

# Quantification en protéomique : état de l'art en analyses exploratoires et ciblées

**Delphine Pflieger**

**LAMBE, UMR CNRS 8587, Université d'Evry Val d'Essonne**

**Congrès SMAP, Dijon, 14-17 septembre 2009**



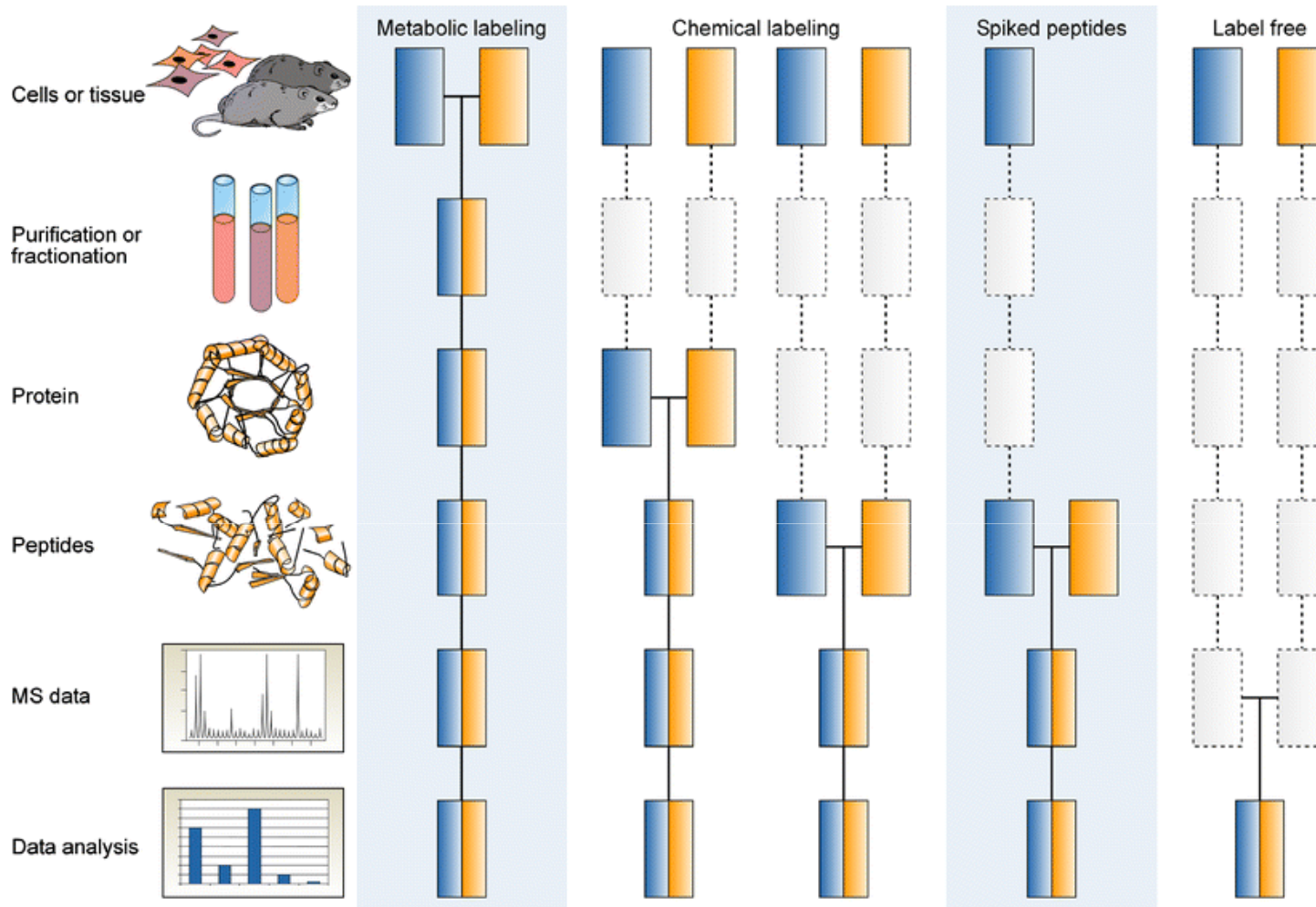
## Rappels sur les analyses semi-quantitatives par MS

Précision, justesse... des mesures semi-quantitatives

Analyses protéomiques ciblées

Quantification relative... et absolue en 'label free'

