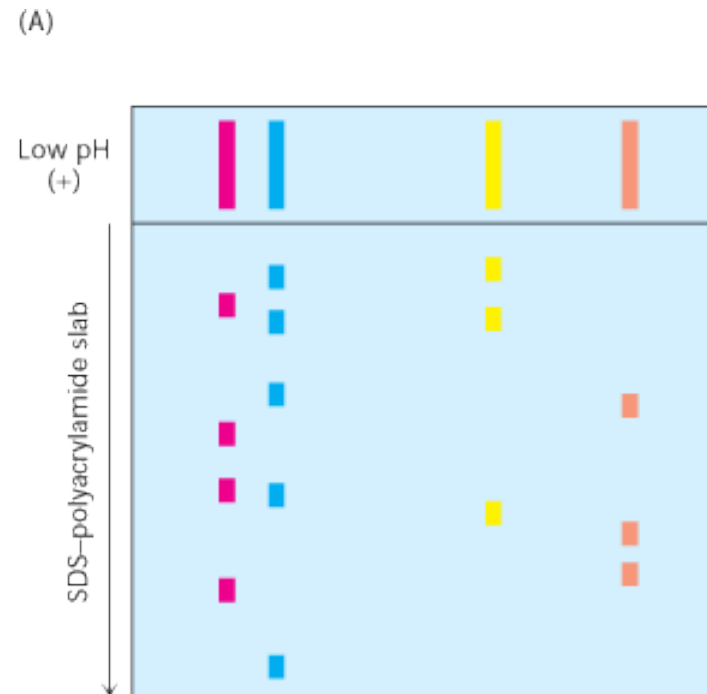


STRYER Figure 4.11.

# 1 b) Electrophorèse bidimensionnelle : E2D

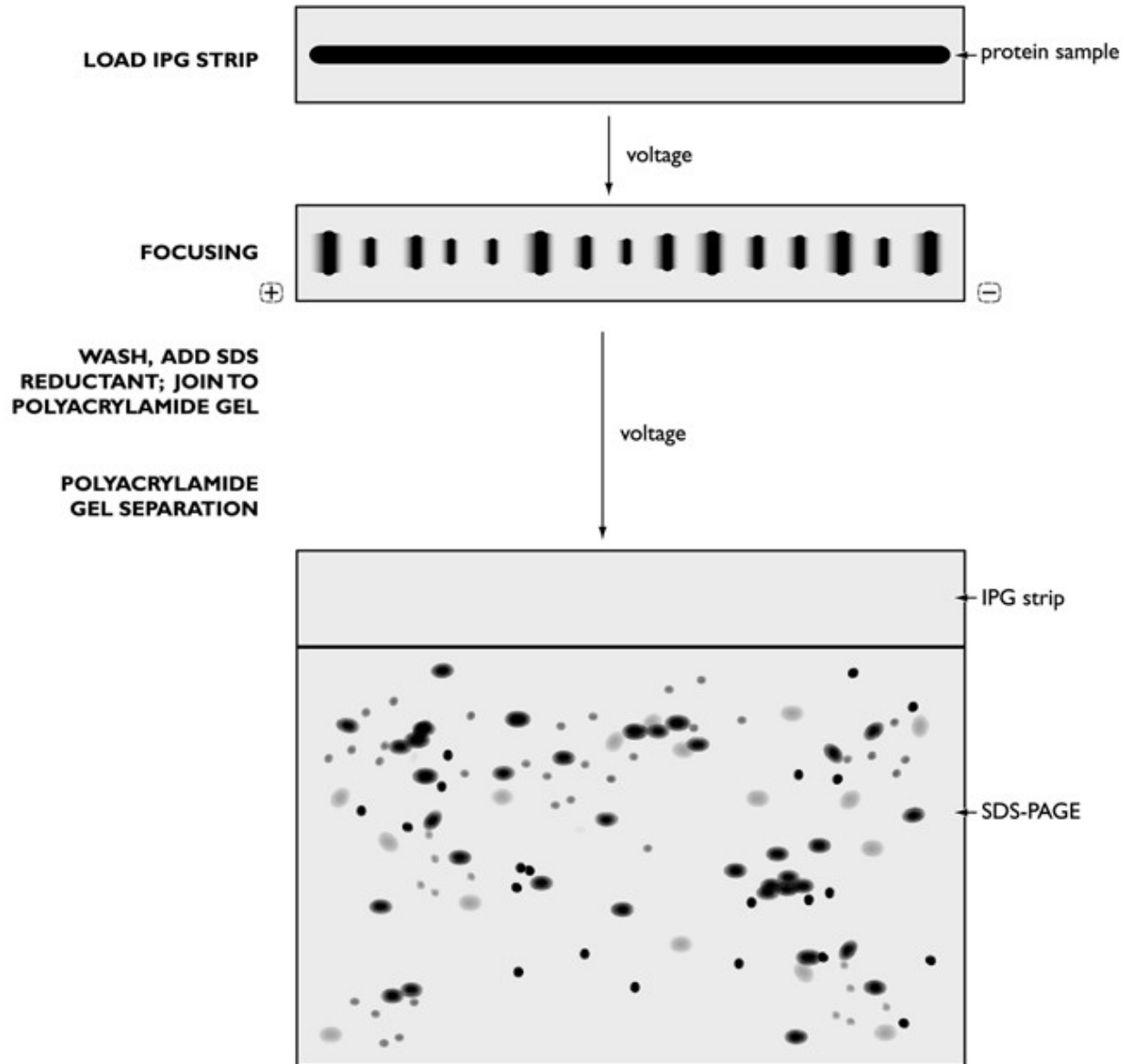
- 2ème dimension : SDS - Page

STRYER Figure 4.12.



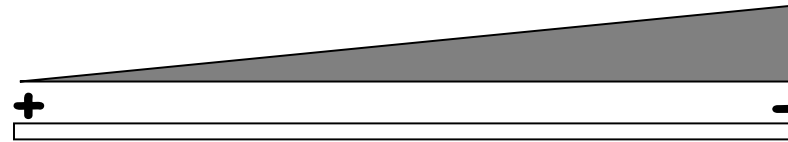
- Coloration des gels (bleu de coumassie, nitrate d'Ag, fluorescence) 18

