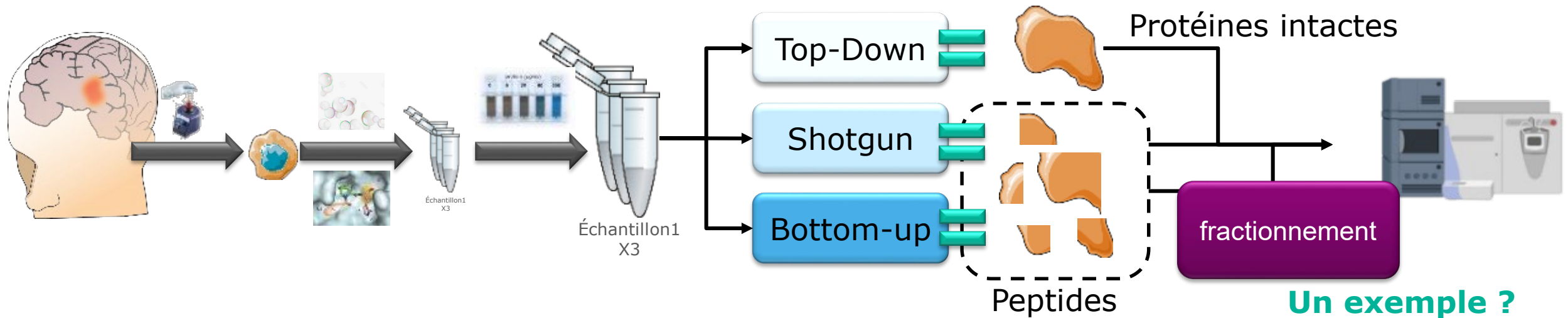
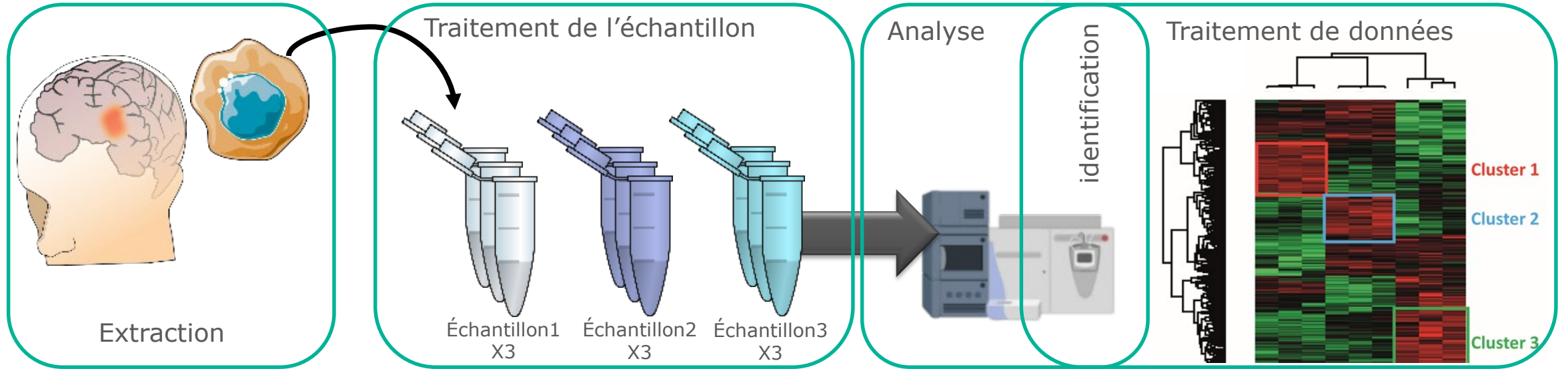


# **Bases de la protéomique**

**Principes et Applications**

# Les étapes pour la protéomique



Un exemple ?

**Étape de digestion**

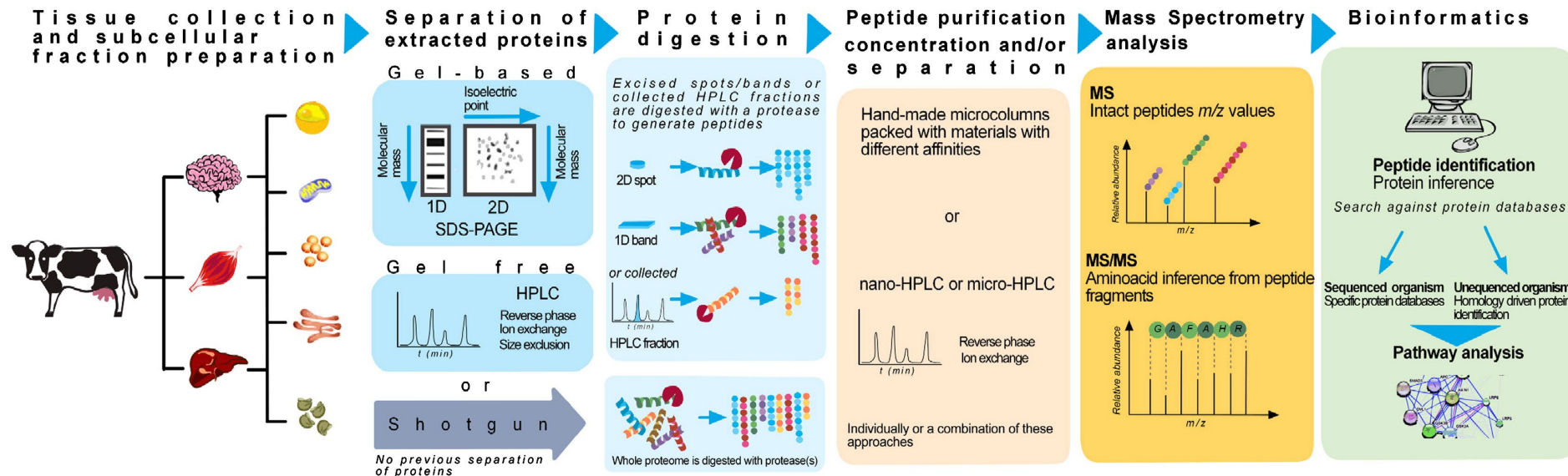
# Bottom-up et Shotgun

Digestion= formation de peptides de digestion

Seule méthode pour obtenir information à partir des protéines séparées en gel

Digestion des protéines après séparation ou en mélange (shotgun)

Peptides= taille adaptée à l'analyse en MS (optimum de performances d'analyses et de fragmentation)



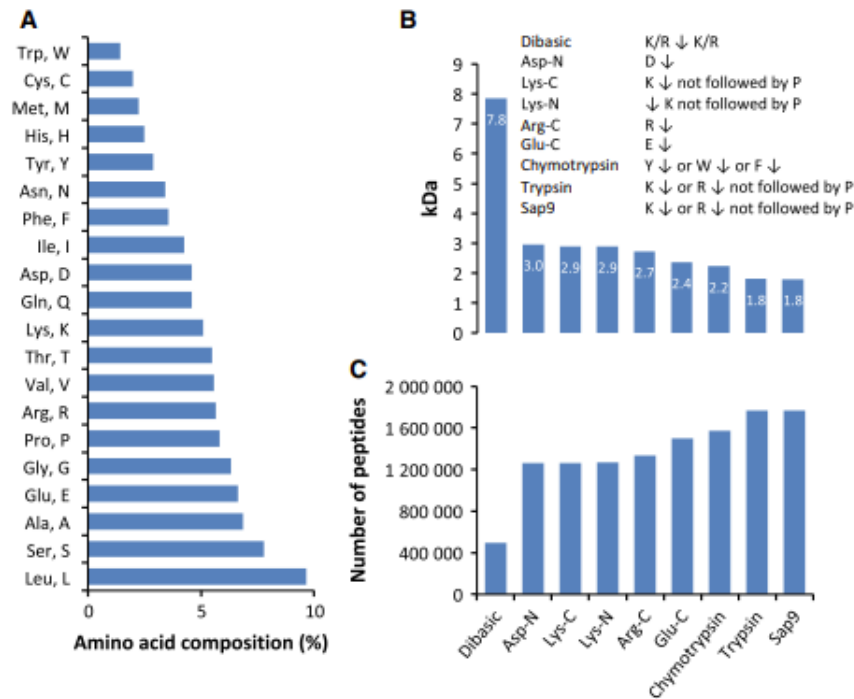
- Clivage **enzymatique ou chimique**
- **Spécificité** de clivage sur certains a.a.
- Pour faciliter l'accès à ces sites → **dénaturation de la protéines**
- Nécessite l'utilisation d'agent réducteur (DTT), augmentation de la T°, agent alkylant (IAA)