# Différentes stratégies d'analyse semi-quantitative

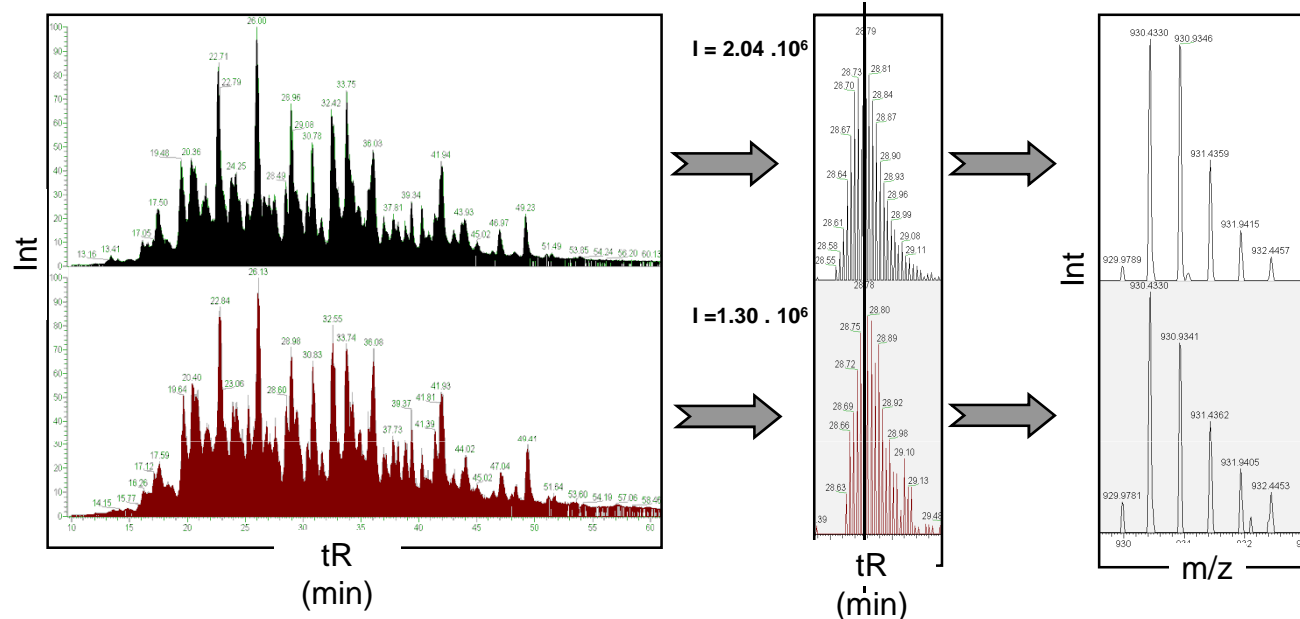


**Augmentation du nombre de facteurs de variations entre échantillons comparés**

# Différentes approches de 'label-free'

'Label-free':

- comparaison des aires des pics chromatographiques



- 'spectral counting' : nombre de peptides identifiant une protéine (normalisé par rapport à la masse de la protéine)

- intensité MS moyenne des trois peptides les plus intenses identifiant une protéine

## Quantification en MS ou MS/MS et nombre d'échantillons comparables

Marquage	N(échantillons)	Détection MS	Détection MS/MS
SILAC	5	✓	
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	2	✓	
$\text{H}_2^{18}\text{O}/\text{H}_2^{16}\text{O}$	2	✓	✓
iTRAQ	4 ou 8		✓
TMT	6		✓
Label-free	$\infty$	✓	✓

**Label-free : a priori infini => possibilité de mener des études multi factorielles (dose + temps d'application d'un stimulus)**

## Rappels sur les analyses semi-quantitatives par MS

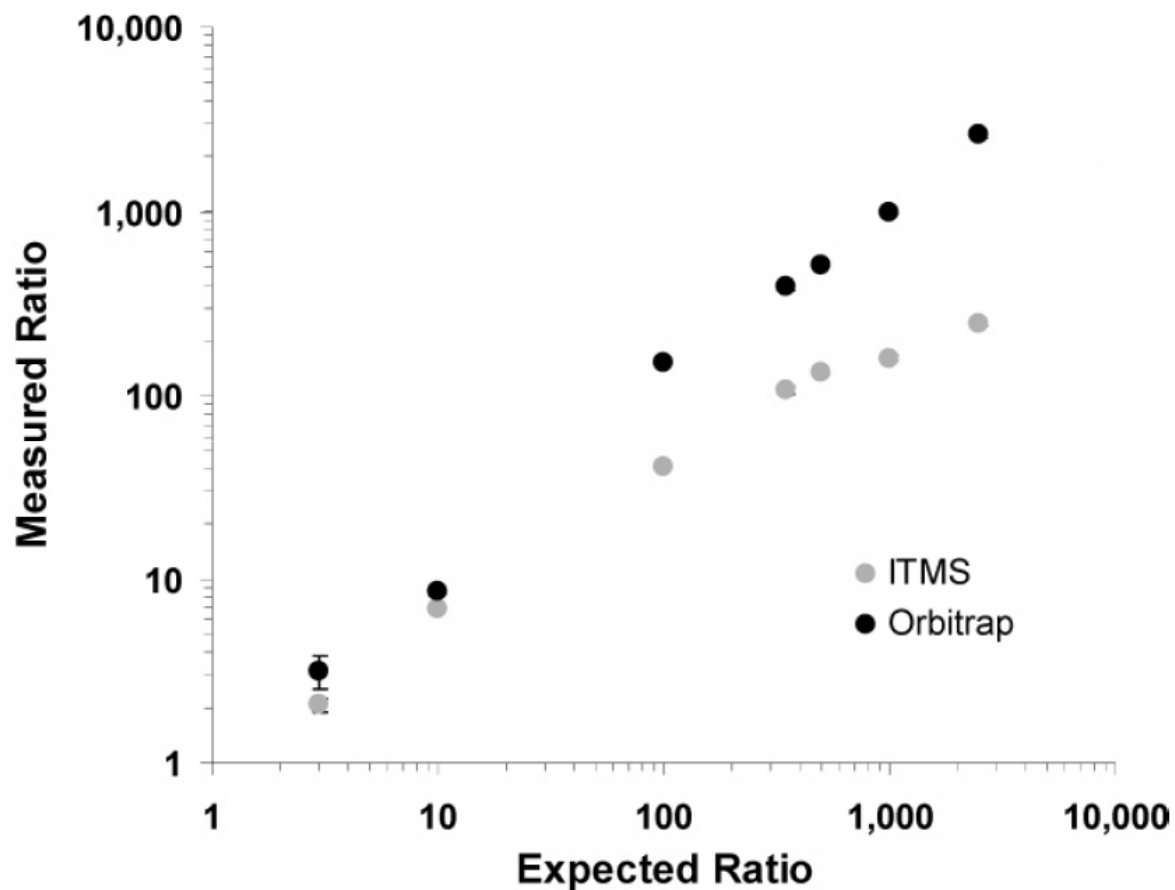
**Précision, justesse... des mesures quantitatives**