# 1 b) Electrophorèse bidimensionnelle : E2D



# 1 b) Electrophorèse bidimensionnelle : E2D

## Focalisation isoélectrique



Gradient continu de pH immobilisé



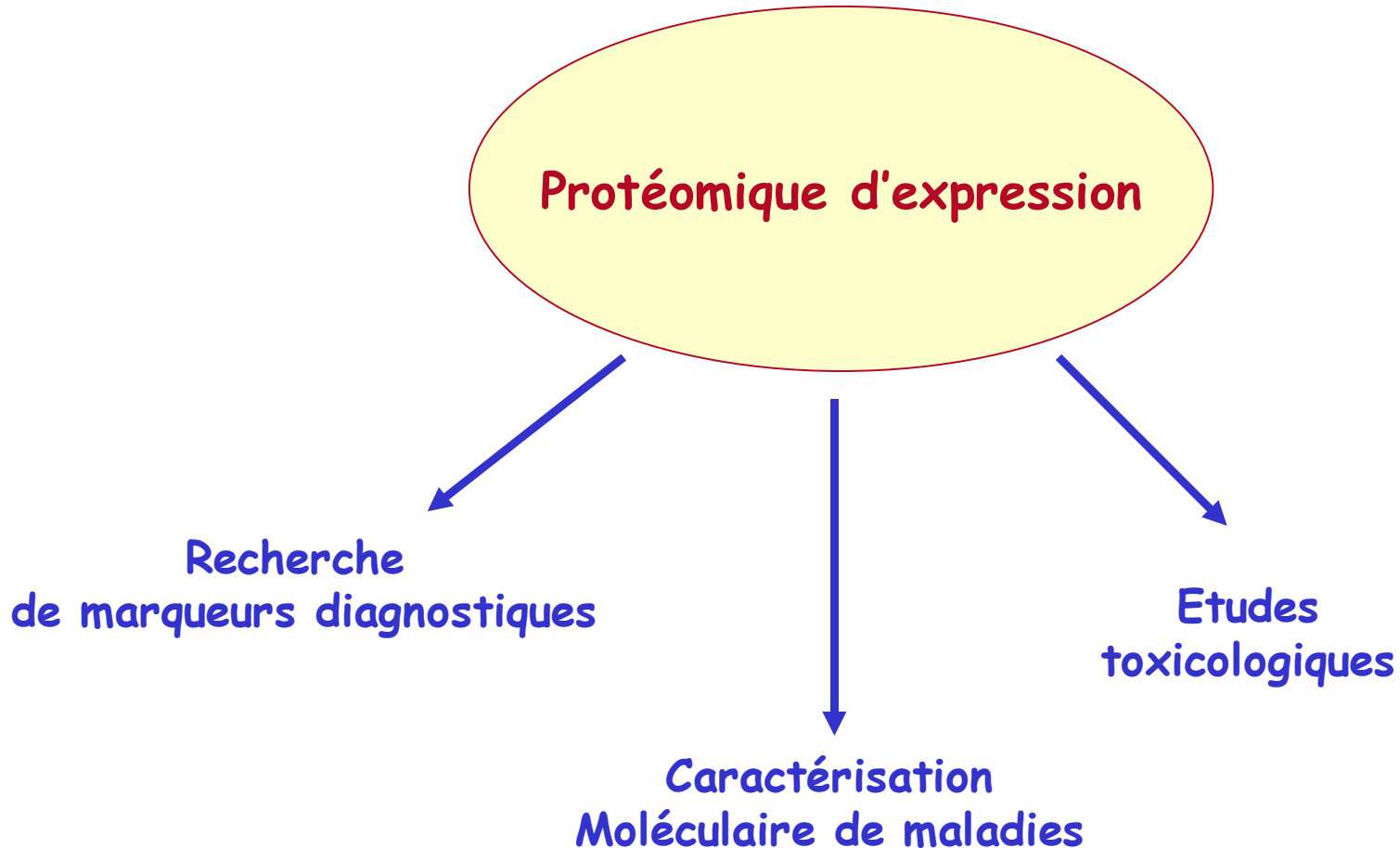
SDS - Page



Coloration au nitrate d'Ag

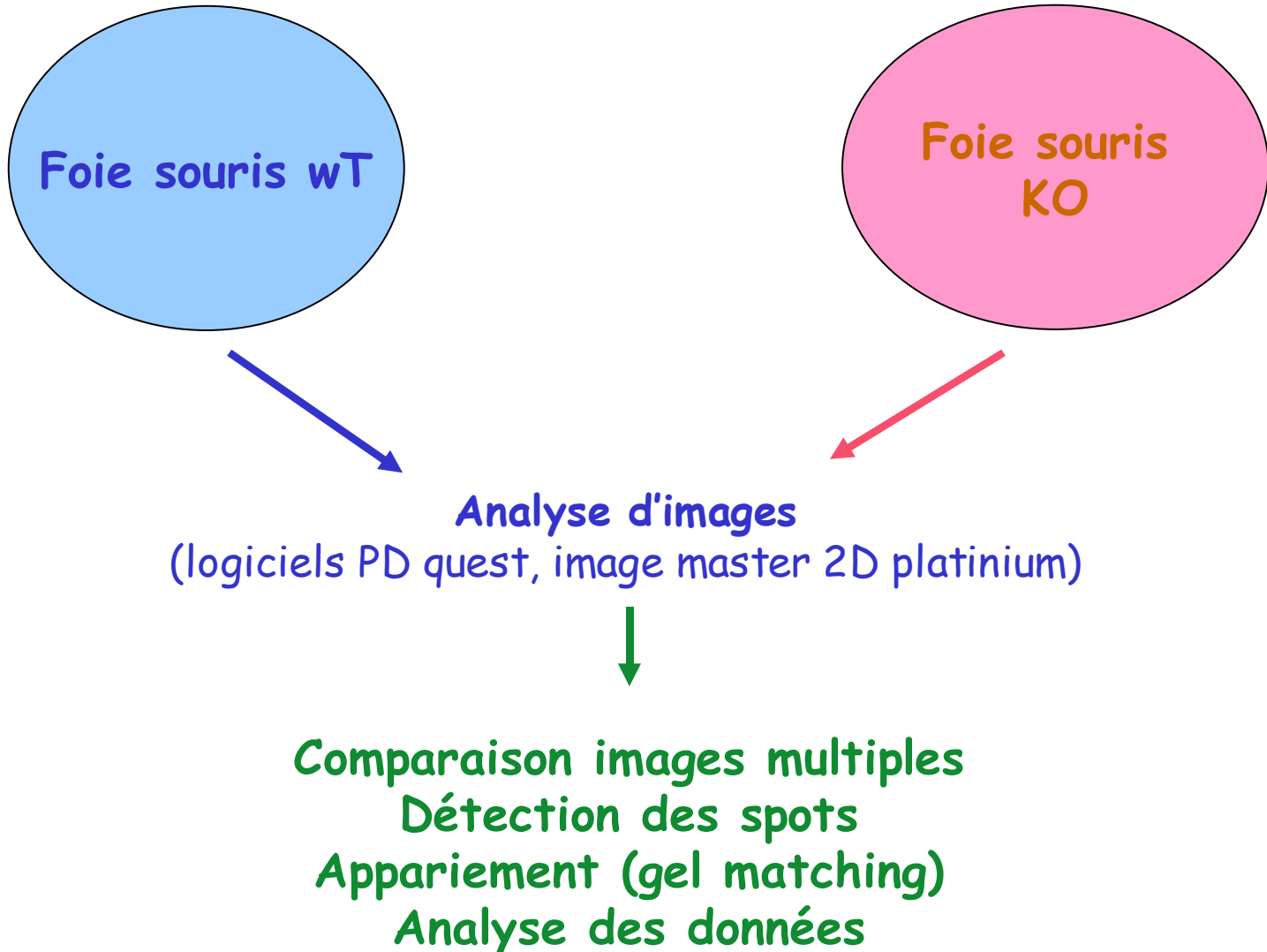
# 1 b) Electrophorèse bidimensionnelle : E2D