Table 1. Commonly Used Proteases and Chemicals for Protein Digestion<sup>a</sup>

protease	organism	specificity	pH range	chemical	specificity	pH range
Arg-C	<i>Clostridium histolyticum</i>	R'	7.2–8.0 <sup>b</sup>	CNBr	M'	acidic
Asp-N	<i>Pseudomonas fragi</i>	'D	7.0–8.0 <sup>b</sup>	HAc	'D' <sup>d</sup>	acidic
Glu-C	<i>Staphylococcus aureus</i>	E' <sup>b</sup>	4.0–7.8 <sup>b</sup>	FA	D'	acidic
Lys-C	<i>Lysobacter enzymogenes</i>	K'	8.5–8.8 <sup>b</sup>	HCl	D' <sup>e</sup>	2.0 <sup>e</sup>
Lys-N	<i>Lysobacter enzymogenes</i>	'K <sup>c</sup>	8.0 <sup>c</sup>	NTCB	'C <sup>e</sup>	9–10 <sup>f</sup>
Trypsin	<i>Bos taurus</i>	K,R'	8.0 <sup>b</sup>	Hydroxylamine	N–G	9.0 <sup>g</sup>
Chymotrypsin	<i>Bos taurus</i>	F,W,Y'	7.0–9.0 <sup>b</sup>			
Pepsin	<i>Sus scrofa</i>	'F,L,W,Y'	1.3			
		'F,L'	2.0			
Thermolysin	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	'A,F,I,L,M,V	8.0 <sup>h</sup>			
Papain	<i>Carica papaya</i>	R,K,D,H,G,Y <sup>b</sup>	6.0–7.0 <sup>b</sup>			
Pronase	<i>Streptomyces griseus</i>	A,E,F,I,L,T,V,W,Y'	6.0–7.5 <sup>b</sup>			

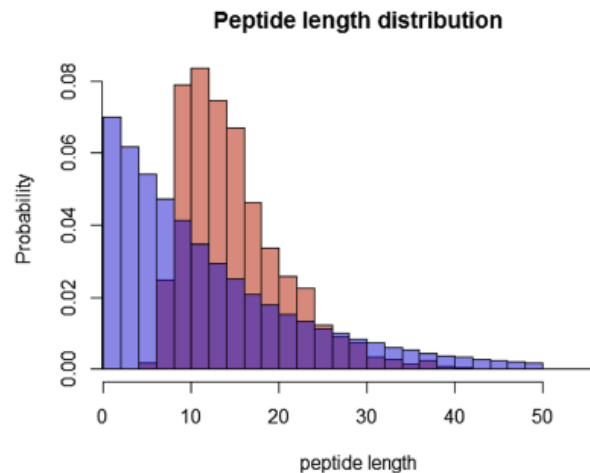
<sup>a</sup>All data obtained from the ExPASy bioinformatics resource portal<sup>29</sup> ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)), except those noted. <sup>b</sup>Roche Web site ([www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)). <sup>c</sup>Raijmakers et al.,<sup>30</sup> <sup>d</sup>Swatkoski et al.,<sup>31</sup> <sup>e</sup>Smith,<sup>32</sup> <sup>f</sup>Tang et al.,<sup>33</sup> <sup>g</sup>Crimmins et al.,<sup>34</sup> <sup>h</sup>Sigma-Aldrich Web site ([www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)).

J. Proteome Res. 2013, 12, 3, 1067–1077

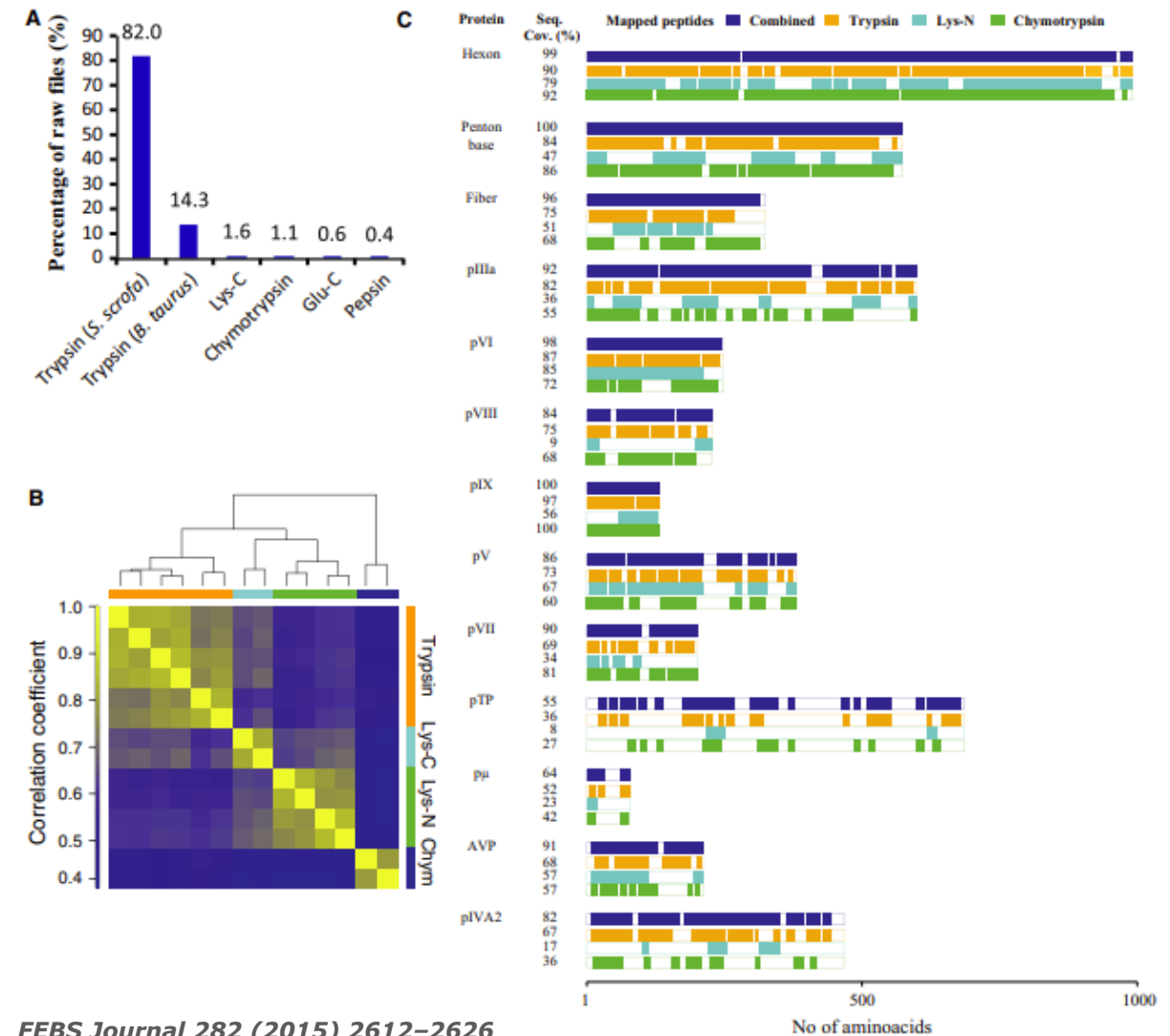


## Trypsine:

- **Endoprotéase**
- enzyme la plus utilisée en protéomique
- clivage après a.a. basiques **Arg, Lysine** **sauf si suivi par Pro**
- Distribution des peptides (expérimentale) entre 800 et 2800 Da



