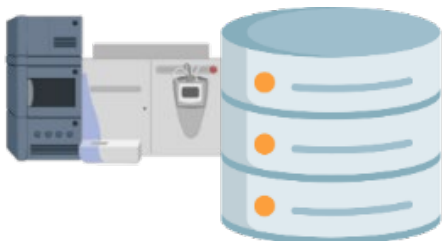


Introduction à la protéomique

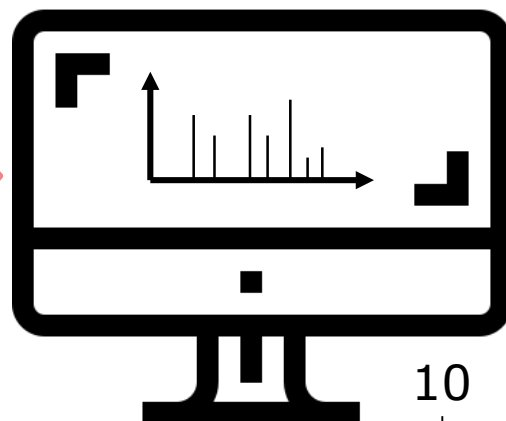
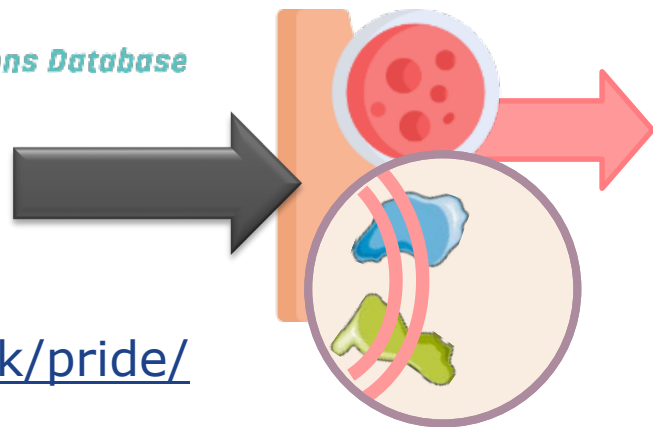
Rappels

Clef Moodle – S1OSB1 :

7rdz8x



<https://www.ebi.ac.uk/pride/>

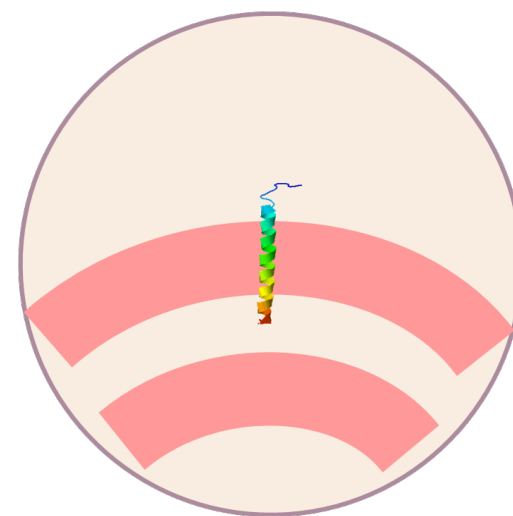
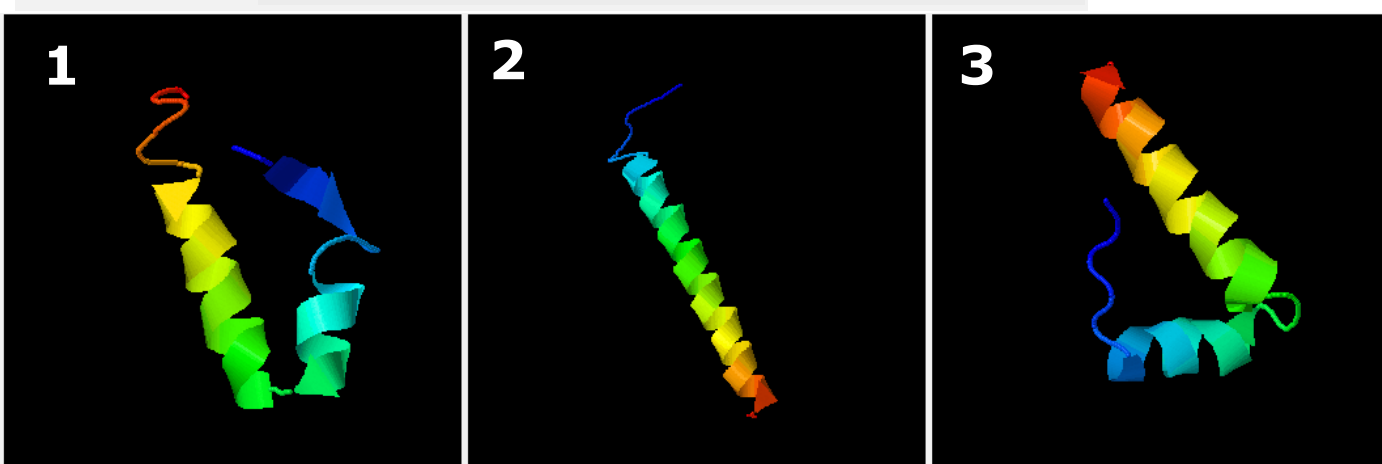


10 20 30
MVILNNHRLSTWAAEIGTTFFLMFQCIQTLFHAGNR

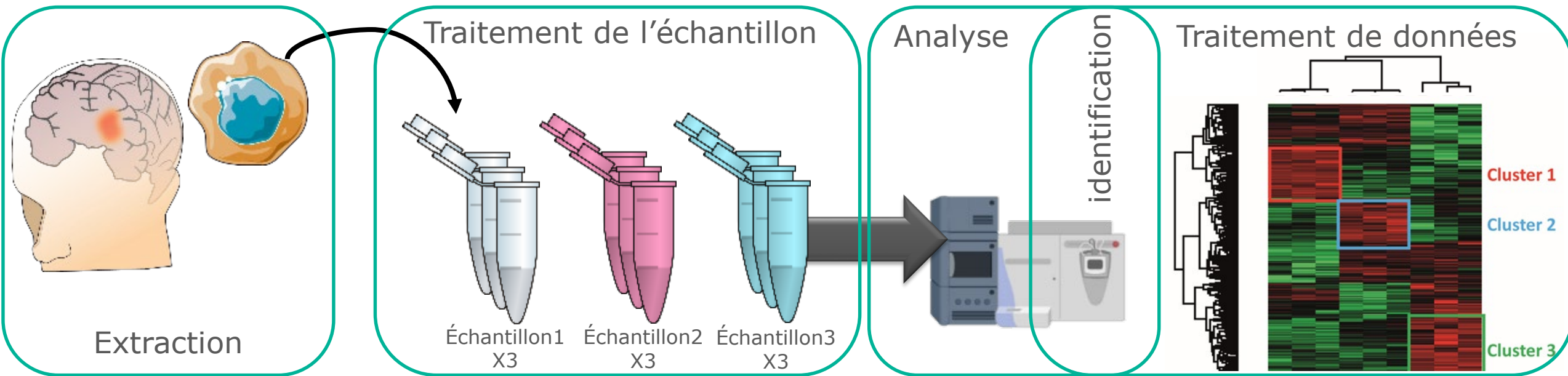
Quelle est la nature de cette enchainement d'A.A. ?

De quel niveau de structuration parle t'on ici ?