## Exemples d'applications

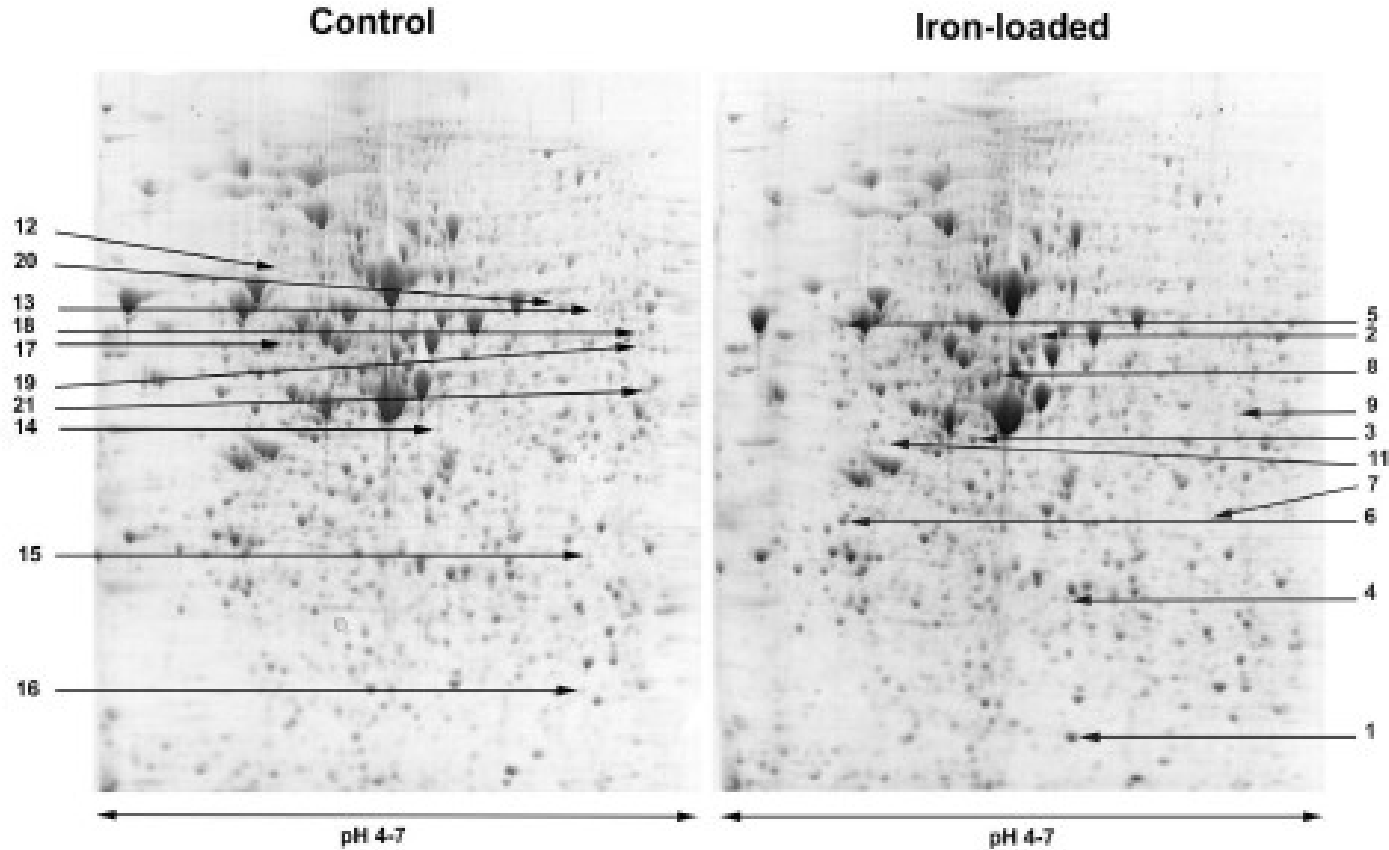


# 1 b) Electrophorèse bidimensionnelle : E2D

## Protéomique d'expression



# 1 b) Electrophorèse bidimensionnelle : E2D



Petrak J et al,  
Proteomic analysis of iron overload in human hepatoma cells.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006

# 1 b) Electrophorèse bidimensionnelle : E2D

## Identification des protéines séparées

- découpage des **spots d'intérêt**
- **digestion protéique** (trypsine) : peptides
- **identification** des peptides par **spectrométrie de masse**
  - bases de données
  - comparaison de séquence
- **vérification**



# 1 b) Electrophorèse bidimensionnelle : E2D

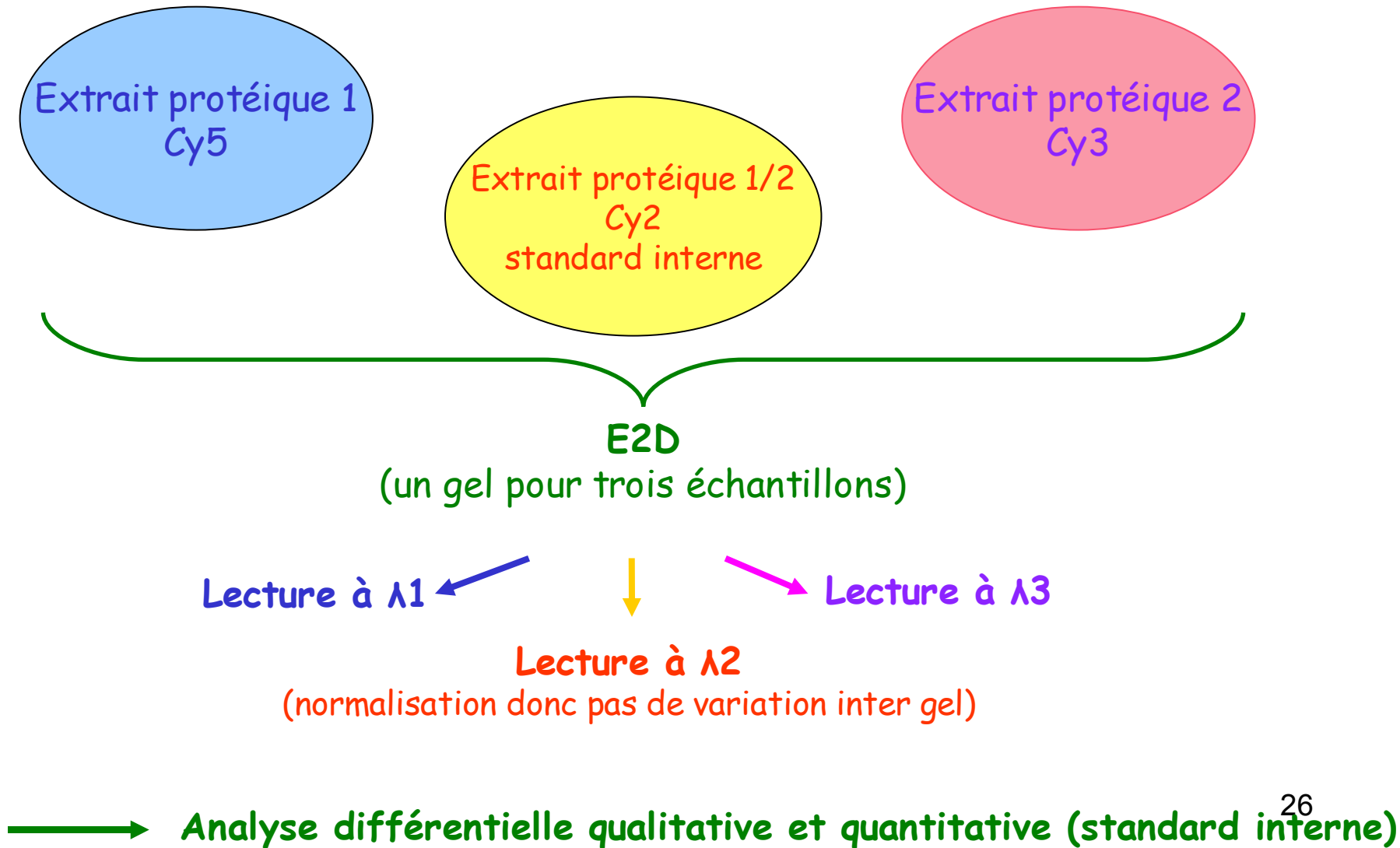
## 2D-DIGE : E2D différentielle en fluorescence

- liaison de cyanine (Cy2, Cy3, Cy5) sur les résidus Lysine

- liaison sur fonction amine des Lys
- faible PM des cyanine
- pas de modification de la charge des protéines
- spectres de fluorescence différents

# 1 b) Electrophorèse bidimensionnelle : E2D

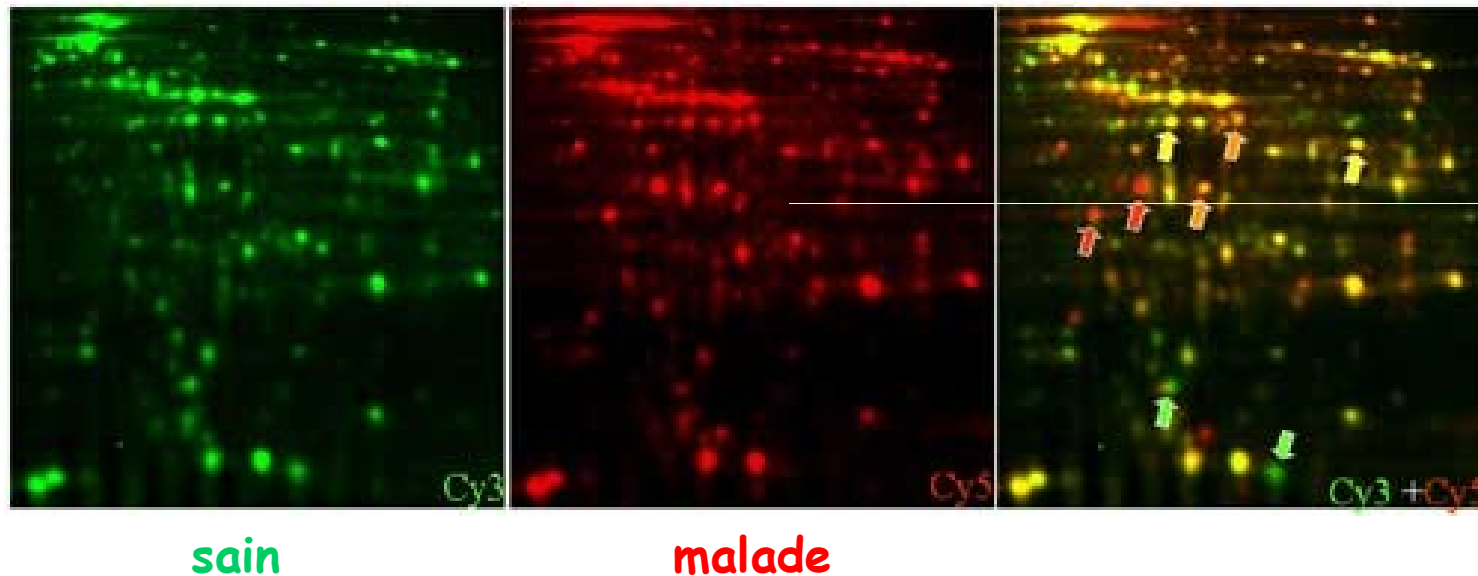
## 2D-DIGE : E2D différentielle en fluorescence