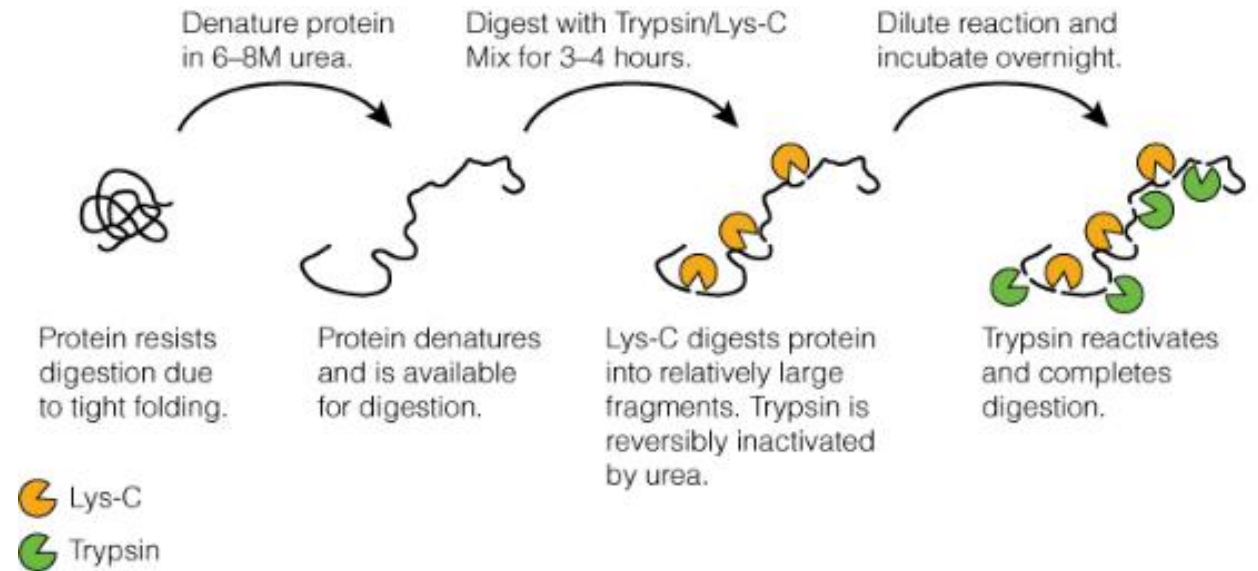
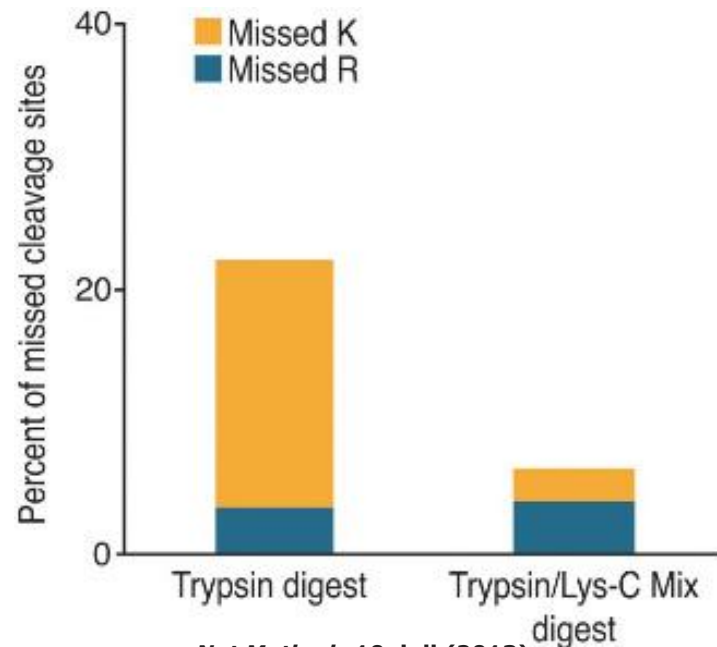
**FIGURE 5.** Superposition of the probability histograms of the peptide length distribution of a trypsin digest of the human complement of UniProt/ SwissProt and the peptide length distribution found from shotgun proteomics identifications from human samples obtained from the PRIDE database. The peptide length distribution of the trypsin digest is colored in blue, the peptide length distribution from the peptides originating from the PRIDE database is colored in red. For clarity, the histogram only contains information about peptides up to a maximum length of 50 residues.



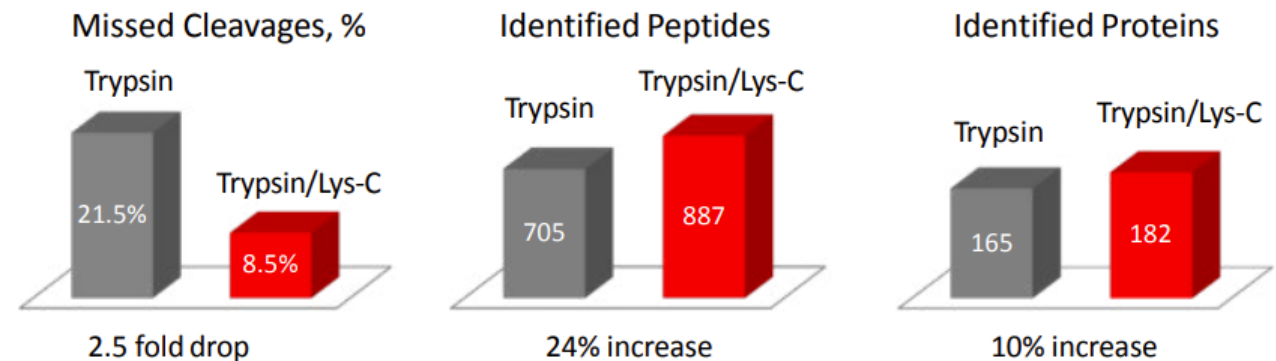
FEBS Journal 282 (2015) 2612–2626

## Lys C

- **Endoprotéase**
- Clivage **après les résidus lysine**
- Forme des **plus gros fragments** que la trypsine
- Utilisable même en conditions **hautement dénaturantes** (ex: urée 8M)
- **Utilisée en combinaison** avec une autre enzyme (généralement trypsine)



Sample prep is difficult due to extensive protein crosslinking in FFPE tissue.