	20
Sequence	MVILNNHRLSTWAAEIGTTFFLMFQCIQTLFHAGNR
Prediction	CSSS CCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH CCCC
Conf.Score	96552632468999854399999999999999862489
	H:Helix; S:Strand; C:Coil



Les étapes pour la protéomique



- **Extraction des protéines et purifications**

extraction des protéines à partir de cellules, tissus ou organelles intracellulaires

- **Séparation des protéines**

électrophorèse en gel, chromatographie... Possible de ne pas en réaliser

- **Identification**

le plus souvent utilisation de la spectrométrie de masse

Préparation des échantillons biologiques

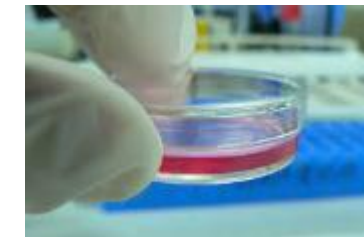
Prélèvement et conservation

Prélèvement des échantillons:

- *Conservation des caractéristiques biologiques et physiologiques*
- **Ne doit pas induire de biais** (contamination, modification des molécules...)
- *Possible maintient en « survie » ou mise en culture cellulaire.*
- **Temps** entre le prélèvement et l'utilisation ou la conservation

Origine des échantillons:

- **Informations** nécessaires sur le prélèvement et les conditions
- *Synchronisation des cellules ou état physiologique comparable*
- *Tout type d'échantillon biologique: Biopsie, fluide, culture cellulaire, plante, bactérie...*



Conservation

Conservation des échantillons:

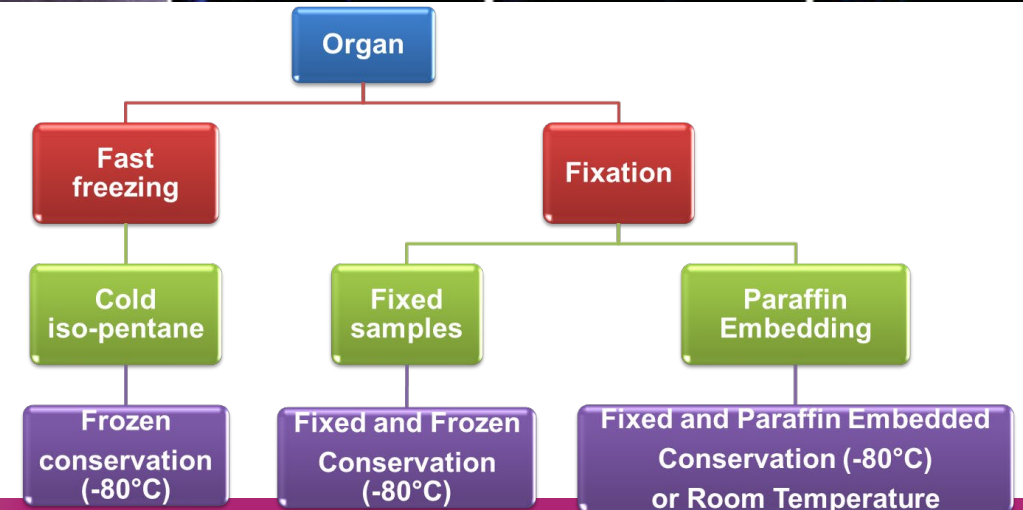
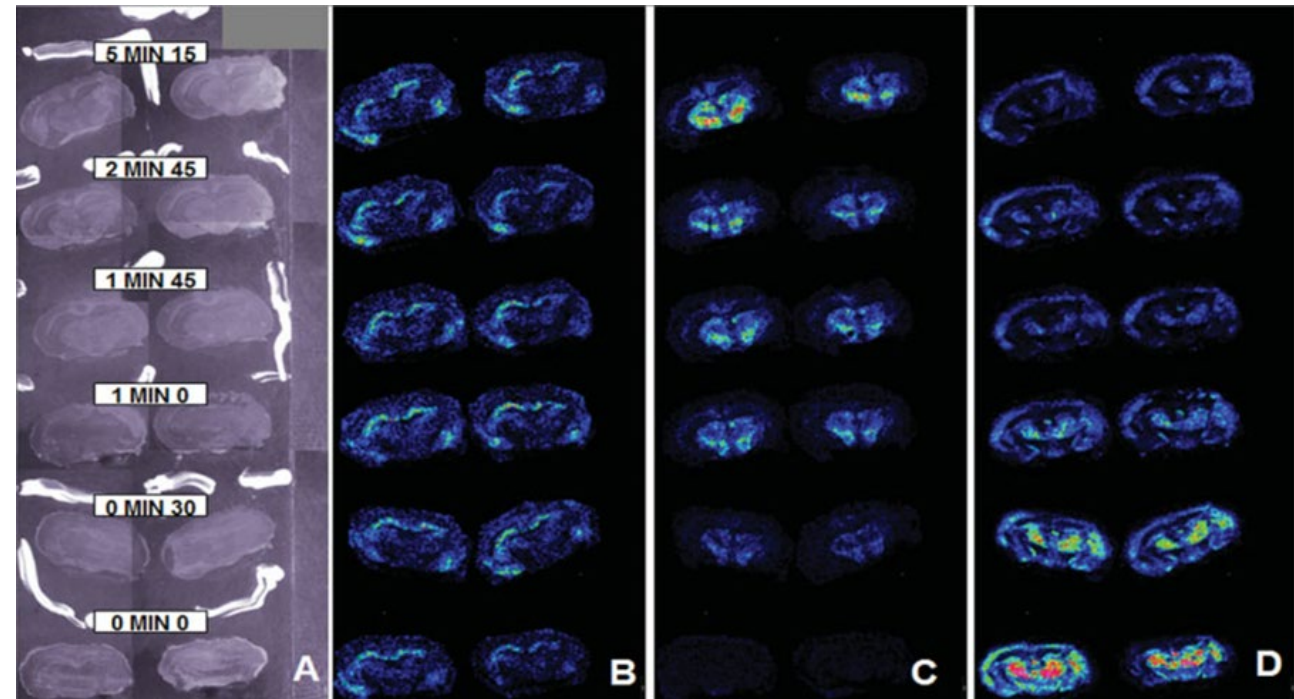
- **Temps et conditions** de conservation
- Mise en place de **stratégies de fixation**
- **En lien avec les analyses voulues** (conservation d'un état natif et fonctionnel par exemple)

Strategies de conservation:

Immobiliser les structures et éviter la dégradation par des enzymes (protéases, phosphatase...)

Fixation physique: congélation rapide, chaleur

Fixation chimique: Alcool, fixateurs (Paraformaldehyde...)



Stability Vs. Time?

Very high stability along the time

Congélation rapide

- **Evite la formation de cristaux de glace**
- Température inférieure à -25°C
- Possible d'utiliser un milieu cryoprotecteur
- Permet l'analyse de tout type de molécules
- **Dépend du type d'échantillon**



Pour les cellules et tissus:

Utilisation d'azote liquide (-196°C) ou d'isopentane refroidi (-45°C)

Conservation après congélation dans des cuves contenant de l'azote liquide ou congélateur à -80°C