# 1 b) Electrophorèse bidimensionnelle : E2D

## 2D-DIGE : E2D différentielle en fluorescence

### Exemple



→ L'analyse d'images d'un gel DIGE plus aisée  
car migration des 3 échantillons sur le même gel

# Avantages et limites des méthodes

## Chromatographie bidimensionnelle des protéines 2D-LC

(+) méthode non destructive, les protéines sont intactes

(+) reproductibilité

(+) interface avec la spectrométrie de masse

(-) coûteux

(-) compatibilité avec spectrométrie de masse limitée en fonction des détergents utilisés

# Avantages et limites des méthodes

## E2D

- **Résolution et séparation**

- (+) on peut voir les phosphorylations, glycosylations (car focalisation)

- (-) la densité des spots doit rester raisonnable

- **Gamme dynamique quantitative**

- (-) concentrer les échantillons au max

- **Spectre d'analyse**

- (-) protéines très basiques / haut PM sont difficiles à voir

- **Reproductibilité**

- (-) variabilités techniques et biologiques

# Stratégies d'identification d'une protéine

- 1 Méthodes séparatives :

- a) chromatographie bidimensionnelle
- b) électrophorèse bidimensionnelle

- • 2 Méthodes de purification : chromatographie d'affinité

- 3 Méthodes d'identification :

- a) MALDI-TOF
- b) ESI

- 4 Autres approches : SELDI-TOF

## 2 méthodes de purification : Purification de complexes par chromatographie d'affinité

- **Fonctionnalité des protéines**

- complexes protéiques
- fonctionnalité définie par l'association entre protéines

- **Stratégie classique**

- couplage ligand-résine
- adsorption molécule d'intérêt
- désorption molécule d'intérêt

# Stratégies d'identification d'une protéine

- 1 Méthodes séparatives :
  - a) chromatographie bidimensionnelle
  - b) électrophorèse bidimensionnelle
- 2 Méthodes de purification : chromatographie d'affinité
- 3 Méthodes d'identification :
  - • a) MALDI-TOF
  - b) ESI
- 4 Autres approches : SELDI-TOF



### 3 a) Méthodes d'identification : MS-MALDI

- MS : spectrométrie de masse :

**Principe** = mesurer la **masse molaire** de biomolécules en les séparant en fonction de leurs **rapports m/z** avec une grande **sensibilité** et une bonne **résolution**.

également possible de **fractionner les chaînes polypeptidique** au niveau des liaisons peptidiques ou au niveau des chaînes latérales pour obtenir des informations sur la séquence ou la composition en acides aminés.

**La structure d'un spectromètre de masse :**

- La **source d'ionisation** qui permet de produire des ions en phase gazeuse (de type **MALDI** ou **ESI**).
- L'**analyseur** qui permet de séparer les différents ions en fonction du **rapport m/z**.
- Le **détecteur** qui permet de convertir le courant ionique en courant électrique mesurable.

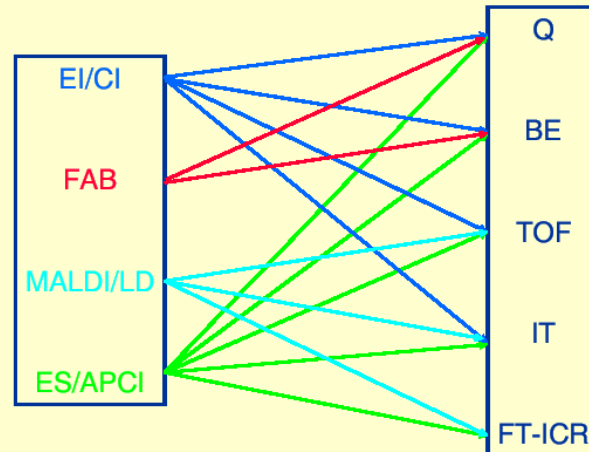
## Sources d'ionisation

Ionisation EI (Electronical Impact)	} Petites molécules volatiles et non thermosensibles
Ionisation CI (Chemical Ionisation)	
Ionisation FAB (Fast Atom Bombardment)	} molécules < 6000 Da
Ionisation LSI (Liquid Secondary Ion)	
Ionisation LD (Laser Desorption)	
Ionisation ES (electrospray)	} Biomolécules (1 300 kDa) et complexes non-covalents
Ionisation MALDI (Matrix Assited Laser Desorption Ionisation)	

## Analyseurs

Analyseurs	Résolution	Gamme m/z
Quadripôle (Q)	2 000	8 000
Magnétique (EB)	20 000	20 000
Temps de vol (TOF)	20 000	500 000
Trappe ionique	5 000	6 000
Cyclotron à résonance des ions (FT-ICR)	1 000 000	4 000

