Objectif : Déterminer les protéines à un moment donné dans une situation déterminée.

Quelles sont les intérêts de la protéomique

Les protéines sont les éléments centrales dans la vie des cellules.

Les protéines présentes dans la cellule ne dépend pas que de la transcription.

Les protéines peuvent subir des modifications post traductionnelle qui ne sont pas indiquées dans le code génétique.

## Purification des protéines

Migration sur gel SDS-Page

La migration permet en plus de créer des échantillons avec des protéines d’une gamme de taille restreinte.

Dénaturation des protéines qui sera utile pour facilité le découpage en peptides.

## Découpage des protéines en peptides

Rétablir les paramètres chimiques optimales pour que les endopeptidases soit le plus efficace. Dans l’idéale il faudrait qu’elle lyse tous les séquences reconnu.

Les endopeptidases sont

Trypsine coupe aux niveaux des aa cycliques.

Des différences existes entre les enzymes en terme d’efficacité et de spécificité. Autrement spécifique. Elle coupe en sauf

Utilisation d’urée favorise l’activité de la trypsine.

## Chromatographie

Fractionne l’échantillon de départ

Gradient particulièrement utilisée affinité notamment pour les complexes protéiques.

Propriété physique des molécules

Par ce pourrait servir à identifier une erreur

Affinité

* Biotine (vitamine B8) avec le strept.
* Du nickel avec l’histidine.
* Hydrophobe avec des chaines carbonées. De grande taille pour les petites molécules et petite avec les grandes molécules pour
* grandes molécules non polaire avec de petites chaines carbonées (sinon les molécules restent collées).

Baisse pH et solvant.

Haute pression sur appareil ? micro-taille paramètre

75nm taille échantillon

Avantage

Pb : utilisation sels étape d’élimination des sels.

Électrophorèse (taille point isoélectrique)

Poids moléculaires apparent

## Quantification des protéines

Il existe plusieurs méthodes mon quantifié l’ADN :

* L’électrophorèse
* La spectrométrie de masse.

Limite de l’électrophorèse (visualiser modification post traductionnelle) pas très reproductible

Quelques avantages de la spectrométrie de masse :

* Certaines coloration sont compatibles avec spectrométrie notamment Coomassie.

# Spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse permet de :

* Quantifier càd connaître le nombre. Identifier. L’identification est rendue possible en croisant les connaissances en biologie et chimie moléculaire avec les mesures expérimentales.

On créé un environnement qui permet de rendre possible la mesure des molécules. Phénomène physique que l’on détecte et très sensible mesurer de très petites variations. Les variations du champs électrique (ou magnétique)

Attention, toutes les molécules ne sont pas différence de pas aussi sensible entre les molécules certaines sont très bien détecter quand d’autre le sont moins. On peut s’affranchir de cette obstacle ???? en la quantification relative.

Le principe les molécules analyser sont mises dans un champs électrique (ou magnétique). Comme els molécules possèdent des charges elle par la présence elle modifie le champs. Cette modification. Pas directement chose interaction qui détermine ce que l’on voit. Deux paramètres :

* Trajectoire.
* La charge de la molécule.

Paramètres qui influencent la conformation (disposition dans l’espace).

Pour rendre les molécules plus facilement détectables, on leur ajoute ou enlève des charges.

M/z séparateur

|  |  |
| --- | --- |
|  | charge  poids moléculaire apparent (Da) |

La qualité des résultats et leur pertinence dépendent grandement de la qualité de l’échantillon.

Le spectromètre est constitué de trois unités :

* La source d’ions.
* L’analyseur et le détecteur. L’analyseur a va permettre de transformation de Fourriers des « orbites » ou les trajectoires en spectre (m/z).

## La source d’ions

Il est possible d’utiliser de charge cation (+) ou anion (-).

Phase gazeuse :

Douce pression atmosphérique

Négativement ajouter ou enlever des protons.

ESI

MALDI et ESI complémentaire accessible financièrement.

ESI plus adapté aux échantillons liquides et permet du haut débit.

### MALDI

désagrégé la matrice.

### Ionisation electrospray (ESI)

ESI gaz nébulisation gouttelette

Éjecté chargé qui sont dissociés par un jet à contrecourant.

Dissociation des molécules à cause des charges.

Contrecourant élimine le solvant.

Différence de potentiel répulsion de Colomb.

Solvant non chargé

Répulsion (électrique)

Plusieurs charges

## L’analyseur

Varié le champs électrique pour déterminer éjecter .

### Quadripôle

Stabilité de la trajectoire

### Orbitrap (trajectoire)

Analyseur (séparateur) time of fly

Vitesse de parcours

Analyseur quadripôle

Filtration et fragmentation

Étudié un groupe imp de protéo

Astuce découpé peptide

## MS/MS

Combiné deux analyseurs qui agissent successivement.

1. Le premier.
   * Des mesures de la
   * Sélectionner les molécules.
2. Coupure de la sélection.
3. Analyse des fragments avec Parent masse + plusieurs masse fils

# Spectrométrie de masse pour la protéomique

Nature de l’échantillon de la nature de la molécule les plus + protéines H+. Jusqu’à z. Azote et oxygène doublet non liant donneur.

Les protéines peuvent être des molécules compliqués. La chaine d’acides aminés. On réalise généralement une découpe des protéines. C’est la présence de chaine peptides avec des séquences uniques dans chaque type de protéines qui permet de remonter au type de la protéine.