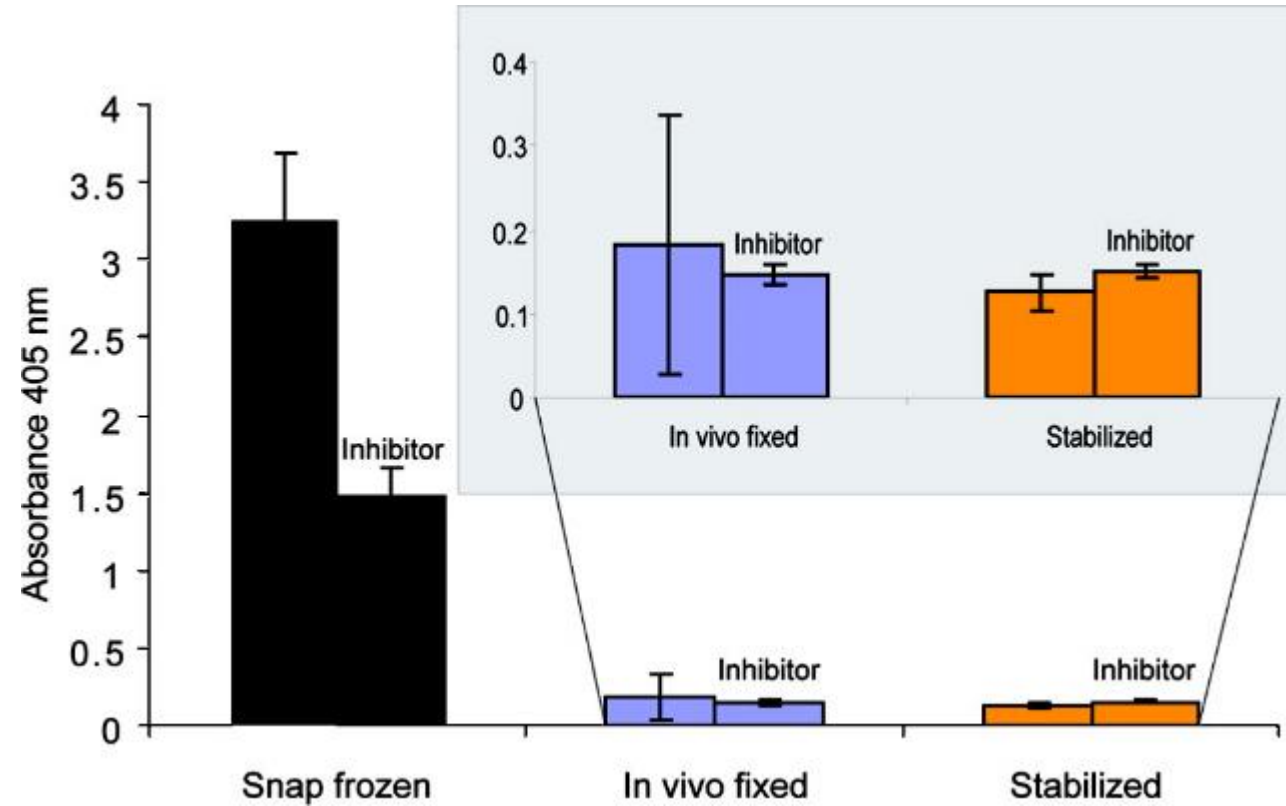


Stabilité dans le temps moyenne

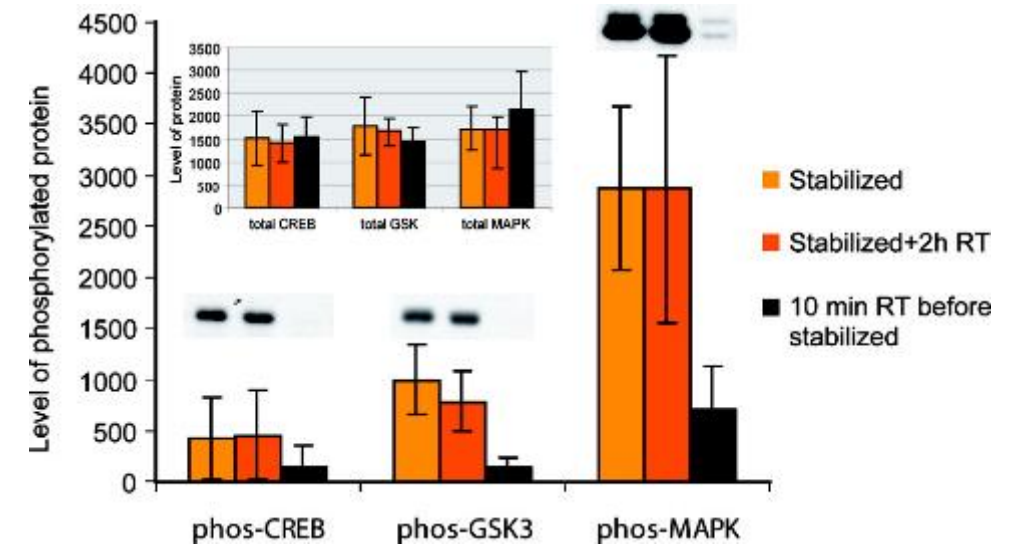
Liquide biologique:

Utilisation de stabilisant, inhibiteurs... peut augmenter délais avant congélation (24h) avec une conservation à TA

Stabilisation par la chaleur



Phosphatase activity in mouse occipital lobe cortex samples. The proteins were extracted in 1 × PBS from either snap-frozen tissue, or *in vivo* fixed or stabilized ($n = 5$). Presence of phosphatase and protease inhibitors in the extraction buffer is indicated over applicable columns.



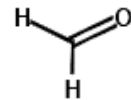
Levels of phosphorylated CREB, GSK and MAPK in mouse brain cortex determined by Western blotting ($n = 5$). Light orange bar samples were stabilized immediately postdissection; orange bar samples were stabilized immediately postdissection then left for 2 h at room temperature prior to homogenization, black bar samples were left 10 min postmortem before being stabilized. Representative Western blot images are inserted over corresponding columns together with a chart displaying the total levels of each tested protein.

Utilisation d'agents de fixation

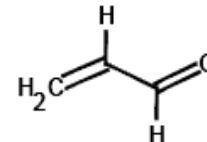
- Formation de **pontage entre les protéines**
- Fige le système biologique (**inactivation des enzymes**)
- **Non réversible**

Fixateur	Groupements réactifs							
	Amines -NH ₂	Hydroxyl -OH	Thiol -SH	Carboxyl -COOH	Protéines	Polysaccharides	Lipides C=C	Acides nucléiques
Chlorure mercurique		+	+	+	+			+
Tétroxyde d'osmium			+				+	
Aldéhydes	+				+			
Périodates						+		
Carbodiimides	+			+	+			
Acide tannique					+	+		
Diéthylpyrocarbonate	+			+	+			
Benzoquinone	+	+			+			