Analyses protéomiques ciblées

Quantification relative ... et absolue en 'label free'

# Gamme dynamique des mesures quantitatives

## Gamme dynamique au sein d'un même scan MS (marquage)

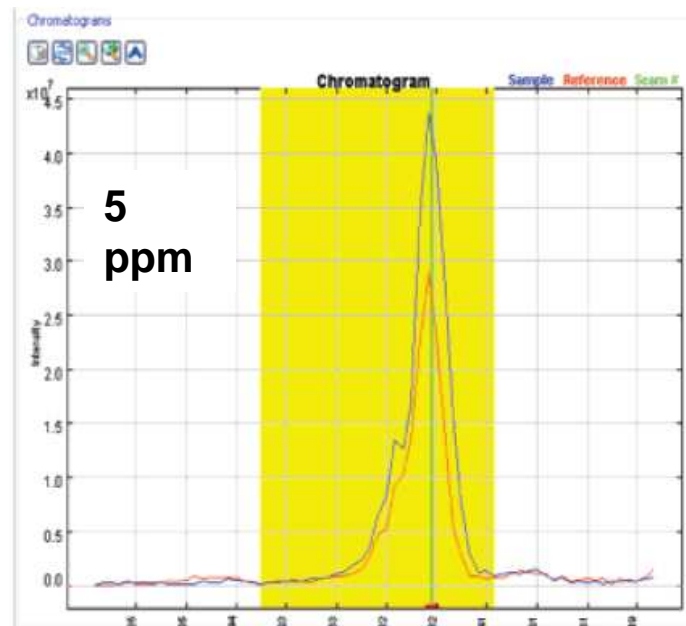
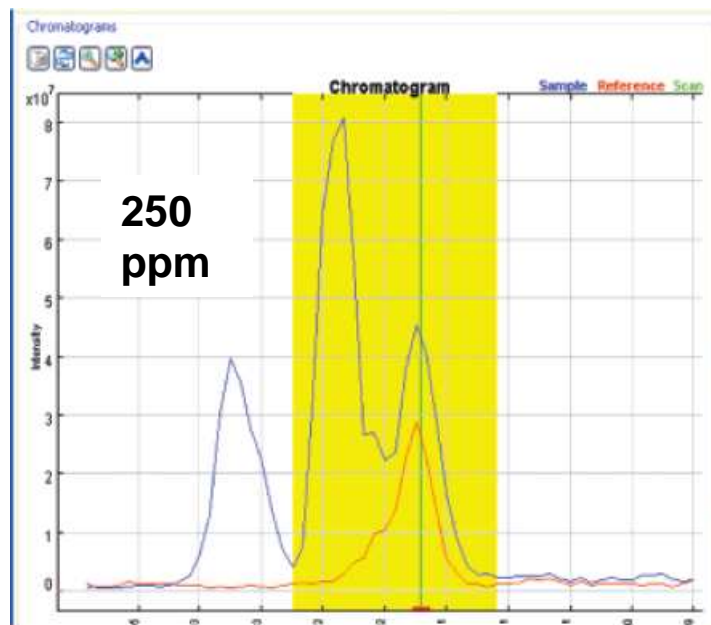
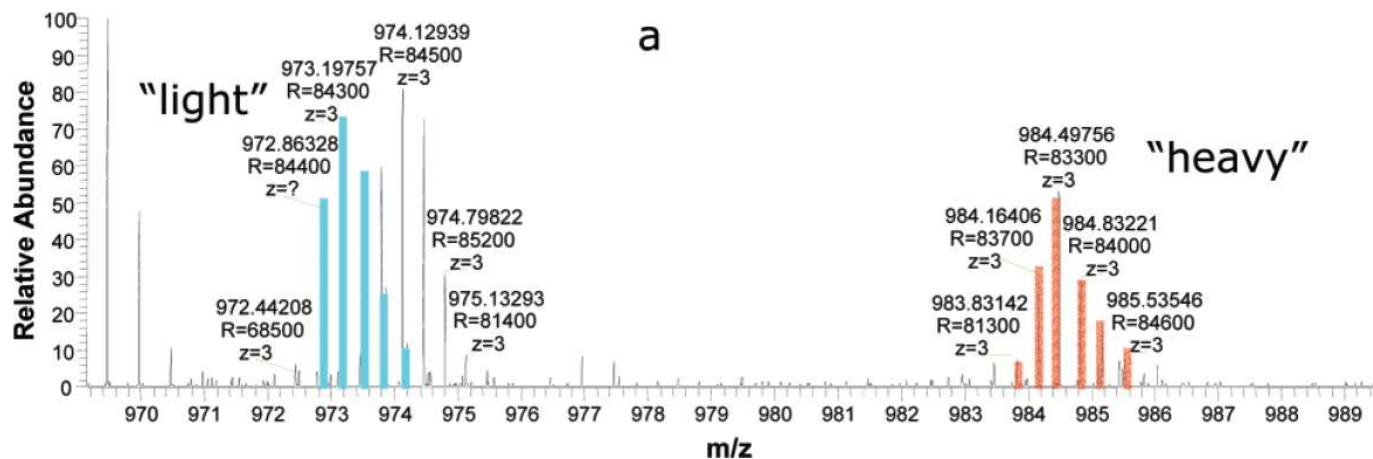


A partir de 10:1, rapports sous-estimés par analyse sur le LTQ.