## Spectromètres de masse commerciaux



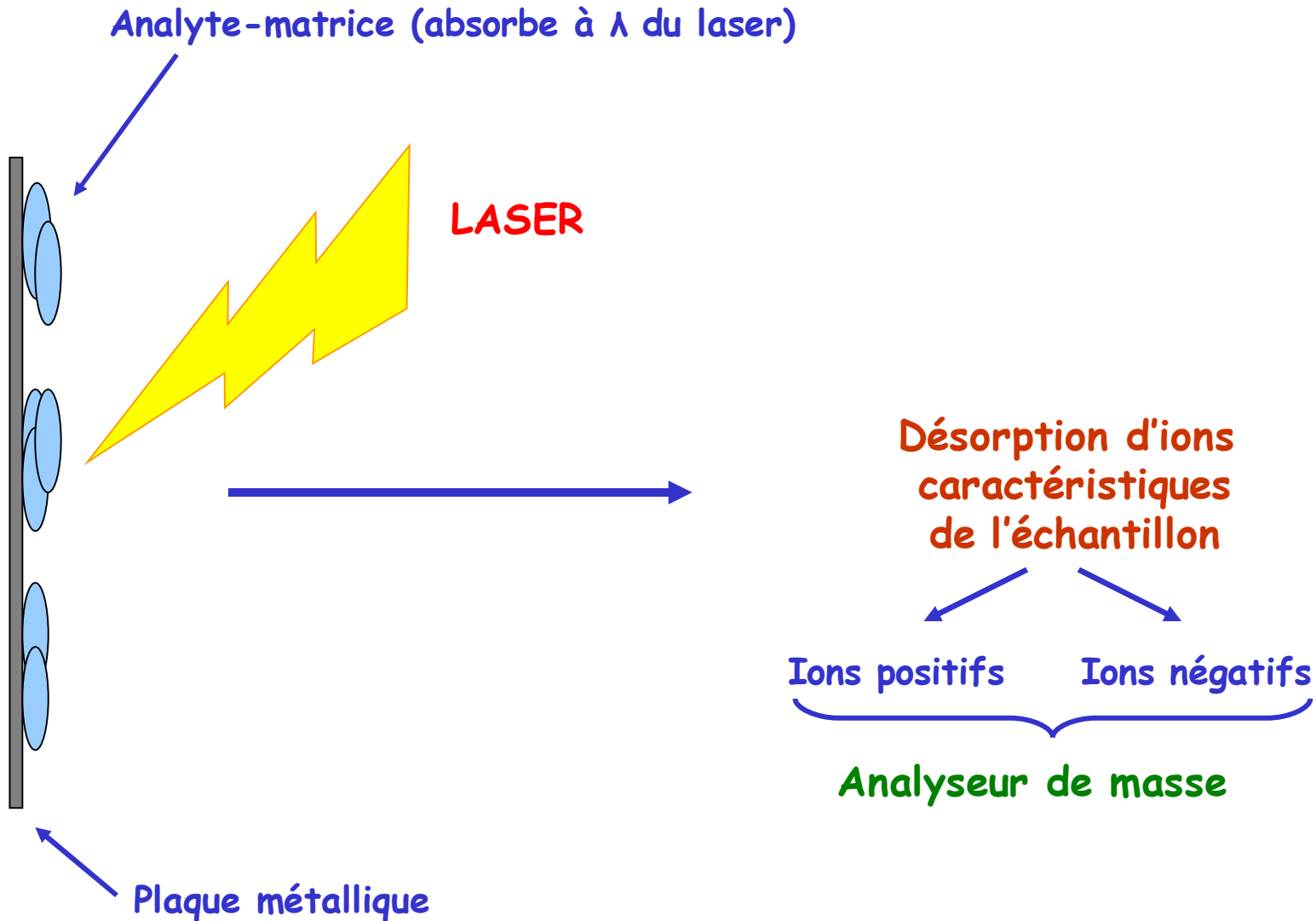
**Temps de vol a besoin d'une source d'ion pulsé. Au contraire, des analyseurs à stabilité de trajectoire de type quadripôle ou trappe ionique peuvent fonctionner en mode continu.**  
**un temps de vol est facilement compatible avec une source de type MALDI**  
**alors que les sources ESI sont compatible avec les analyseurs quadripole et trappe ionique**

### 3 a) Méthodes d'identification : MS-MALDI

- **MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation**
  - **échantillon-matrice fixé sur support solide**
  - **ionisation et désorption laser**
  - analyseur, séparation en fonction du rapport  $m/z$
  - détecteur
  - enregistrement
  - analyseur de masse

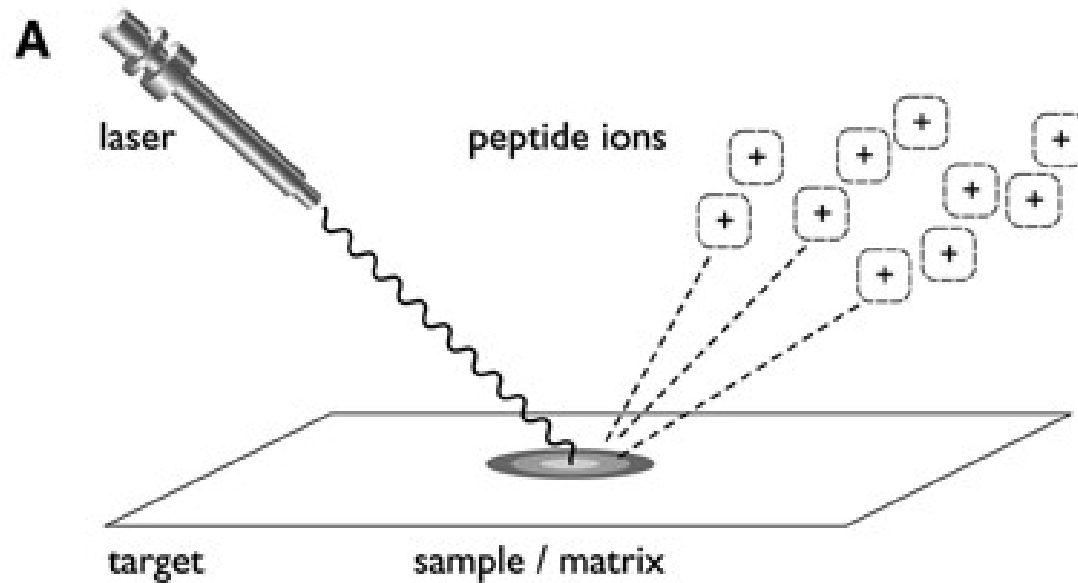
# 3 a) Méthodes d'identification : MS-MALDI

## Méthode d'ionisation : MALDI



### 3 a) Méthodes d'identification : MS-MALDI

Méthode d'ionisation : MALDI



Introduction to proteomics, Liebler

### 3 a) Méthodes d'identification : MS-MALDI L'analyseur temps de vol : T.O.F

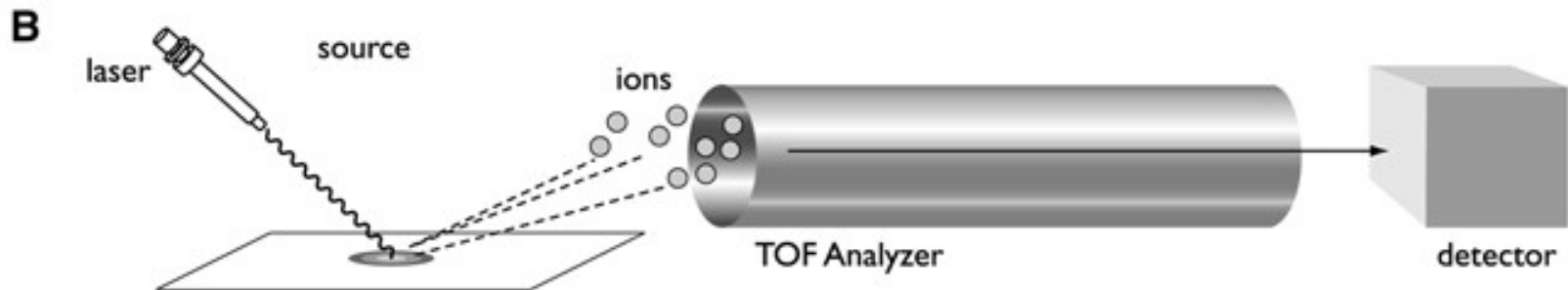
- Principe :