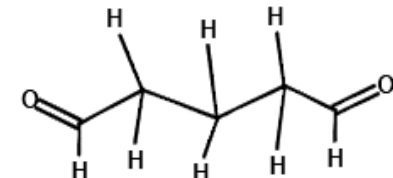
Aldéhydes



Formaldéhyde



Acroléine



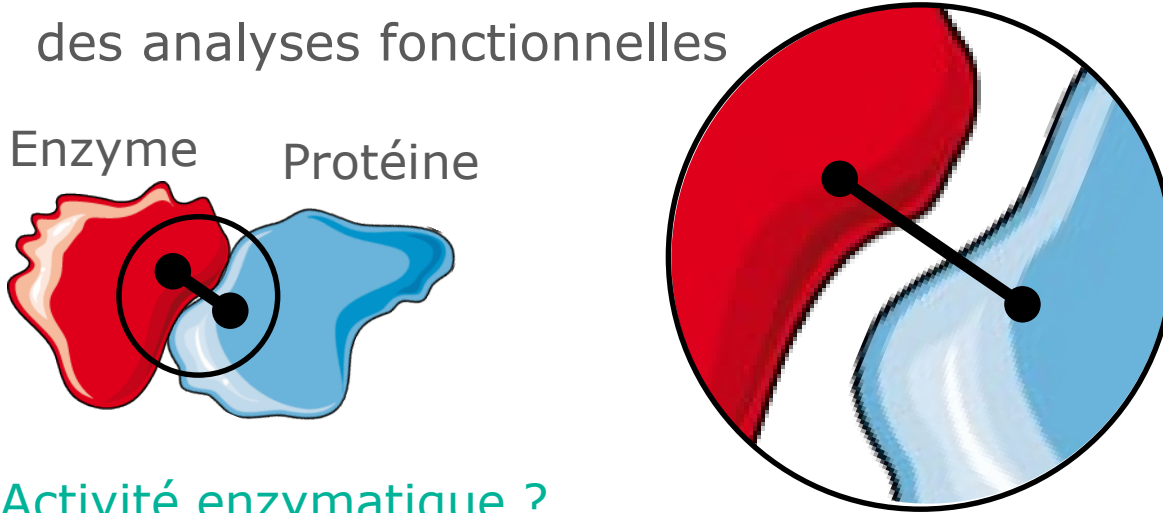
Glutaraldéhyde

Utilisation d'agents de fixation

Non compatible avec

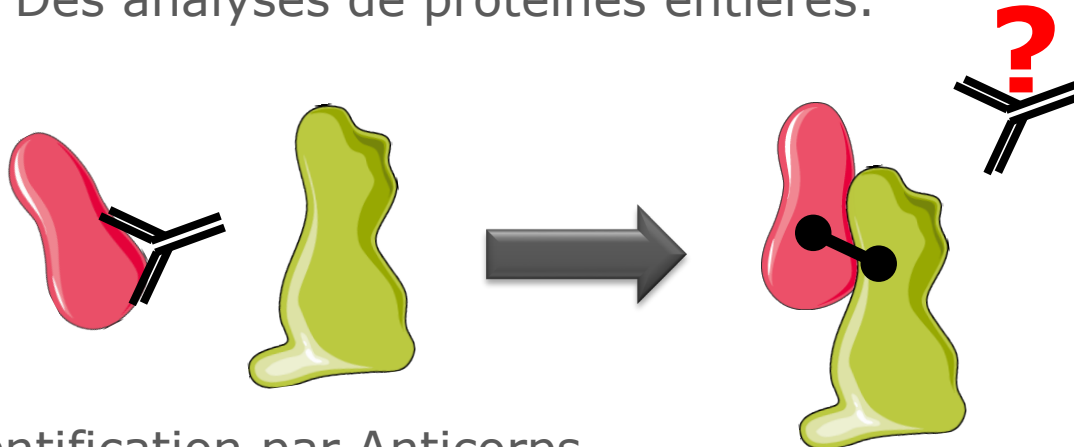
- des analyses fonctionnelles

Enzyme Protéine



Activité enzymatique ?

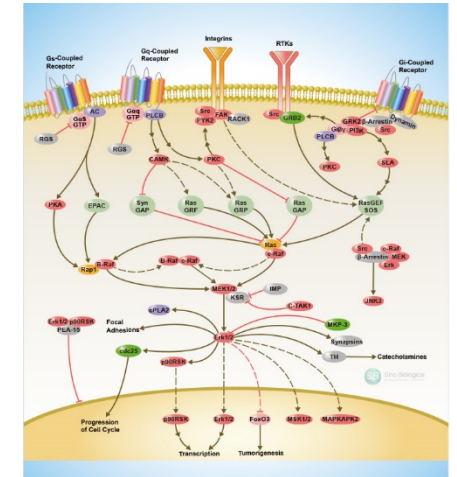
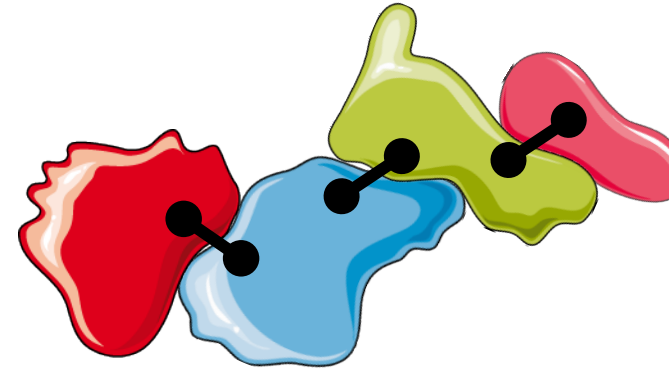
- Des analyses de protéines entières.



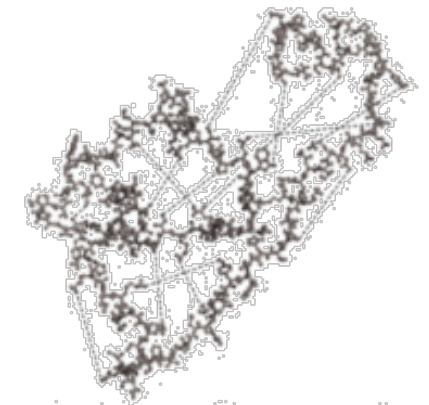
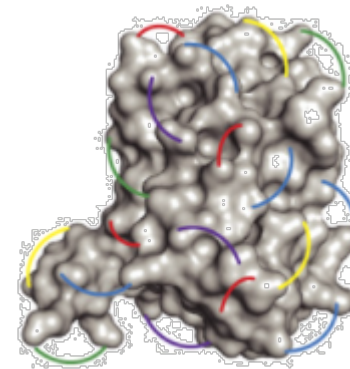
Identification par Anticorps

Utilisé également pour des études

- d'interaction** (Crosslink)
- Quel est l'avantage d'un pontage protéique ?