Gamme dynamique avec le LTQ-Orbitrap : au moins 2500.

# Précision et justesse des mesures quantitatives

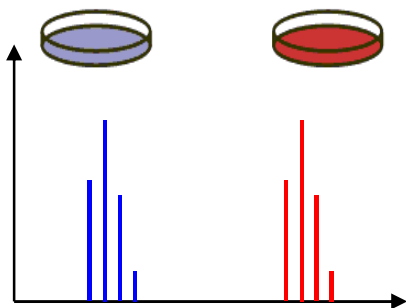
## Effet de la haute précision de mesure de masse



# Précision et justesse des mesures quantitatives

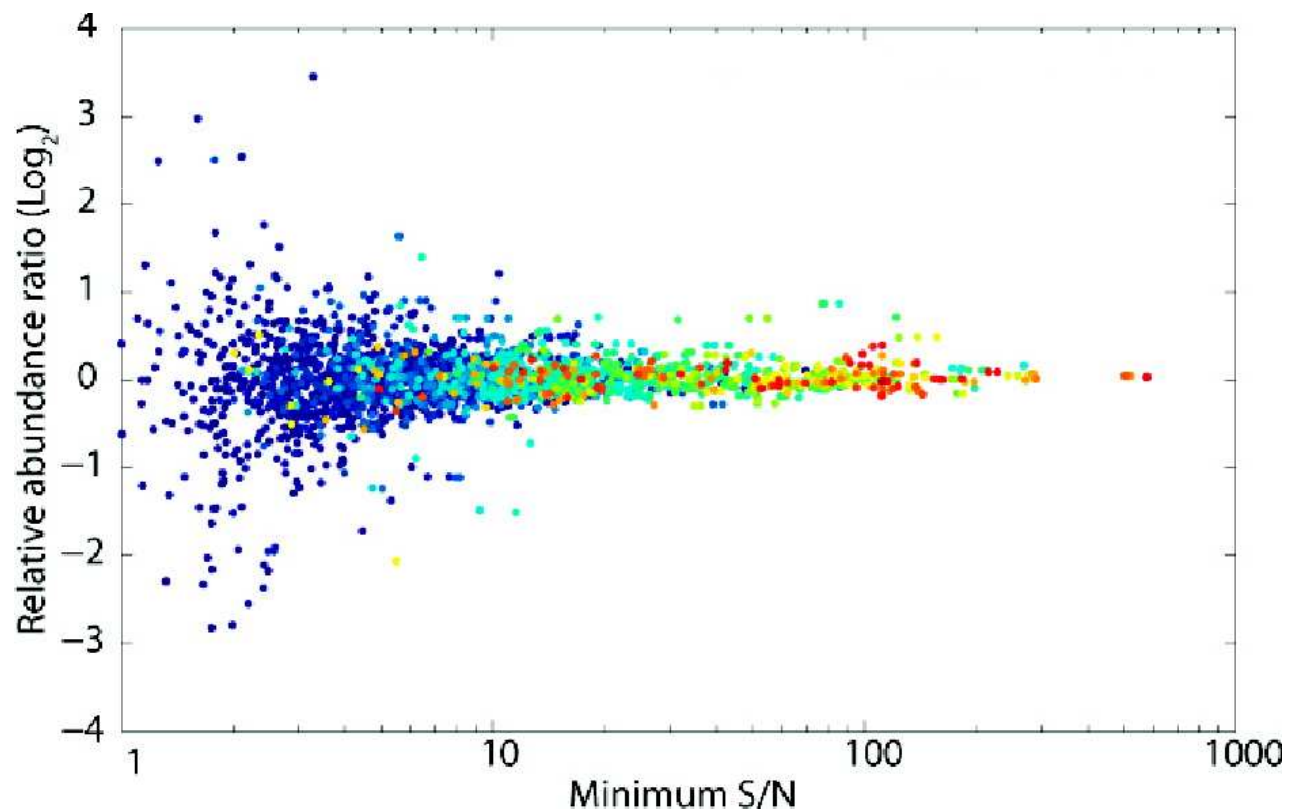
## Corrélation avec le rapport signal sur bruit (S/B)