# Digestion enzymatique

**Attention à la compatibilité entre tampon et l'enzyme**

**Retirer les détergents** ou utilisation de détergents clivables

Utilisation de stratégies adaptées pour retirer les détergents & contaminants

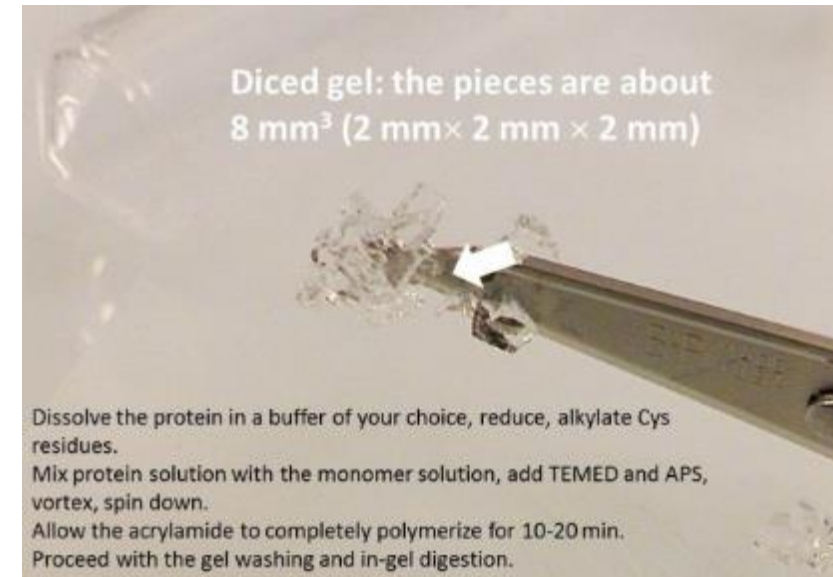
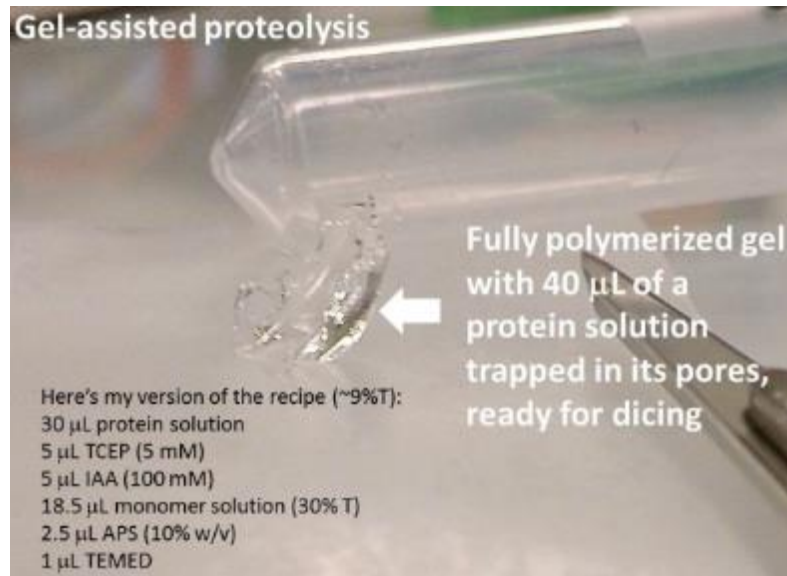
- *Précipitation*
- *Gel-Assisted*
- *Fasp*
- *S-Trap*

Trypsin solution <sup>a</sup>	Trypsin activity in % <sup>b</sup>
No additive	100
0.1% RapiGest	100
0.5% RapiGest	87
0.1% SDS	20
0.5% SDS	1
0.1% RapiGest 0.1% SDS	58
50% Methanol	31
50% Acetonitrile	92
1 M Urea	97
2 M Urea	83
0.5 M Guanidine HCl	21
1 M Guanidine HCl	8