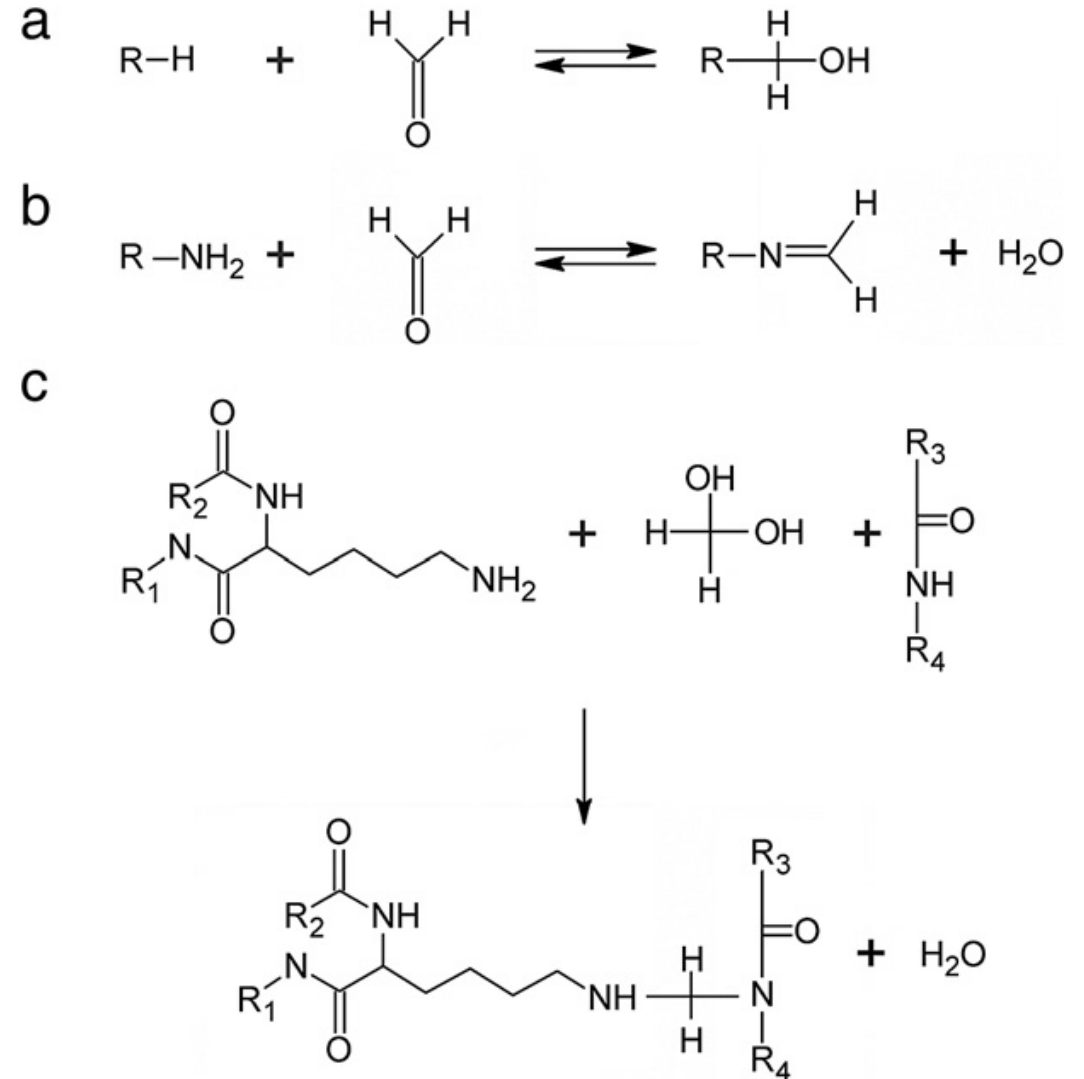


- De conformation**

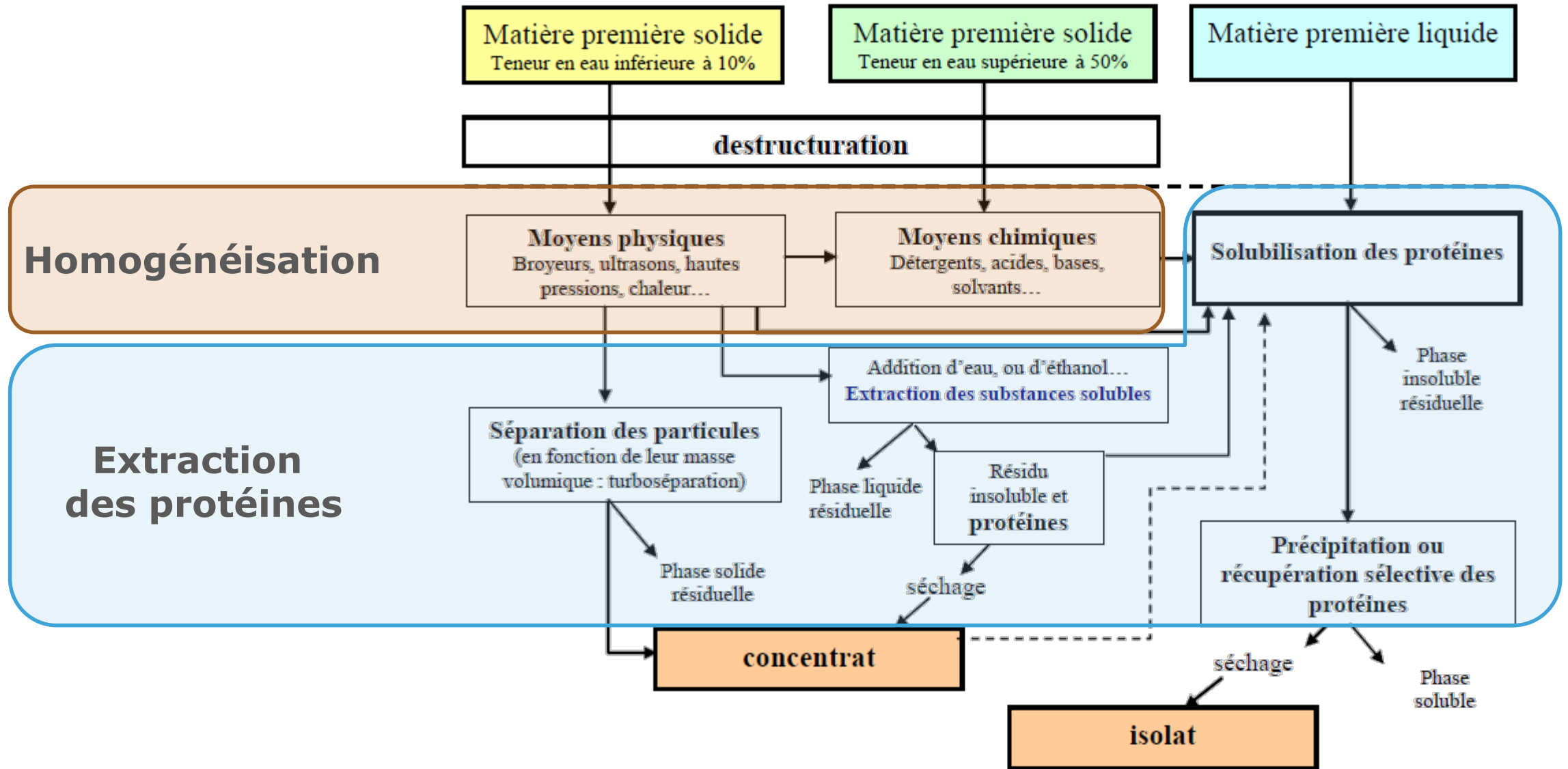


Fixation des protéines au Formaldéhyde

- **Formaldéhyde** est le fixateur le plus courant notamment en milieu médical
- Formation de ponts méthylènes **intra et inter-protéines**
- **Non réversible** peut entraîner des difficultés lors de l'analyse
- **Ne permet pas l'analyse de protéines intactes**