Codage des Arg et Lys



Mélange 1:1

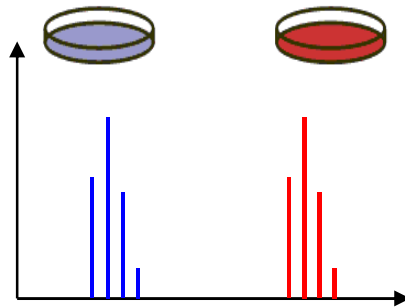
~1/3 des ions à S/B < 5



# Précision des mesures quantitatives

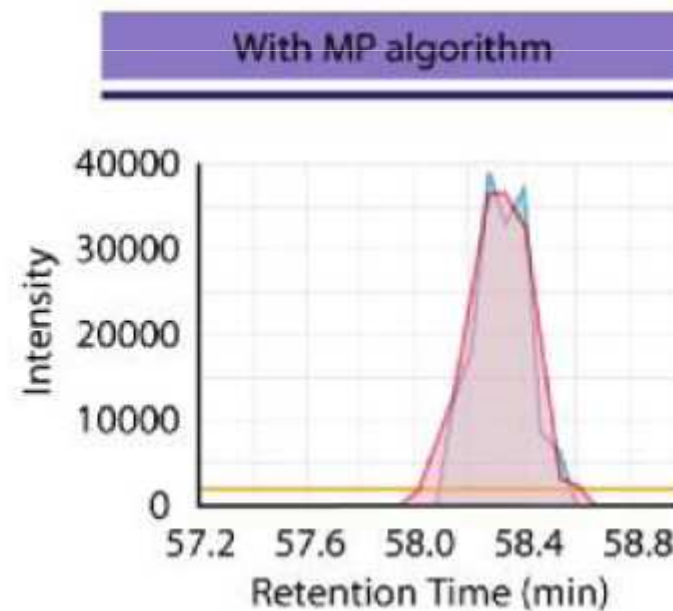
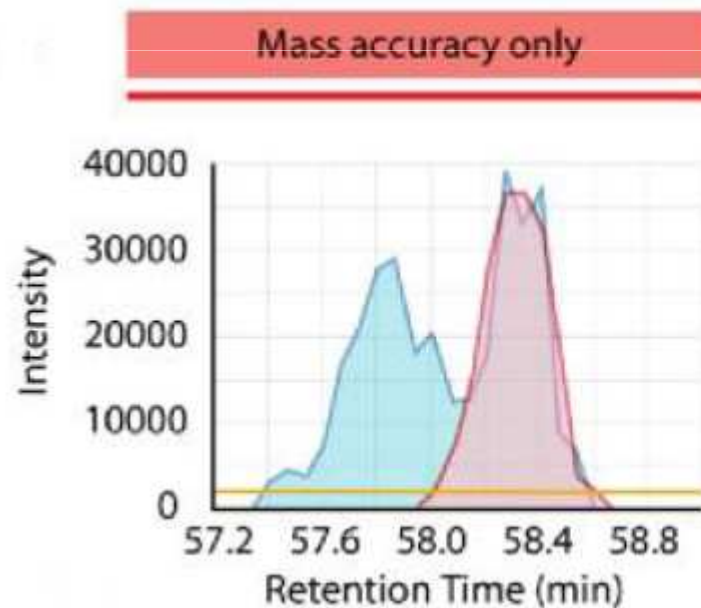
La haute précision de mesure de masse pour séparer le signal du bruit...

Codage des Arg et Lys



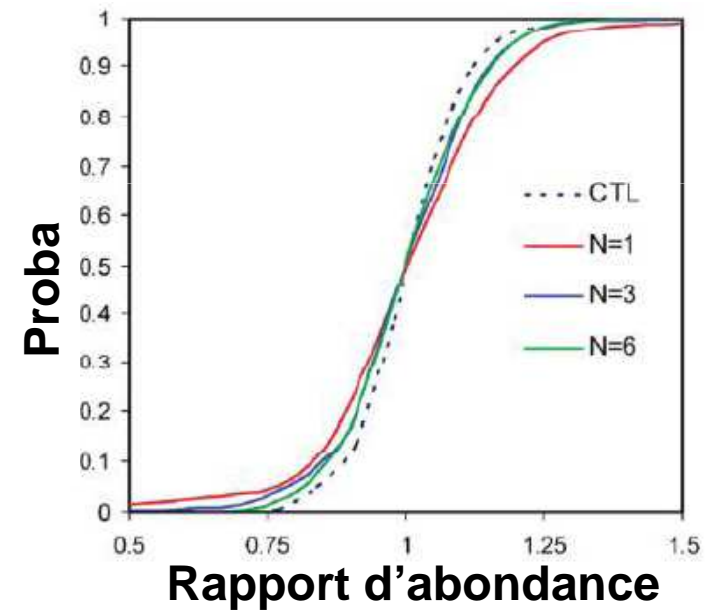
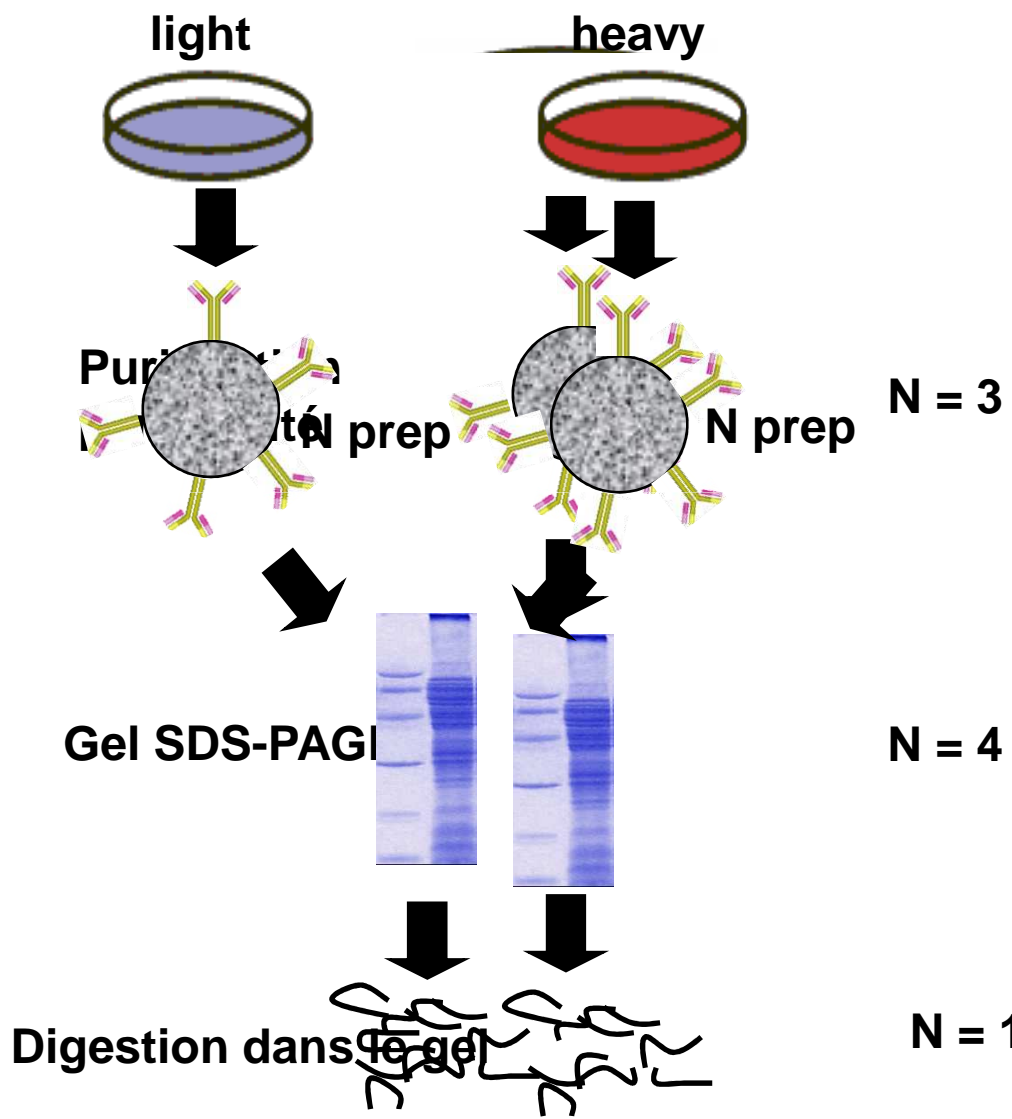
$\Delta m(\text{Heavy-Light})$  est plus constant que  $\Delta m(\text{exp-th})$  pour chaque espèce peptidique