accélération des ions de masse différente à une énergie cinétique uniforme

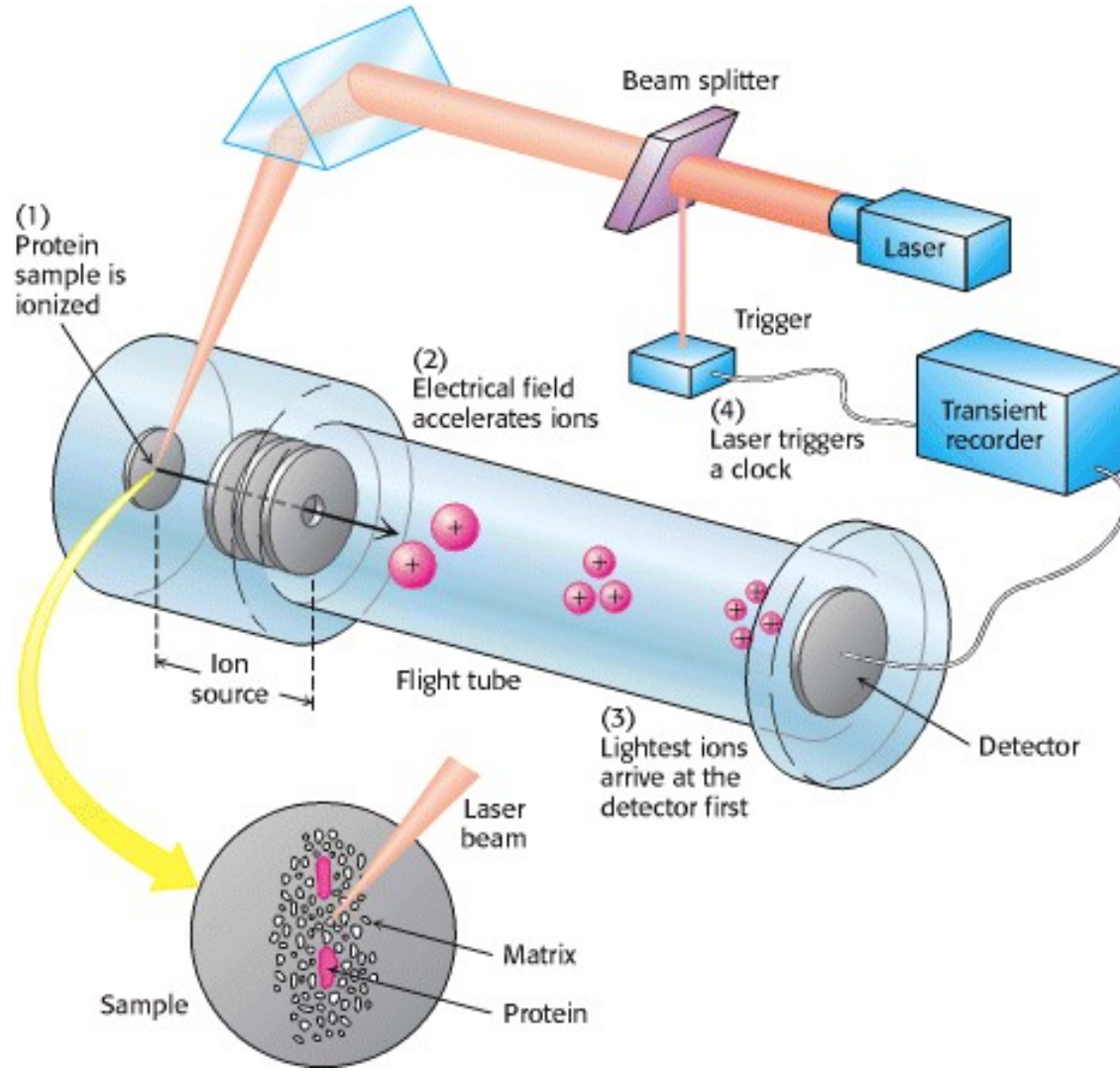
—————> Temps de vol différent pour parcourir une distance donnée

- Expulsion des ions de la source d'ionisation par paquets

—————> Accélération sous une différence de potentiel  $V_s$

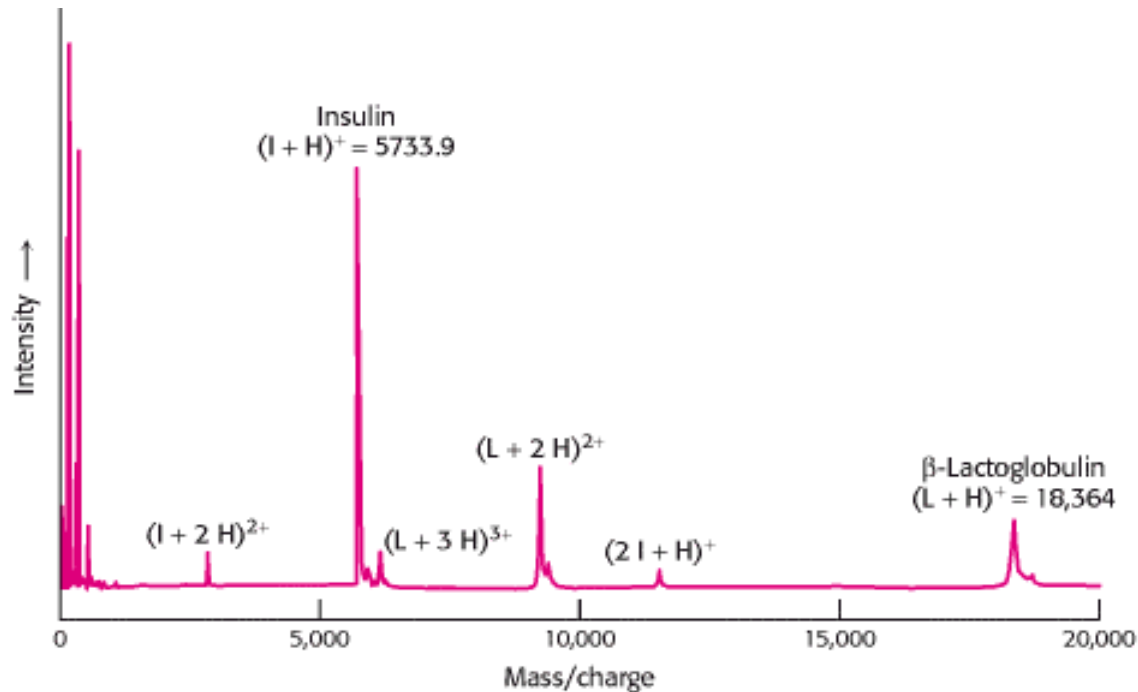


### 3 a) Méthodes d'identification : MS-MALDI



**STRYER Figure 4.16. MALDI-TOF Mass Spectrometry.** (1) The protein sample, embedded in an appropriate matrix, is ionized by the application of a laser beam. (2) An electrical field accelerates the ions formed through the flight tube toward the detector. (3) The lightest ions arrive first. (4) The ionizing laser pulse also triggers a clock that measures the time of flight (TOF) for the ions. [After J. T. Watson. *Introduction to Mass Spectrometry*, 3d ed. (Lippincott-Raven, 1997), p. 279.]

### 3 a) Méthodes d'identification : MS-MALDI



**STRYER Figure 4.17. MALDI-TOF Mass Spectrum of Insulin and β-lactoglobulin.** A mixture of 5 pmol each of insulin (I) and β-lactoglobulin (L) was ionized by MALDI, which produces predominately singly charged molecular ions from peptides and proteins (I + H<sup>+</sup> for insulin and L + H<sup>+</sup> for lactoglobulin). However, molecules with multiple charges as well as small quantities of a singly charged dimer of insulin, (2 I + H)<sup>+</sup>, also are produced. [After J. T. Watson, *Introduction to Mass Spectrometry*, 3d ed. (Lippincott-Raven, 1997), p. 282.]



## 3 b) Autre Méthode d'ionisation : ESI

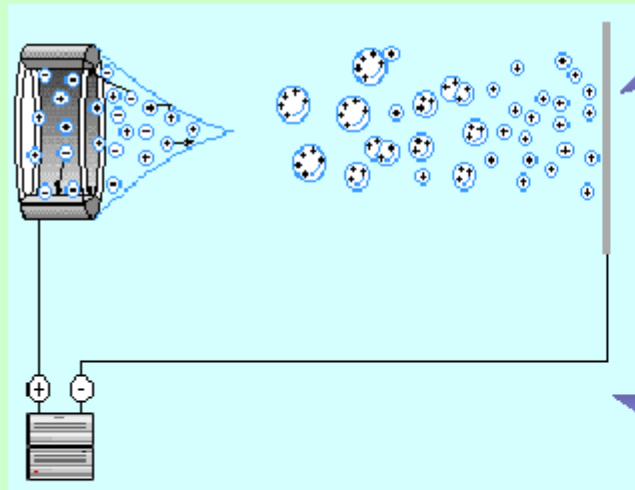
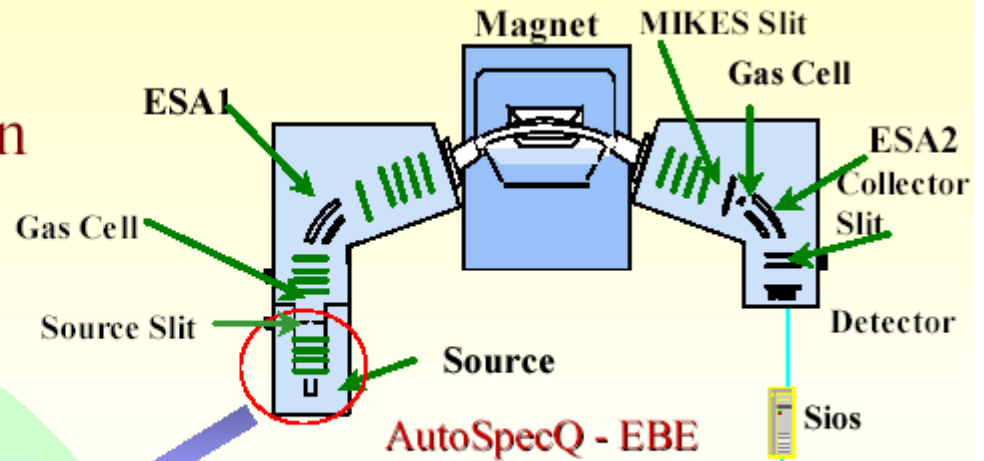
### • ElectroSpray ionization