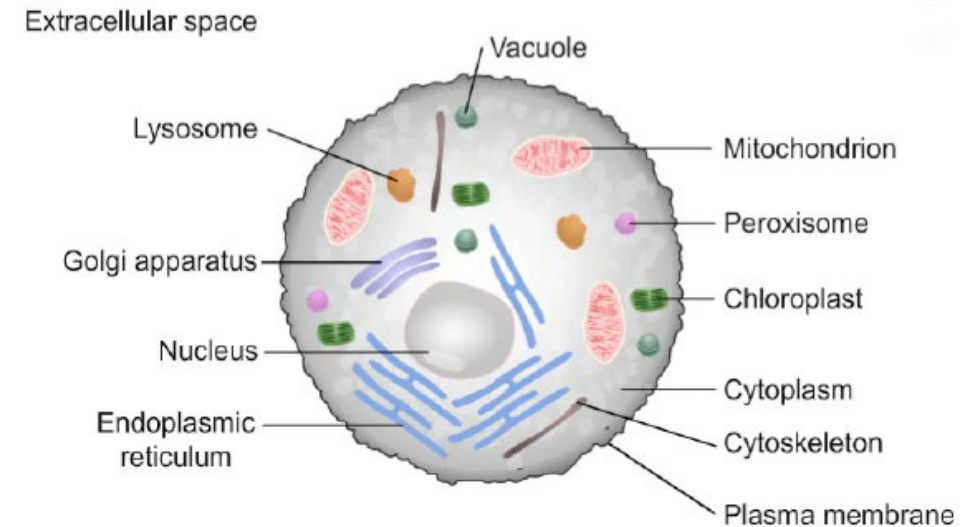
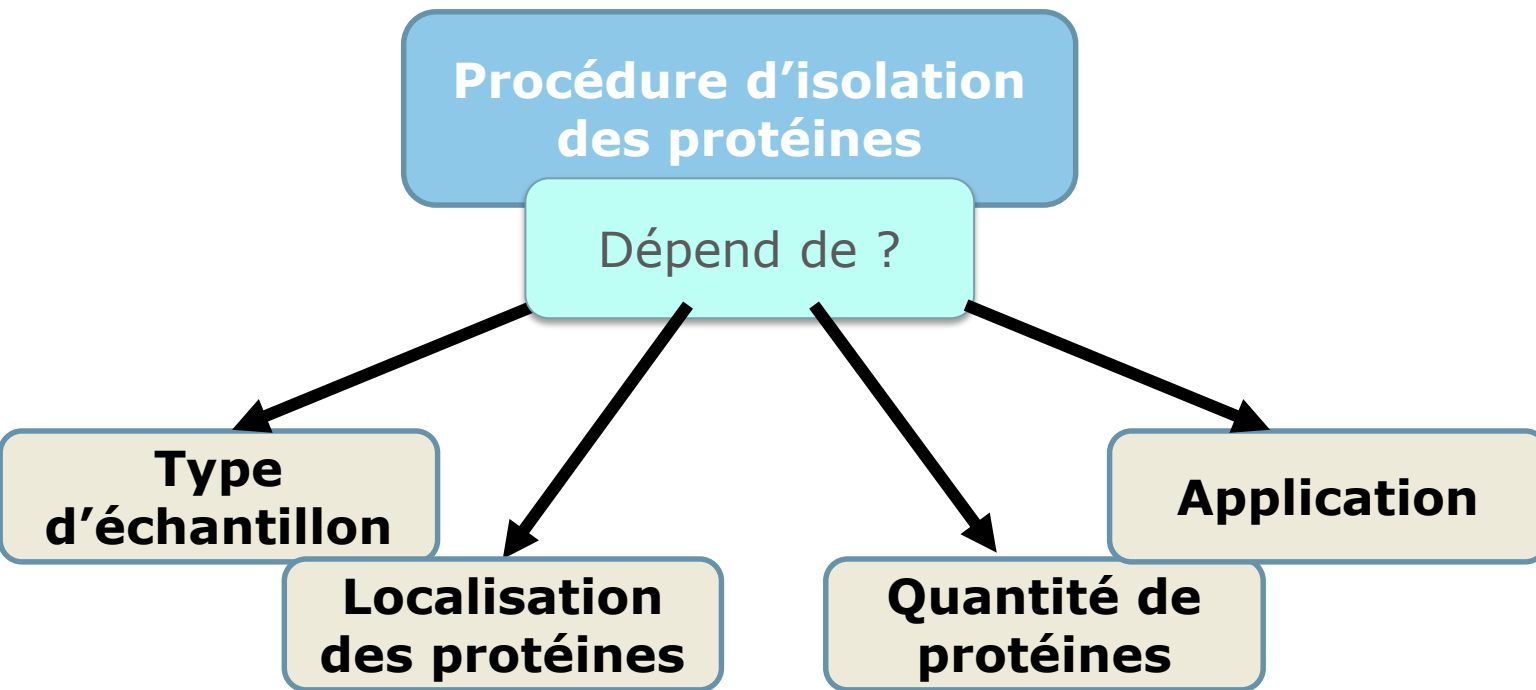


Homogénéisation des tissus



Isolément des protéines

Isolément des protéines se fait en plusieurs étapes



Etape d'homogénéisation:

désorganiser la structure tissulaire pour faciliter l'extraction des protéines

Homogénéisation des tissus

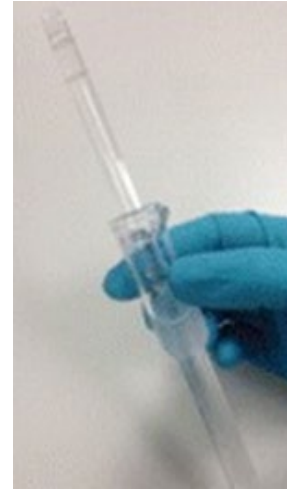
Broyage mécanique manuel:

Potter

- + **simple** d'utilisation, peu chère, facilité de nettoyage
- efficacité limitée pour tissu fibreux et homogénéisation incomplète.

Mortier/pilon

- + Température ambiante ou en congélation permet l'obtention de fine particules, peu chère, facile de nettoyage,
- efficacité limitée, possible **perte de matériel**



Homogénéisation des tissus

Broyage mécanique par cisaillement

Blender:

- + Utilisable pour différentes applications
- + Facilité d'utilisation et de nettoyage
- Création de mousse et vortex pouvant entraîner une **dénaturation des protéines**

Vortex + billes:

- + Utilisation de billes (verre ou métal)
- + Peu couteux et parallélisation possible
- Efficacité limitée

Rotor/stator:

- + Bonne efficacité pour échantillons de type et taille différents
- + Bonne homogénéité
- Nettoyage difficile
- Génération de chaleur pouvant **dénaturer les protéines**



Homogénéisation des tissus

Ecrasement

Billes de broyages:

Utilise une centrifugation oscillante à la place du vortex

Interaction entre les billes, le tube et l'échantillon =>

éclatement des structures

Tubes en métal ou plastiques; billes en céramique, verre ou métal

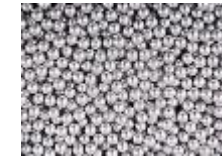
+ *Utilisable sur tous types d'échantillons*

+ *Bonne efficacité d'homogénéisation*

- **Nécessite une instrumentation dédiée**

- *Billes non réutilisables*

- *Coûts des instruments*



Media	Sample	Configuration	Comment ³
100 µm Beads	Bacteria	Microfuge Tubes Deep Well Plates	Tubes or wells should be 1/6 volume of beads and 1/3 volume of cell suspension.
200 µm Beads	Bacteria/Yeast	Microfuge Tubes Deep Well Plates	Amounts as above. Good for small yeasts (<i>Pichia</i>) and larger bacteria.
400 µm Beads	Yeast	Microfuge Tubes Deep Well Plates	Best size for <i>Saccharomyces</i> . Beads and culture broth should not exceed half volume.
500 µm Garnet	Skin/Sclera/Muscle	Polycarbonate Vials (4 ml)	Abrasive for tearing. For tough samples use with a 6 mm satellite. Use amounts as above.
800 µm Beads	Fungi	Microfuge Tubes Deep Well Plates	Good for pollen, mycelia, and algae. Volume should be the same as 100 µm beads.
1.0-1.7 mm Beads	Leaf Tissue/Soil	Microfuge Tubes	Process up to several leaf punches. Do not overfill tubes with buffer.
2.8-3.0 mm Beads	Plant Materials	Microfuge Tubes	Mass of sample should be kept to under 50 mg and buffer less than 500 µl.
5/32" Grinding Balls	Plant/Animal Tissues/Insects	Deep Well Plates	Animal tissues should be <100 mg while plants should be <50 mg. Use 1 ball per well.
6 mm ZO Satellites	Plant/Animal Tissues	Deep Well Plates Polycarbonate Vials (4 ml)	Use as above. When stainless steel may interfere with assays, zirconium oxide can be used.
3/8" Grinding Balls	Seeds/Animal Tissues	Polycarbonate Vials (4 ml) Polyethylene Vials (4 ml)	Use for rice grains, kernels, other seeds, on tissues (<150 mg). Do not overfill vials.
7/16" Grinding Balls	Pooled Seeds/ Organs/Tissues	Polycarbonate Vials (15 ml) Custom Container	Good for large samples and pooled seeds for field trials. Container must be relatively large. Use 2 balls for 15 ml vials or more for custom containers (up to 125 ml).