⇒ Développement d'un algorithme, Mass Precision (MP) pour réduire davantage la contamination des XICs par des espèces quasi isobares.



# Impact des manipulations d'échantillons avant l'analyse MS

Quel rapport d'abondance est significatif d'une différence ?



Rappels sur les analyses semi-quantitatives par MS

Précision, justesse... des mesures quantitatives

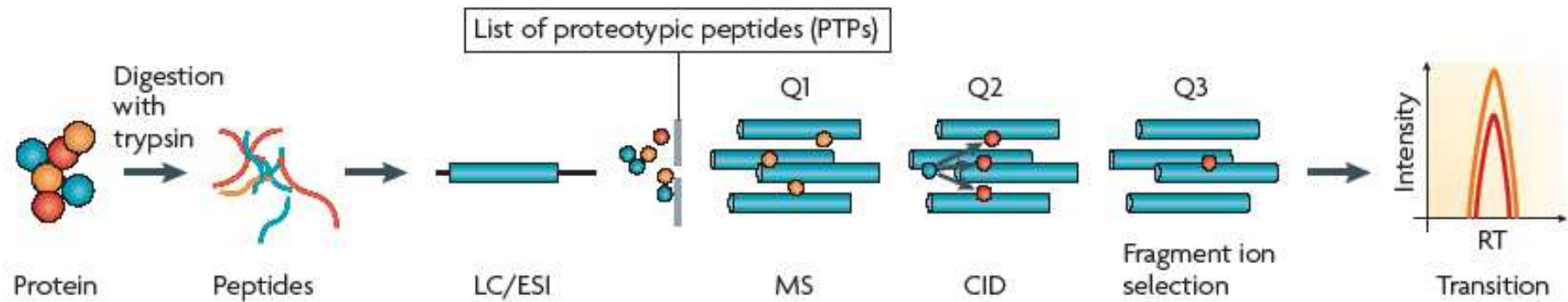
**Analyses protéomiques ciblées**

Quantification relative ... et absolue en 'label free'