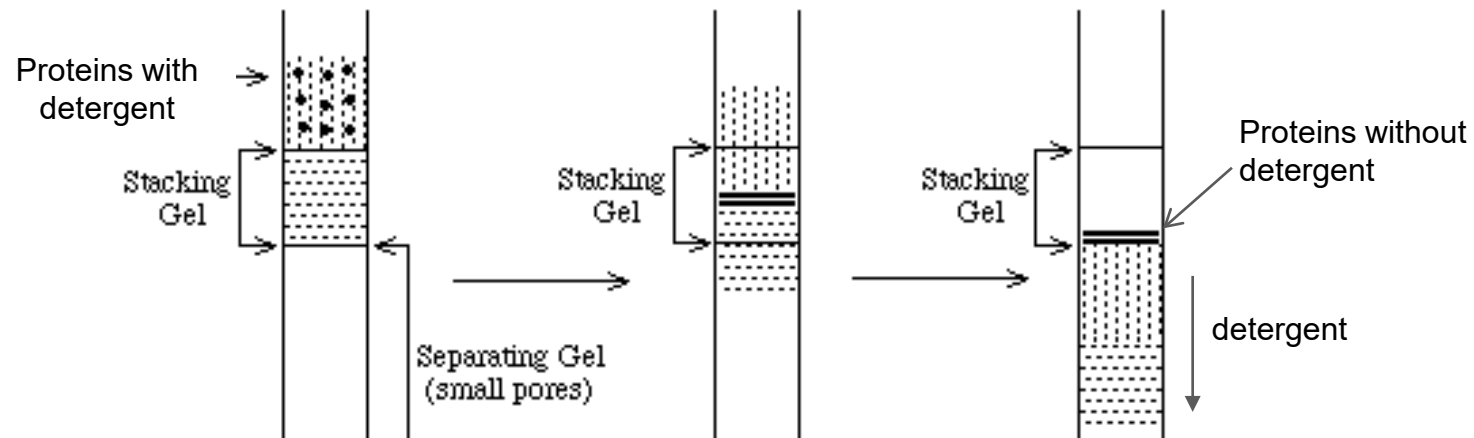


# Gel-assisted proteolysis

## In-tube gel



## Stacking gel



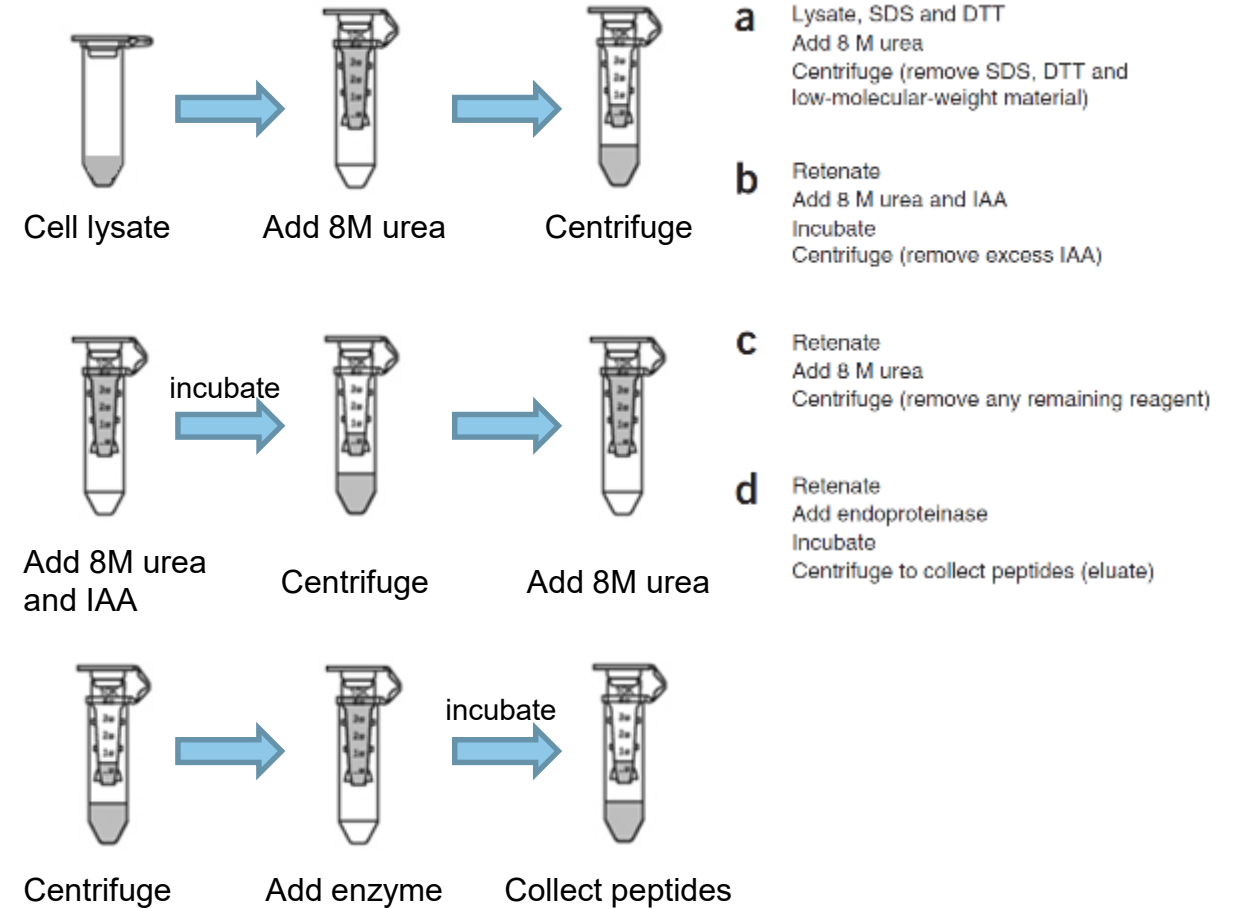
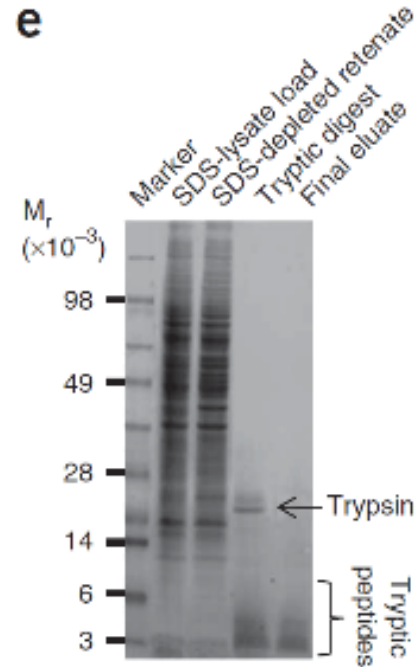
# FASP: Filter-aided sample preparation

Permet la préparation dans un  
« **microréacteur** »

Limite la manipulation de l'échantillon

**Élimine les contaminants et protéines  
non digérées**

Pourquoi éliminer les  
protéines non digérées ?

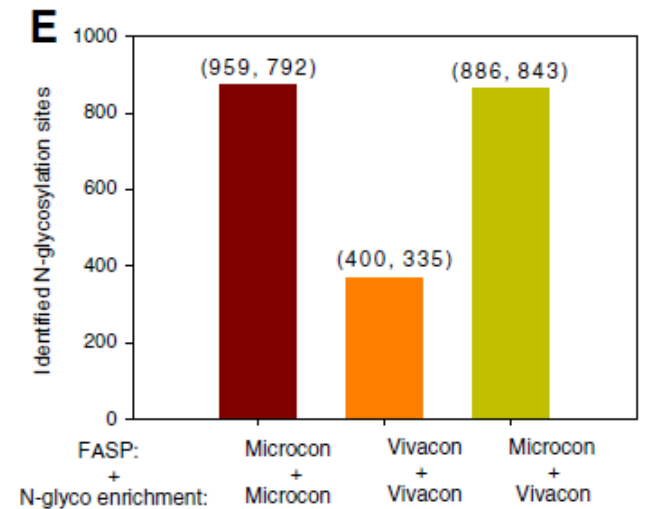
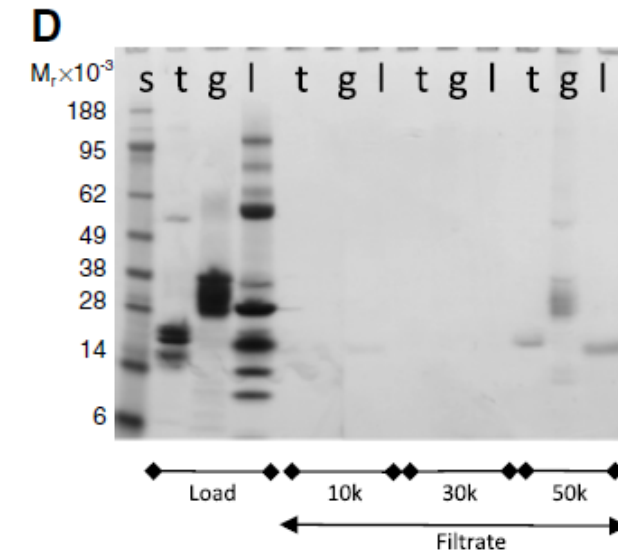
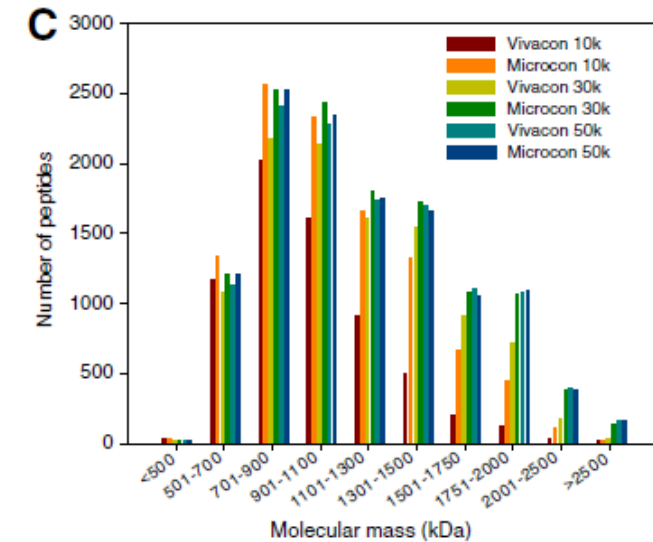
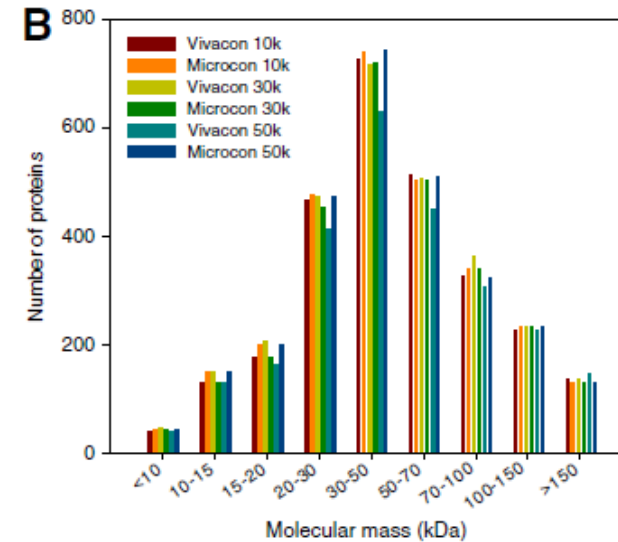


Possible d'utiliser des filtres avec différentes taille (10, 30 ou 50k)

Temps de centrifugation dépend de la taille  
Pourquoi ?