= ionisation par électrospray

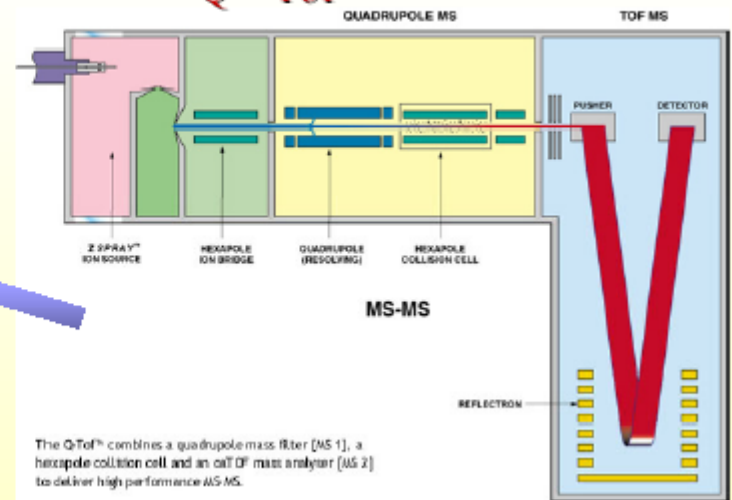
- échantillon en solution
- production de gouttelettes chargées à partir de l'analyte dissout en solution
- évaporation du solvant, diminution de la taille de la gouttelette
- désintégration des gouttelettes : micro-gouttelettes plus chargées
- ions désolvatés -> spectrométrie de masse

### 3 b) Autre Méthode d'ionisation : ESI

## Electrospray Ionisation



## Q - ToF



# Stratégies d'identification d'une protéine

- 1 Méthodes séparatives :

- a) chromatographie bidimensionnelle
- b) électrophorèse bidimensionnelle

- 2 Méthodes de purification : chromatographie d'affinité

- 3 Méthodes d'identification :

- a) MALDI-TOF
- b) ESI

 • 4 Autres approches : SELDI-TOF

## 4 Approche SELDI-TOF

- SELDI = Surface Enhanced Laser Desorption Ionization

support : surface d'échange chromatographique

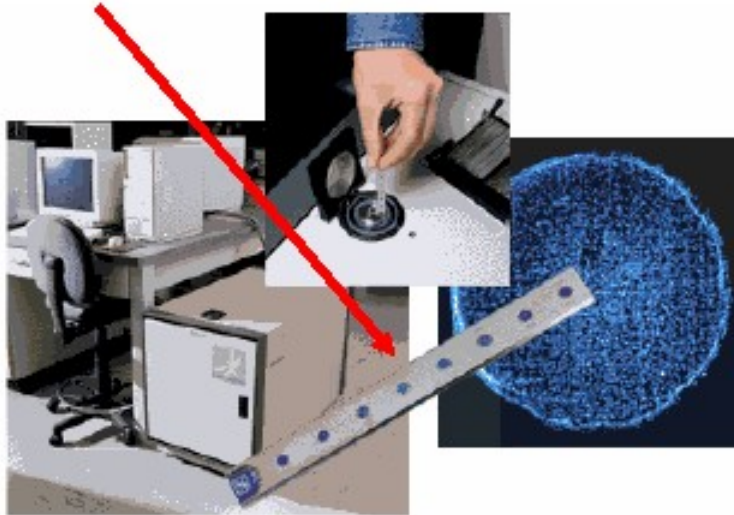
- reverse (molécule hydrophobes)
- molécules hydrophiles
- échange cationique (cations)
- échange anionique (anions)
- affinité (anticorps, ligand enzyme, ADN...)

————→ Choix de la barrette en fonction de l'analyse

# 4 Approche SELDI-TOF

## La plate forme ProteinChip®

### I. Séparation et capture des protéines : barrette ProteinChip®



### II. Détection des protéines : Lecteur ProteinChip® (SELDI-TOF-MS)



### III. Analyse des données : Logiciel ProteinChip®

D'après S Lehman, Montpellier

**Chip NP20**  
**Phase NORMALE**  
 Interactions électrostatiques

**Chip H50**  
**Phase REVERSE**  
 Interactions hydrophobes

**Chip IMAC-30**  
**Affinité ION METAL**  
 Affinité de la protéine pour l'ion métallique chélaté

**Chip WCX**  
**Echange de CATIONS**  
 Interactions électrostatiques (résidus +)

**Chip SAX**  
**Echange d'ANIONS**  
 Interactions électrostatiques (résidus -)

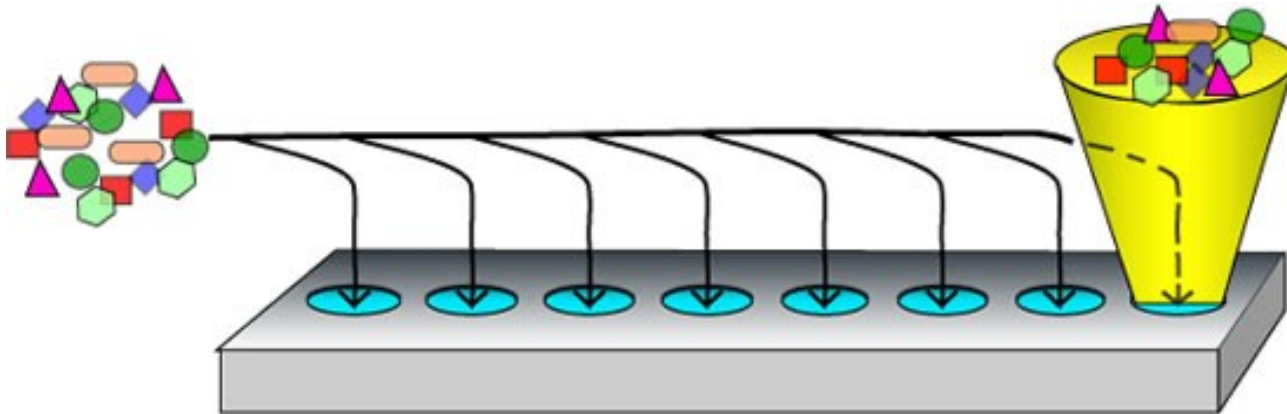
**Chip PS10**      **Chip PS20**  
**Surface PRE-ACTIVEE**  
**Liaison covalente par -NH2**