# Analyses protéomiques ciblées



# Analyses protéomiques ciblées : analyses par SRM/MRM

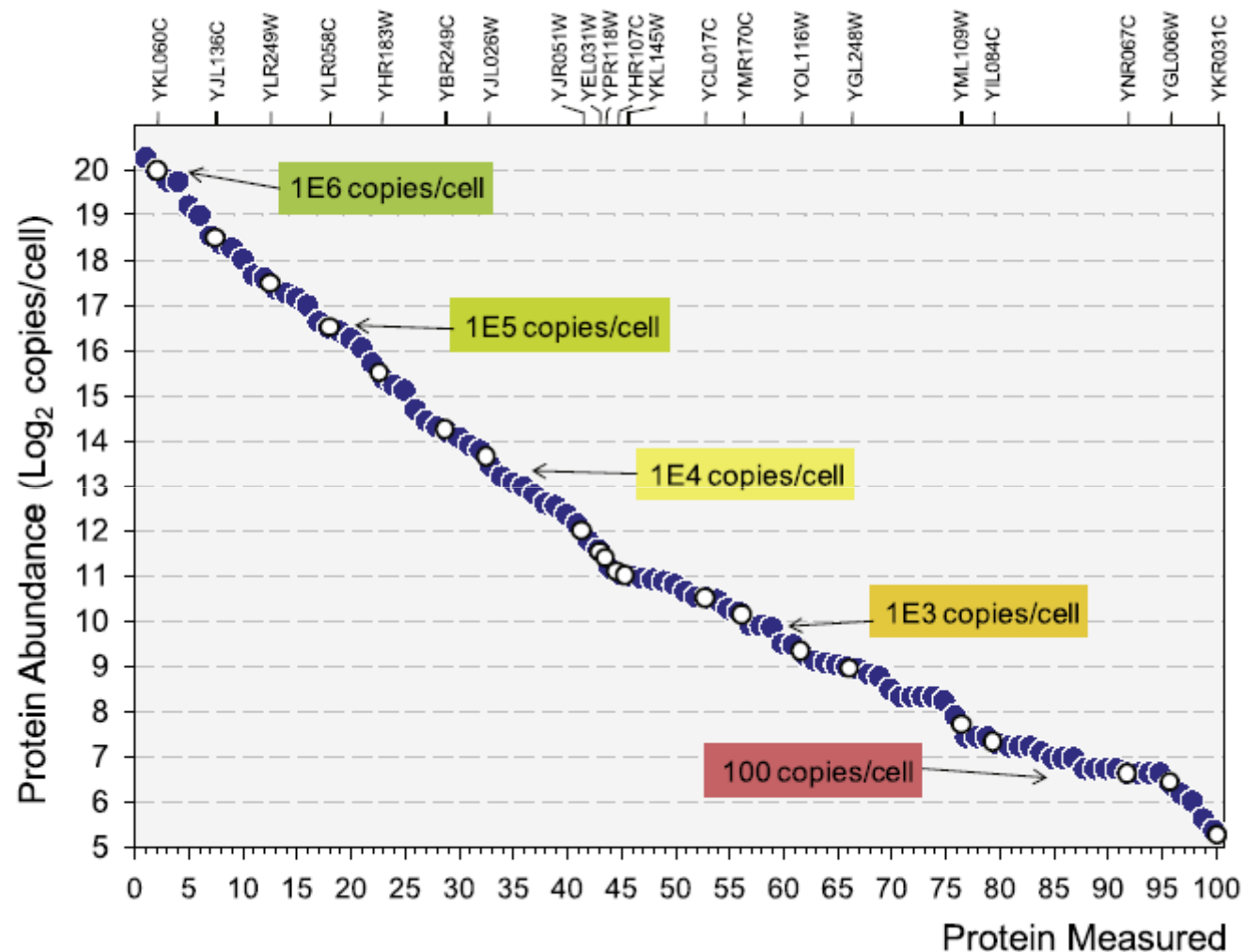


**Pour chaque protéine à quantifier : sélection de peptides protéotypiques, *i.e.* séquences spécifiques de cette protéine et bien identifiables par MS.**

**Détection de paires précurseur-fragments (transitions) spécifiques de chaque peptide protéotypique.**

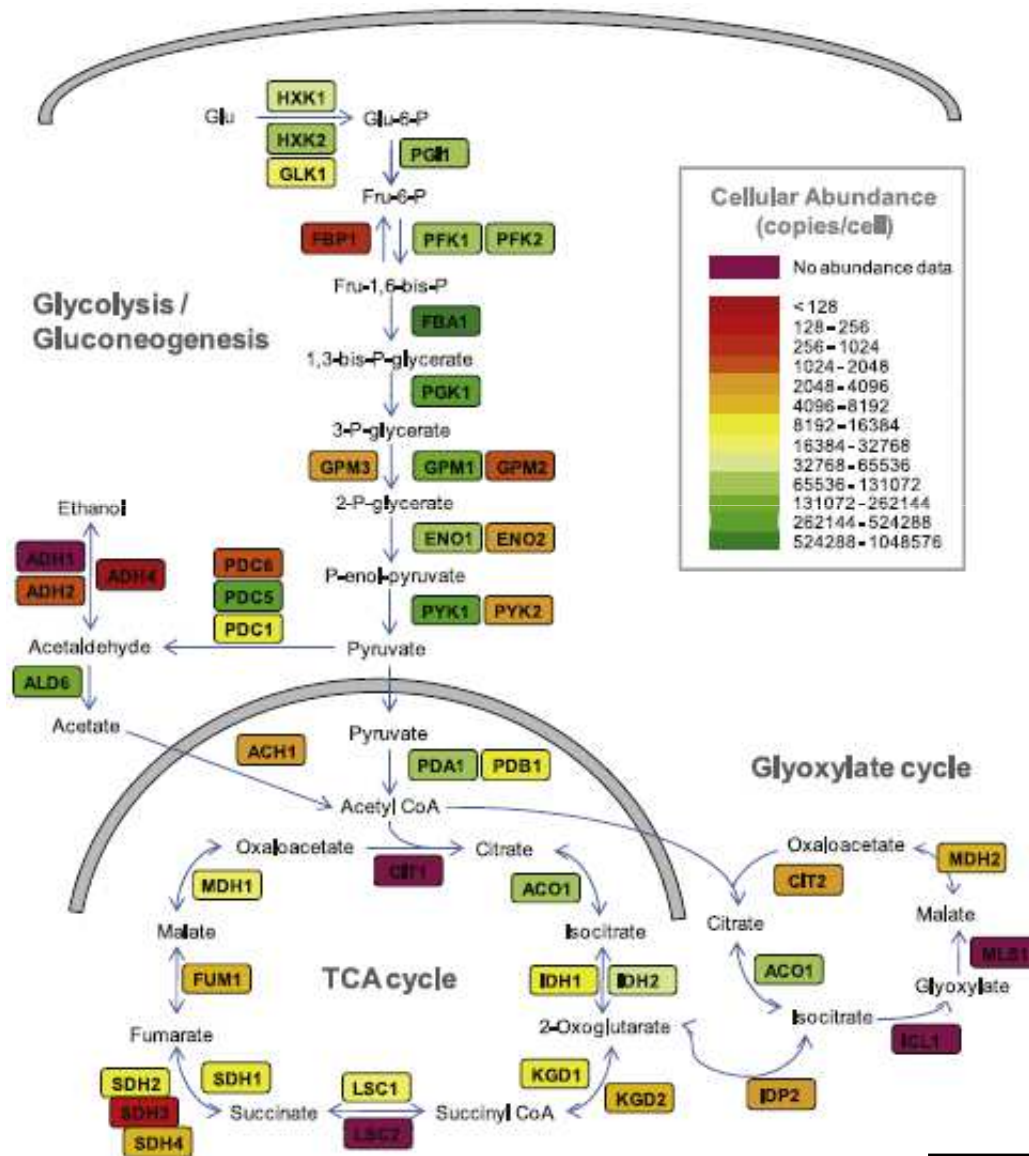
## Analyses protéomiques ciblées : quelle couverture du protéome ?