30 et 50k augmente la concentration en peptides et diminue le temps de préparation

Protocole simple et robuste pouvant être utilisé sur plusieurs échantillons en parallèle

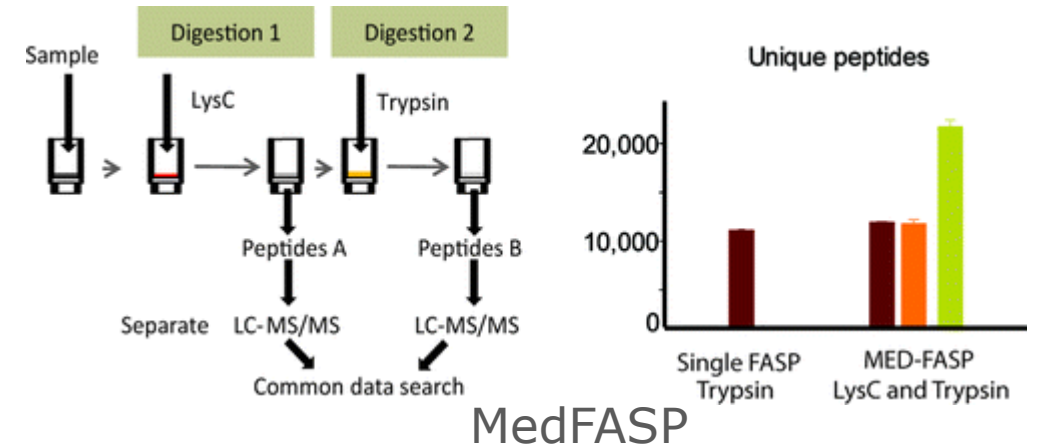
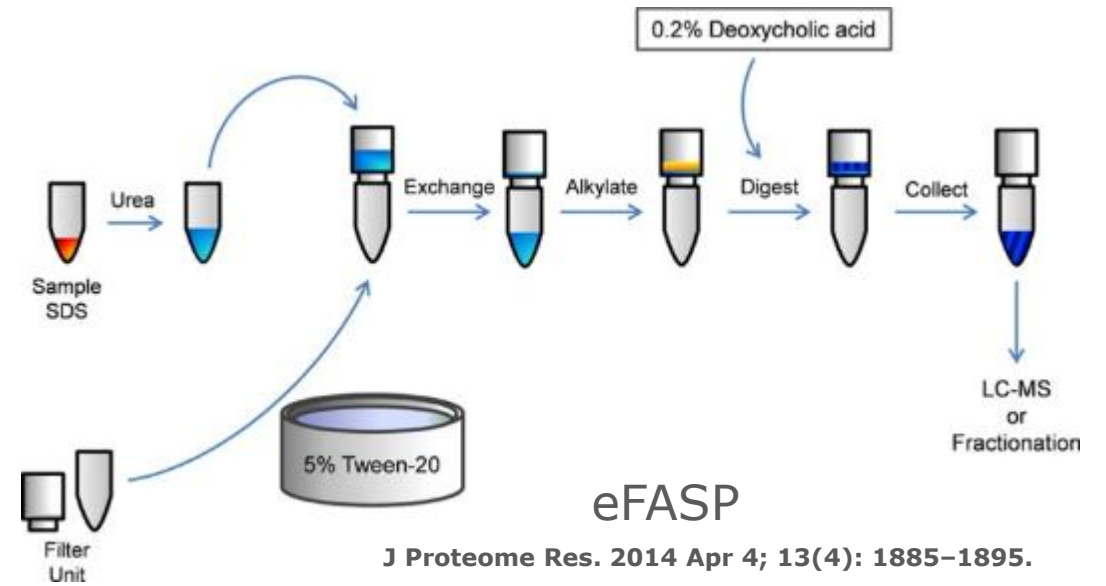


Different variants:

eFASP= enhanced FASP

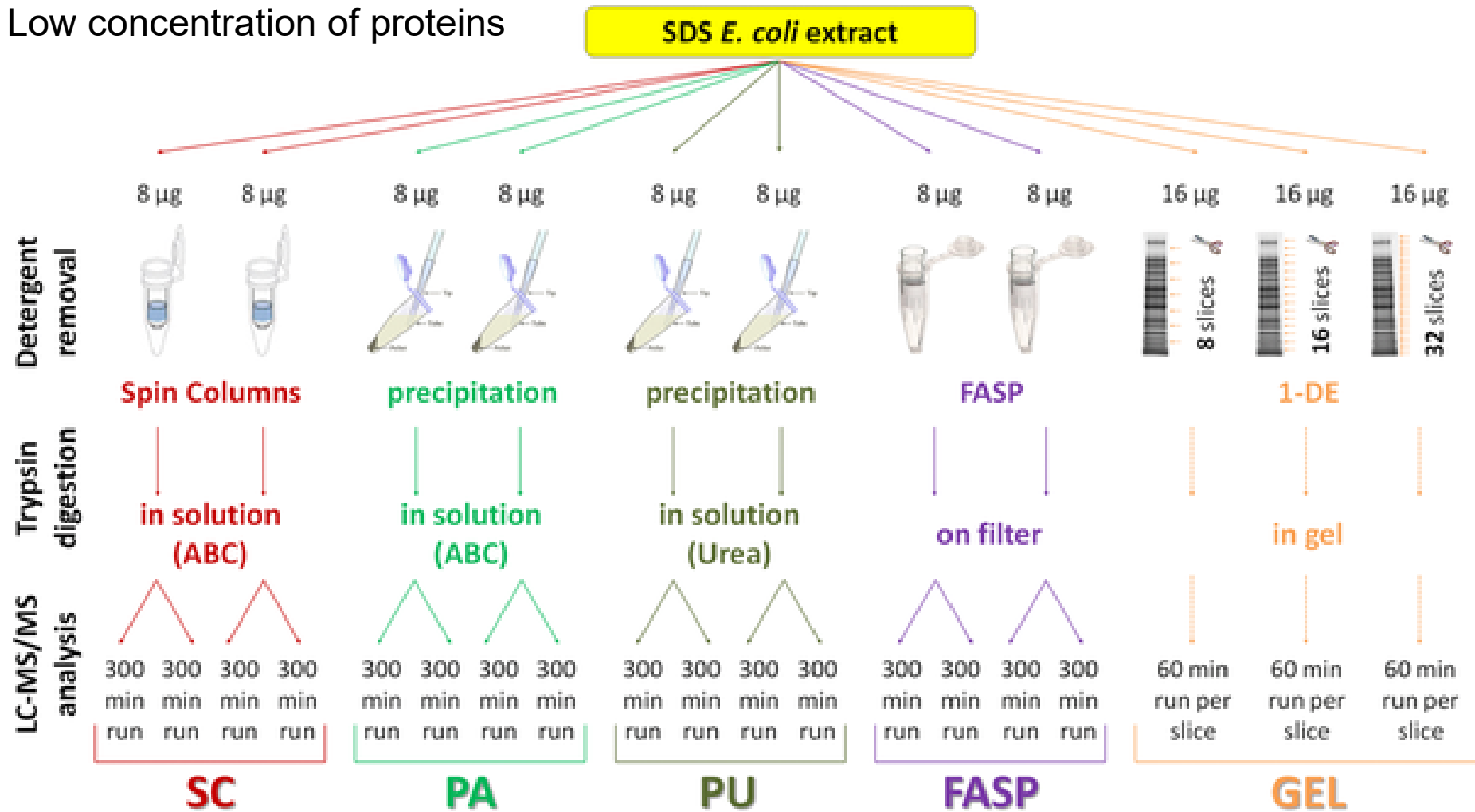
MED-FASP= **multiple enzyme digestion**

FFPE-FASP: Design for formalin fixed tissue



# Comparaison

Low concentration of proteins



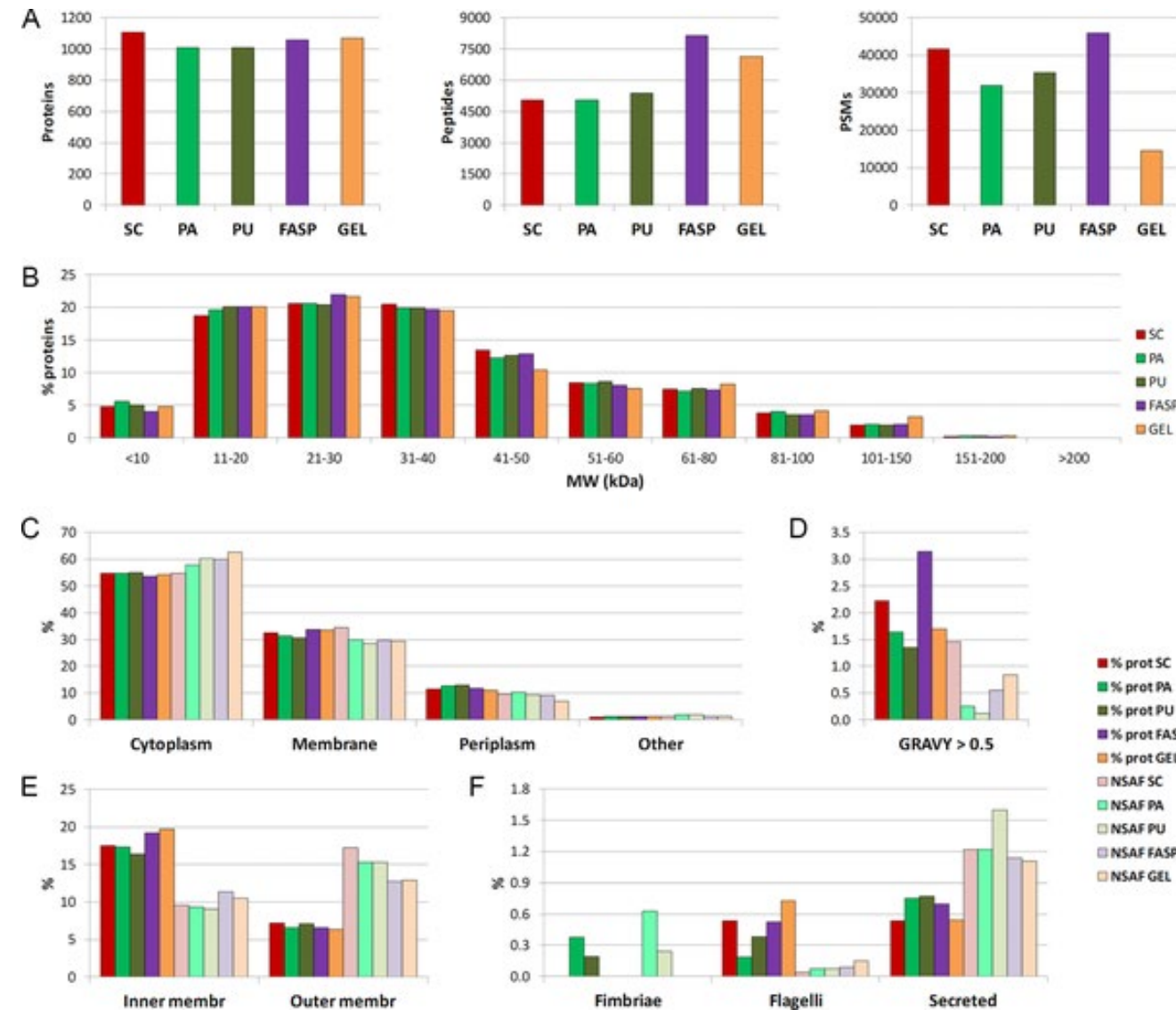
# Comparatif

Nombre de protéines identifiées équivalent

Un nombre de peptide plus important en FASP:

- Une couverture de sequences plus importante
- Un score d'identification protéique plus haut
- Une quantification plus précise

Digestion en gel : 56h pour faire l'analyse MS

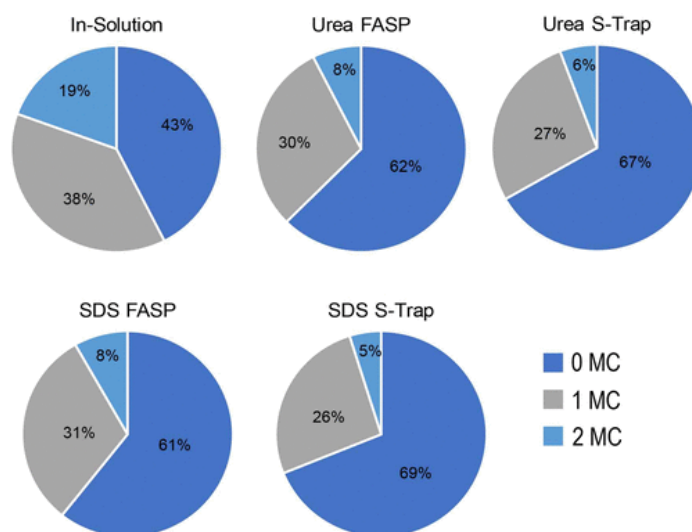




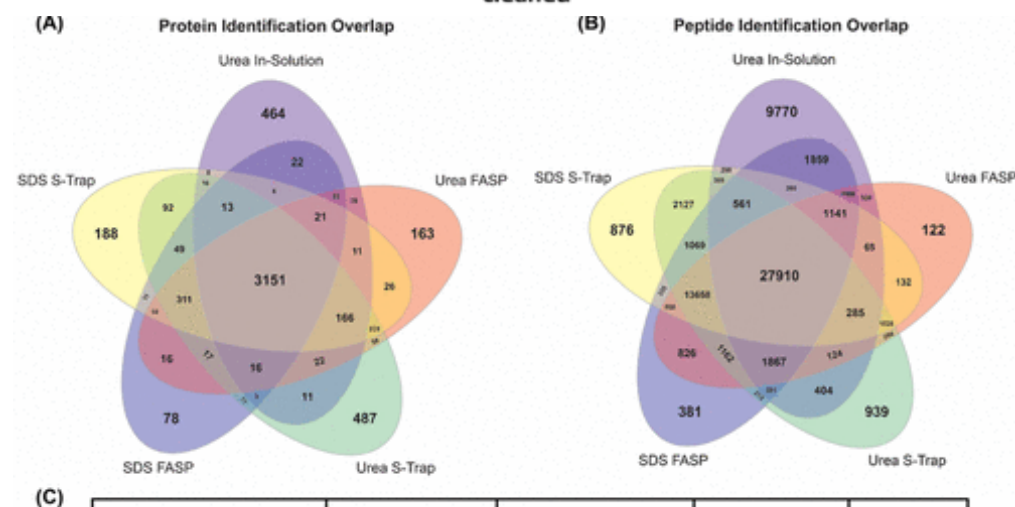
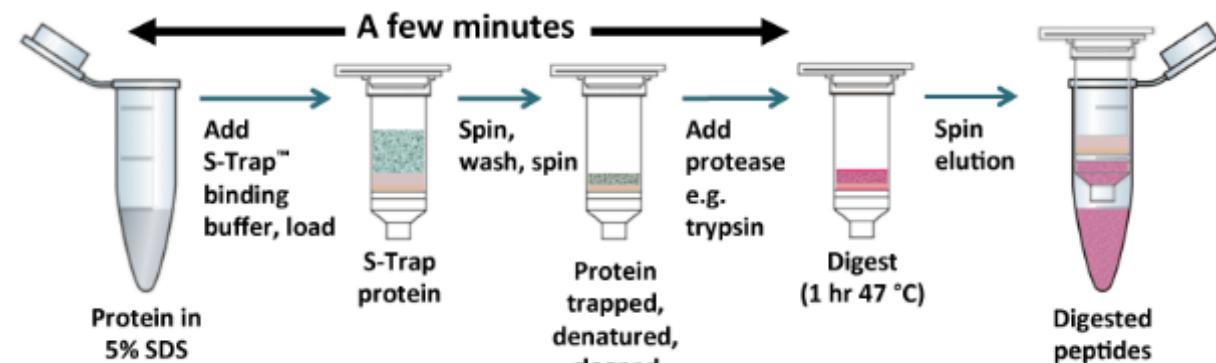
S-Trap= suspension trapping