Homogénéisation des tissus

Différentiel de pression

Presse de French

Utilise un piston pour appliquer une pression sur l'échantillon (20 000psi)

- + homogénéisation uniforme et efficace
- **Échantillon petit** et pré-homogénéisé
- Peut se boucher

Pressure Cycling Technology (PCT)

Alternance de pression hydrostatique haute et basse

- + extraction très efficace
- + peut être utilisé pour la digestion enzymatique
- **Taille de l'échantillon limitée**
- Prix et consommable

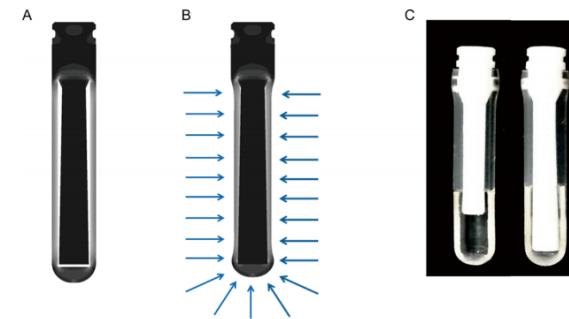
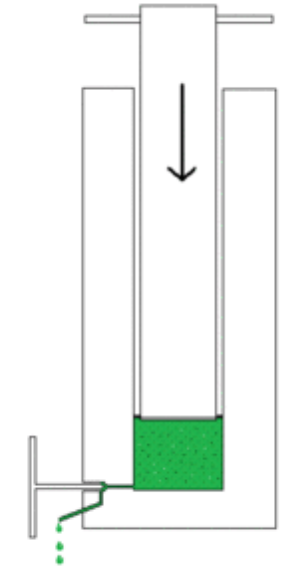


Figure 1. Design of the PCT-MicroPestle. (A) Appearance of PCT-MicroPestle and -microTube at ambient pressure (MicroPestle shown in black, microTube shown in gray). White area represents the compressible volume (air, buffer, and tissue). (B) Under high hydrostatic pressure, the microTube is compressed, causing it to narrow and shorten. (C) Appearance of the PCT-MicroPestle (right) and the long PCT-MicroCap (left; shorter caps were used when the sample was diluted for enzyme digestions) inserted into microTubes.

Homogénéisation des tissus

Homogénéisation acoustique

Ultrason:

Pression créée par les hautes fréquences et ondes de chocs

Phénomène de cavitation

+ très efficace pour des cellules en suspension

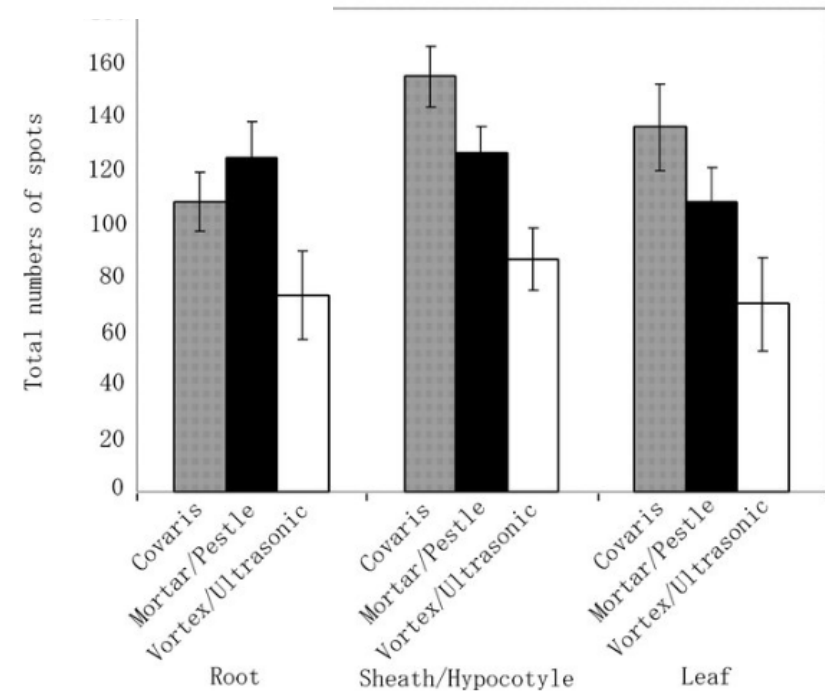
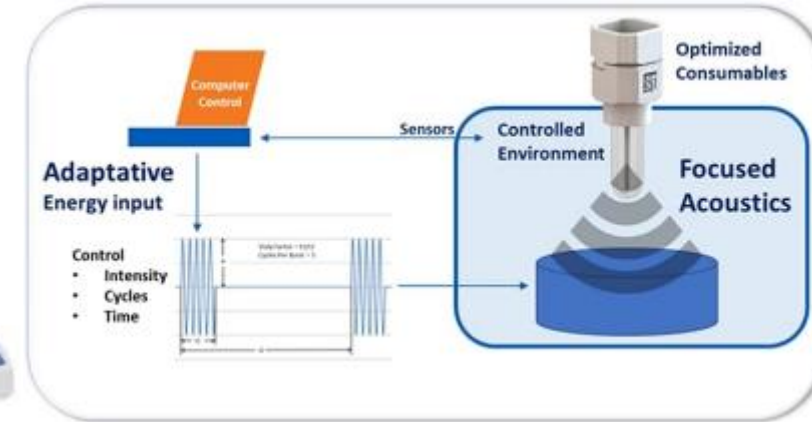
- **Production de chaleur**
- *Peu efficace sur des tissus*
- *Cross contamination si une seule sonde disponible*