**Anticorps - Antigène**      **Récepteur - Ligand**      **ADN - Protéine**

D'après S Lehman, Montpellier

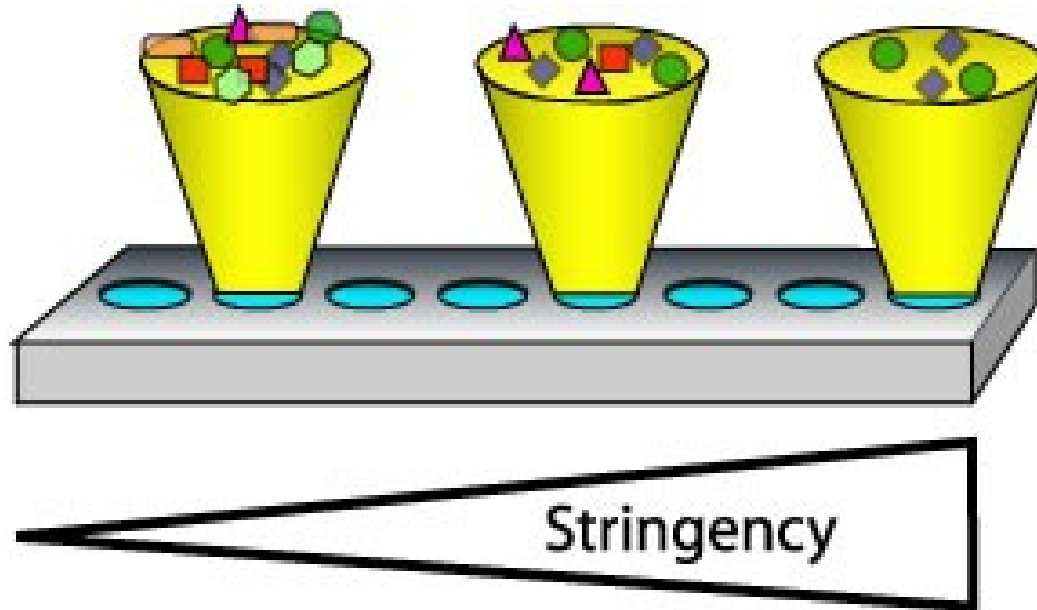
## 4 Approche SELDI-TOF

→ Dépôt des échantillons (sérum, extraits tissulaires)  
dans les puits



## 4 Approche SELDI-TOF

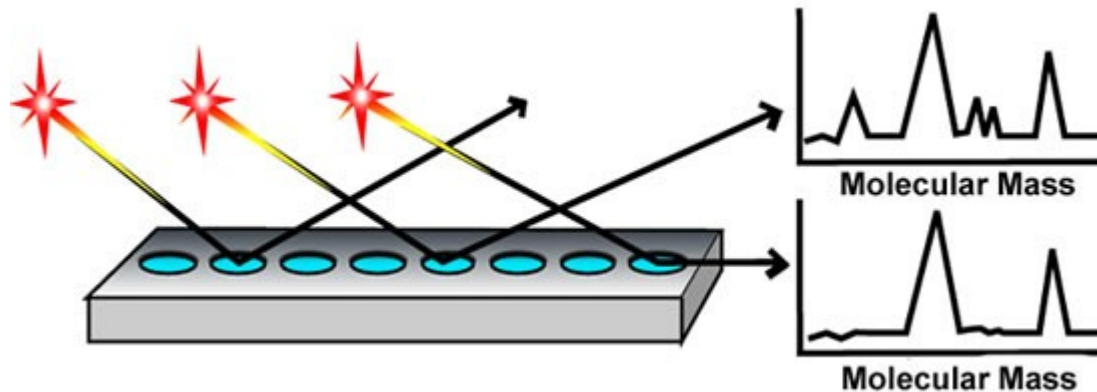
→ Lavages (stringence croissante pour éliminer le non spécifique)



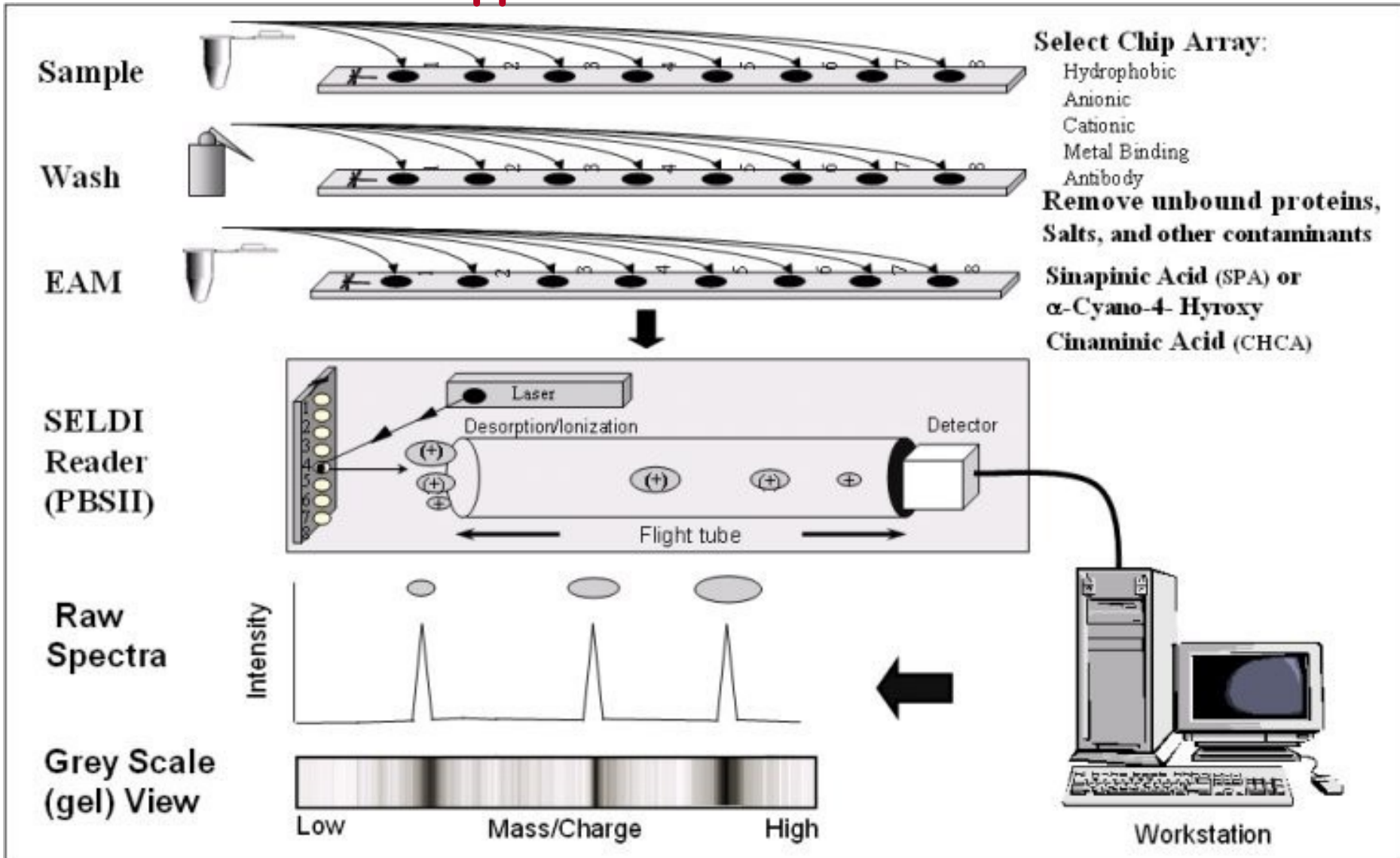


## 4 Approche SELDI-TOF

- Ajout d'EAM (energy absorbing molecules)  
Pour faciliter la désorption et l'ionisation dans le TOF-MS
- Désorption-Ionisation Laser
- Analyse spectrométrie de masse TOF



# 4 Approche SELDI-TOF



# Avantages et limites des méthodes

## SELDI

### (+) Résolution et sensibilité

- identification directe de partenaires si couplée à MS
- analyse simultanée d'une protéine dans diverses conditions

### (-) limites

- suppose une connaissance à priori des propriétés biochimiques des protéines étudiées
- reproductibilité (sensibilité)

# Identification des protéines

- **identification automatique : criblage des banques de données**
  - Comparer spectre de la protéine inconnue aux spectres virtuels de toutes les protéines de la banque
  - Spectre virtuel
    - digestion enzymatique *in silico*
    - Spectre de masse des fragments
- **ou : étape d'interprétation du spectre expérimental en aa**
  - séquence potentielle ensuite comparée aux séquences de la banque
  - logiciels d'analyse tolérants (insertion, substitution, délétion)

# exercices

# Applications des approches protéomiques

- Protéomique différentielle
- Identifications de marqueurs de maladies

Outil pour la protéomique clinique (ex SELDI TOF)

- détecter la maladie à un stade précoce ou la susceptibilité à la maladie

- Analyse des glycosylations
- Analyse des phosphorylations

# •Place de la bioinformatique et des mathématiques

•Ère post génomique, protéomique, métabolome