Compatible avec du SDS (jusque 5%) et des solvant comme le methanol MeOH

Les filter est composé de plusieurs couches superposées



Miss cleavages



(C)

	Proteins	Peptides	MS/MS	ID %
In-Solution	3,981	48,482	666,601	43
Urea FASP	4,278	52,830	525,339	48
Urea S-Trap	4,662	52,247	653,743	55
SDS FASP	3,757	55,186	353,306	47
SDS S-Trap	4,318	50,989	564,637	59



# SP3: single-pot solid-phase-enhanced sample preparation

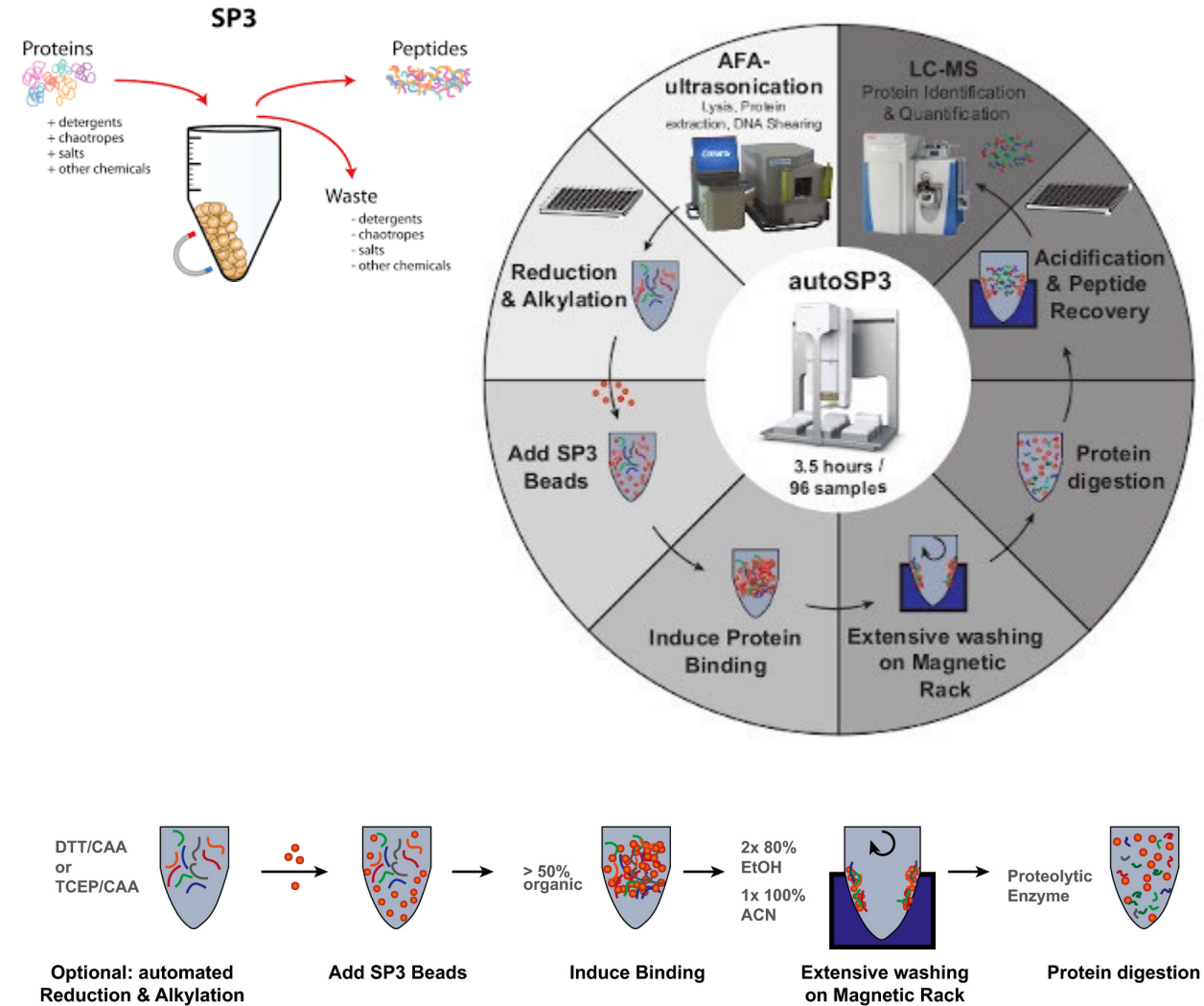
Méthode de préparation des échantillons utilisant des billes magnétiques, qui facilite la digestion et la purification des peptides

Bille paramagnétique qui permettes l'élimination des détergents

Compatible avec très peu de matériel, faible nombre de cellules

Automatisation du protocole permet d'augmenter la reproductibilité

Purifie les peptide pour une injection directe en MS



# Peptides clean-up

Étapes de nettoyage des peptides

Retirer les sels des tampons de digestion

Empêcher la présence de protéine non digérer  
qui peuvent boucher les colonnes de  
chrommatographie

Permet de concentrer l'échantillon à analyser

Peut-être réaliser avec une micropipette ou  
par centrifugation

Plusieurs étapes : Activation de la phase,  
fixation des peptides, lavage des sels, élution  
des peptides

Les peptides doivent être séchés et repris  
dans un tampon compatible avec l'analyse MS

					
	Pierce Peptide Desalting columns	Pierce C18 Tips	Pierce C18 Spin Columns	Pierce C18 Spin Tips	Graphite Spin Columns
Primary application	High capacity peptide desalting using microcentrifuge	Peptide desalting using micropipette	Peptide desalting using microcentrifuge	Stage tip peptide desalting using microcentrifuge	Phosphopeptide desalting using microcentrifuge
Format	Spin column	Tip	Spin column	Spin tip	Spin column
Maximum binding capacity	5 mg	10 µg or 80 µg	30 µg	10 µg	100 µg
Maximum loading volume	300 µL	10 µL or 100 µL	150 µL	20 µL	500 µL
Processing time	15 min	5 min	25 min	5-10 min	10 min



**Analyse d'article**

# Mild Acid Elution and MHC Immunoaffinity Chromatography Reveal Similar Albeit Not Identical Profiles of the HLA Class I Immunopeptidome

Theo Sturm,<sup>\*</sup> Benedikt Sautter, Tobias P. Wörner, Stefan Stevanović, Hans-Georg Rammensee, Oliver Planz, Albert J. R. Heck, and Ruedi Aebersold<sup>\*</sup>