Ultrason focalisé

Permet un meilleur contrôle et évite une chauffe rapide de l'échantillon

+ maîtrise de la température et des temps de cycle

- prix



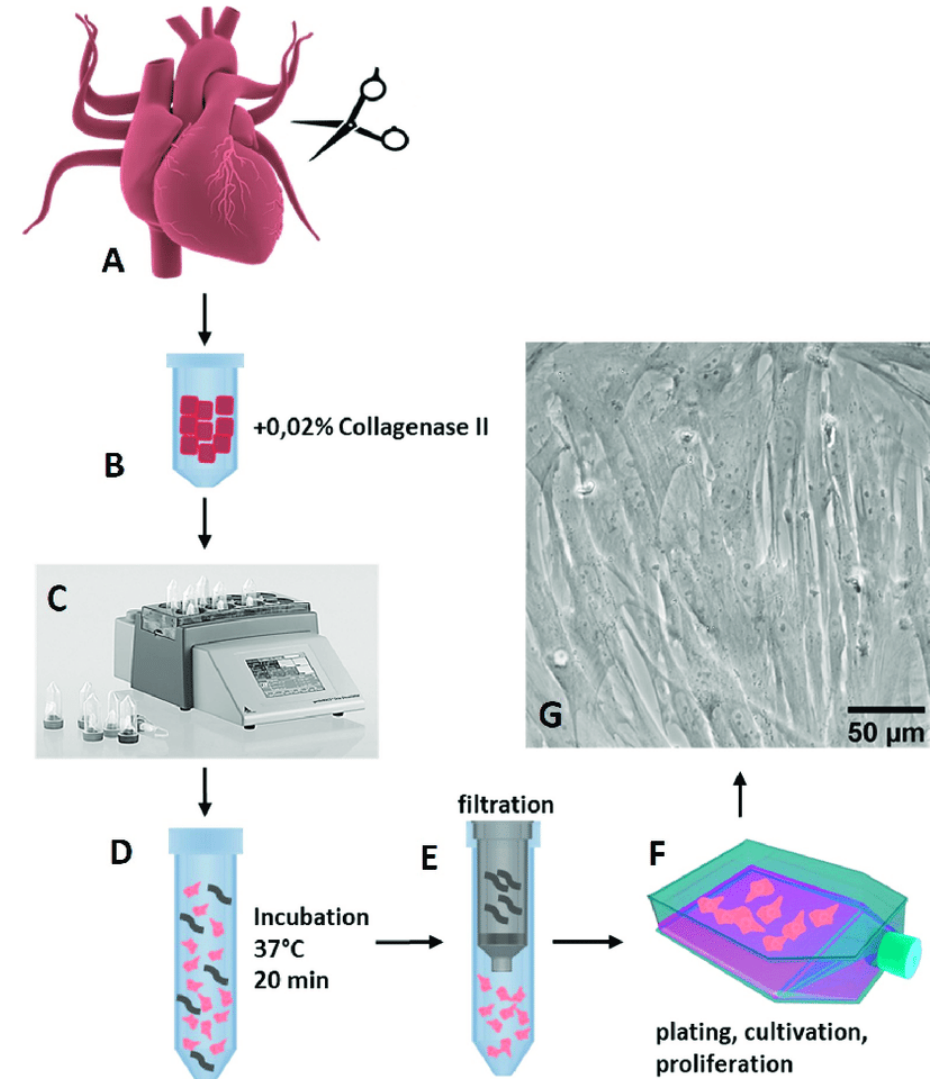
Homogénéisation des tissus

Homogénéisation Enzymatique

Digestion de la matrice extracellulaire:

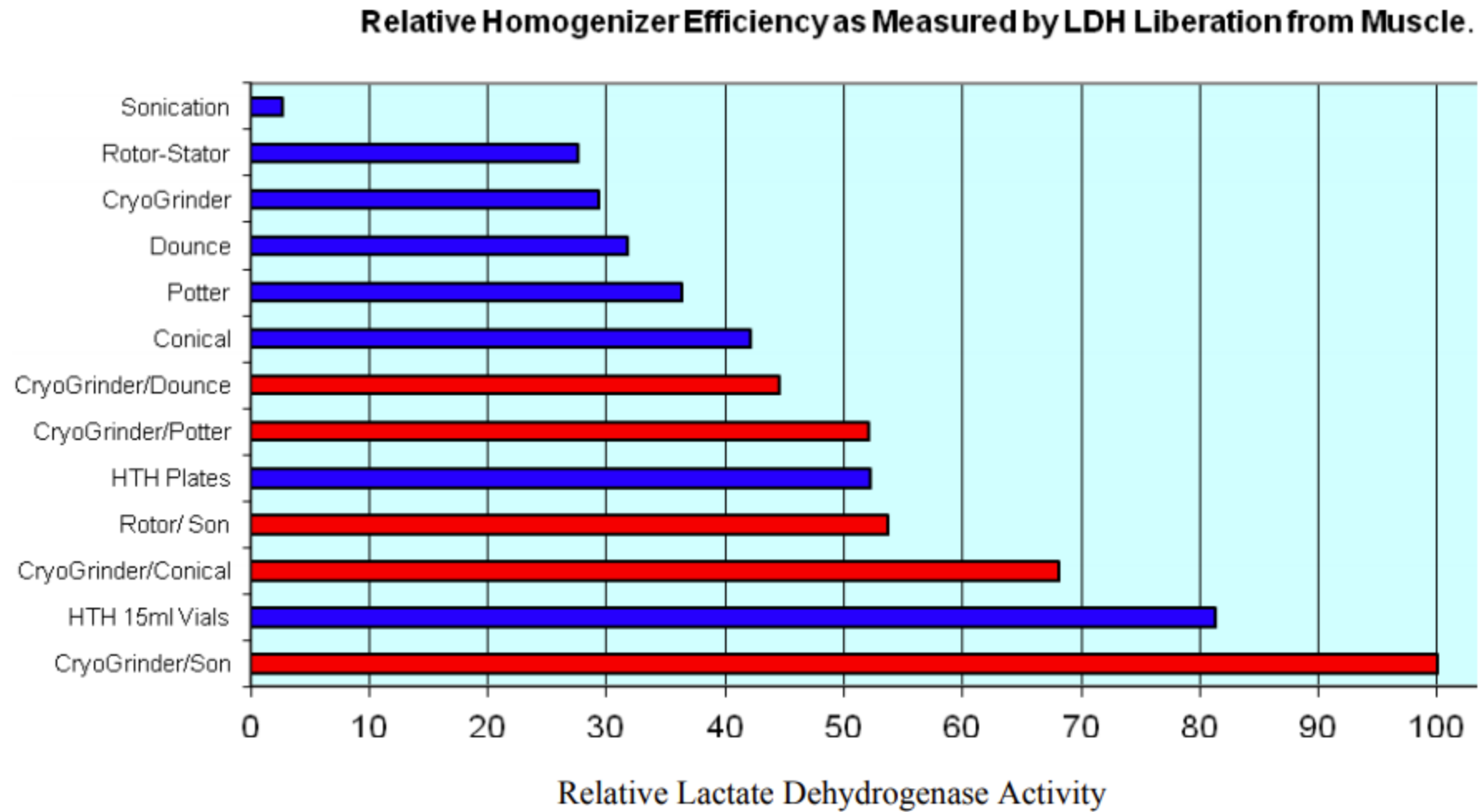
*Utilisation de collagenase et hyaluronidase
-> dégrade la matrice et libère les cellules*

- + : conservation de l'intégrité cellulaire
- + : remise en culture possible
- : perte de matériel
- : dégradation protéique
- : pas de libération du contenu cellulaire



ZLABINGER, Katrin, SPANNBAUER, Andreas, TRAXLER, Denise, *et al.* MiR-21, MiR-29a, GATA4, and MEF2c expression changes in endothelin-1 and angiotensin II Cardiac hypertrophy stimulated Isl-1+ Sca-1+ c-kit+ porcine cardiac progenitor cells in vitro. *Cells*, 2019, vol. 8, no 11, p. 1416.

Homogénéisation des tissus



27 baits (26 proteins, 1 mutant)
2xStrep-tagged



Expression in HEK293T cells
in biological triplicate



Frozen cell pellets were **thawed on ice** for 15–20 min and resuspended in 1 ml lysis buffer (Immuno-Precipitation (IP) buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4 at 4° C, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) supplemented with 0.5% Nonidet P40 substitute and cOmplete mini EDTA-free **protease** and PhosSTOP **phosphatase inhibitor cocktails**. Samples were then **frozen on dry ice for 10–20 min and partially thawed at 37° C before incubation on a tube rotator or 30 min at 4° C and centrifugation at 13,000g, 4° C for 15 min to pellet debris**. After reserving 50 µl lysate, up to 48 samples were arrayed into a 96-well Deepwell plate for affinity purification on the KingFisher Flex Purification System as follows: MagStrep 'type3' beads were equilibrated twice with 1 ml wash buffer (IP buffer supplemented with 0.05% NP40) and incubated with 0.95 ml lysate for 2 h. Beads were washed three times with 1 ml wash buffer and then once with 1 ml IP buffer. To directly digest bead-bound proteins as well as elute proteins with biotin, beads were manually suspended in IP buffer and divided in half before transferring to 50 µl denaturation–reduction buffer (2 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT)

Est-ce que cette stratégie est efficace pour observer les PTMs ?

Est-ce que toutes les catégories de protéines seront retrouvées ?

GORDON, David E., JANG, Gwendolyn M., BOUHADDOU, Mehdi, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, 2020, vol. 583, no 7816, p. 459-468.