Comme la plupart des appareils de haute précision, ils possèdent une plage de mesure avec des conditions expériementales optimales. Dans le cadre d’analyser des chaines peptidiques.

La précision des mesures réalisés permet une polyvalence dans les réponse que peut apporter une analyse par spectrométrie :

* Modifications post traductionnelles
* La détection des protéines.isomères.

On réalise généralement une découpe des protéines en peptides par l’utilisation d’endopeptidase (par exemple, la trypsine). Les endopeptidases utilisé possèdent des sites de clivage spécifique.

Nécessite de dénaturer la protéine notamment de la suppression des ponts disulfures. On ajoute un groupement pour empêcher leur reformation.

1. Chromatographie.
   1. Retirer les sels.
   2. Fractionner l’échantillon. Cela facilite l’analyse (à la fois pour le spectromètre mais aussi pour l’utilisateur). Les molécules sont analysés par groupe de molécules avec des propriétés chimiques très proches.

### MS/MS

Études des fragments.

Liaison peptide favorise Yn-1 b1 fragment peptidique

Yn-1 le premier aa1 Yn-1 aa2 aa3

1/ calcul masse 1 chargé

Yn-1 plus présent.

Recoupant les informations et grâce à la précision des mesures, on est en mesure de déterminé une partie des acides aminés d’une chaine.

### Données importantes

Masse des acides aminés :

|  |  |
| --- | --- |
| Acide Aminé | Poids moléculaires (Da) |
| Glycine | 57,02 |
|  |  |
| Tryptophane | 186,08 |
| Moyenne | 110 |

La perte d’eau d’une molécule d’eau 18 Da.

Ion fils couper au niveau d’une proline sont très intense.

Préparation de l’échantillon pour faciliter la spectrométrie de masse.

Facilite la lecture et l’interprétation des résultats.

Séparation des protéines.

Propriétés chimiques

Spectromètre de masse

Contrôle qualité vérifier la présence/conformité

Stratégie

Prévision = résultat

Partenaires de protéines.

Marqueurs protéiques (biomarqueur) pathologie

## Exemples d’utilisation de l’analyse par spectrométrie

Identificaiton de

Protéine identifier grâce aux anticorps

1. Fixation de la protéine d’intérêt en condition qui favorise les interactions avec les protéines associés.
2. Détachement et analyse protéines associés.

Un groupe (pool) sélectionne les protéines d’intérêt par leur interaction avec

Les principaux problèmes de l’analyse protéique sont que :

* Le nombre de type de protéines différents.
* La grande variabilité dans les volumes entre les protéines. Leur quantité peut variée de l’ordre de 106.
* Les interactions avec les autres molécules :
  + Les modifications post traductionnelles.
  + Les autres protéines notamment dans le cadre de la formation de complexes protéiques.

Rmq : Il peut être également intéressant de connaître la localisation des protéines et leur conformation.

1. Fragmentation et purification.

Définir la question pour adapter le protocole technique (le choix de la chromatographie illustre particulièrement ce fait). Grâce aux différences de propriétés chimique

# Traitement des données

La façon dont est traitée les données de MS dépend de l’objectif de l’étude pour une analyse :

* De la composition protéique d’un échantillon. Compare le spectre avec un spectre théorique déterminée empiriquement ou grâce à un algorithme de machine learning.
* Déterminer la séquence d’une chaîne peptidique.

generate spectral libraries using deep learning

hybrid search strategy that combines protein sequence database and spectral library

Du peptide à la protéine :

* Protéines sont découpés en peptides.
* Les peptides sont élué par la chromatographie.
* A chaque « cycle », les 20 peptides les plus intense dans le MS sont sélectionné.
* Les peptides sélectionnés sont fragmentés.
* Les fragments peptidiques sont analysés par MS.

La précision de la masse est de l’ordre de 0,2 Da (Dalton). A comparer par rapport à la masse d’un atome d’hydrogène qui est de 1 Da. La sensibilité est suffisante pour distinguer des isotopes.

Remonter des fragments peptidiques à la protéine :

Les peptides sélectionnées sont fragmentés. La différence de M/Z entre les fragments permet de déduire les acides aminées qui constitue le fragment peptidique. 30% ??

Les séquences des fragments peptidiques sont superposées pour déterminer la séquence du peptide.

L’association

Utilisation d’un algorithme qui contient la liste de toutes les protéines

La fragmentation permet de distinguer des séquences avec les mêmes aa ordonnée différemment qui possède un M/Z identique lors du premier MS.

* Le nombre de peptides détectés dépend de la quantité de protéines présentes dans l’échantillon.
* Le découpage des protéines par les protéases complexifie l’échantillon à analyser.
* Pas de protéines directe car ça diminue la complexité du spectre de la fragmentation (le nombre de combinaison est beaucoup plus élevé).

En connaissant de la séquence des peptides,

Les séquences sont regroupés en protéines en faisant appelle au principe de de parcimonie maximale (le moins de données possible) càd l’hypothèse la plus probable est celle qui un nombre minimum de protéines.

Chez les Eucaryotes le génome qui sert contient l’information de la synthèse des protéines

Présence de nombreuses homologies.

Le principe de parcimonie maximale suggère que si deux séquences différentes (uniques) sont présentes dans l’échantillon lors il est plus probable qu’ils proviennent d’une protéine qui possède c’est deux séquences que de deux protéines différentes qui possèdent chacune une séquence.