Abondances  
déterminées  
par WB  
quantitatif



Quantification absolue de certaines protéines (SRM de peptides marqués) :  
confirmation de la possibilité de quantifier des protéines entre  $\sim 40$  et  $\sim 10^6$   
copies par cellule.

# Analyses protéomiques ciblées : protéines impliquées dans le métabolisme du carbone



Gradient LC de 30 min

Quantification par :

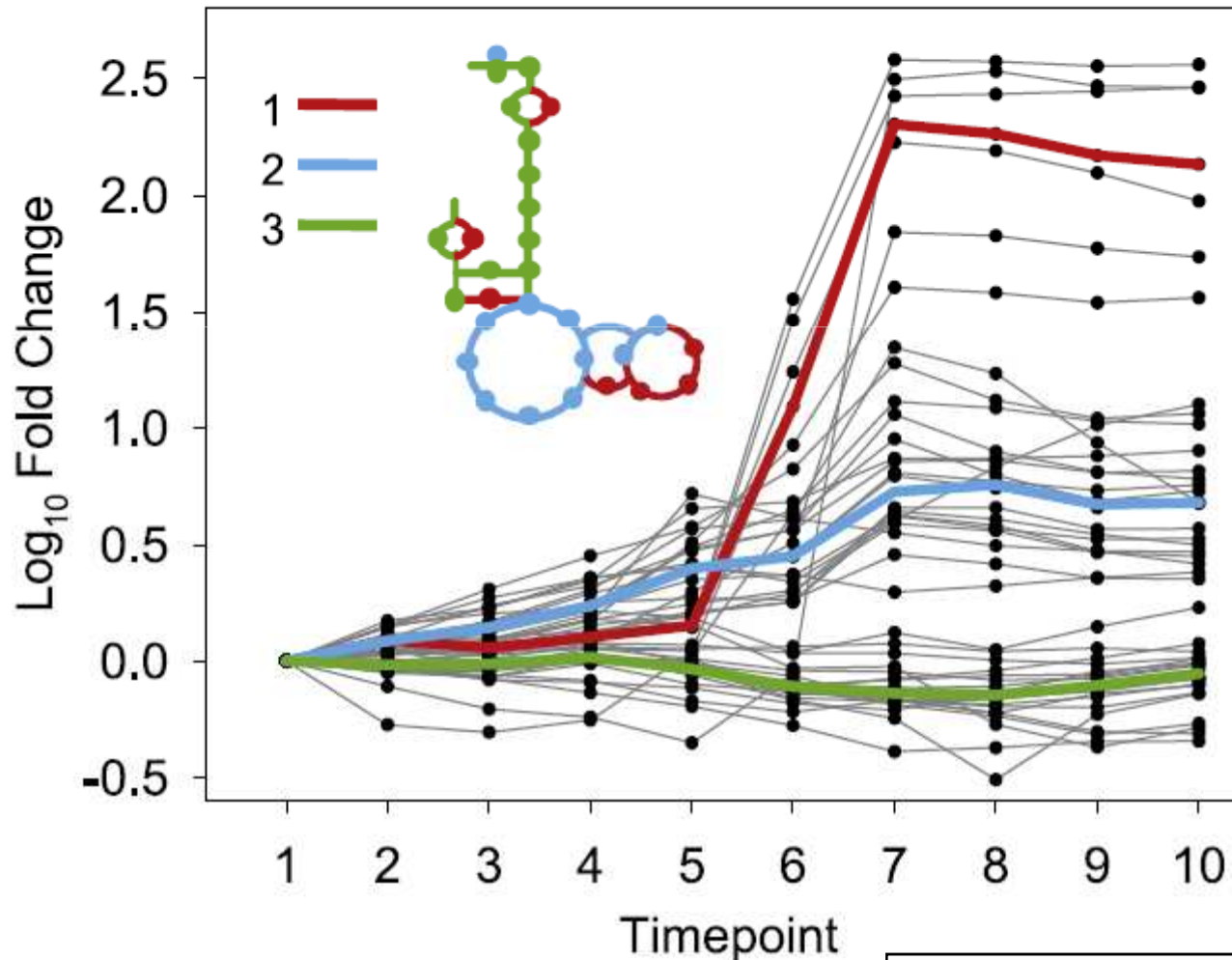
- 2 pept/protéine

- trois transitions SRM

- 8 points de mesure

# Profils d'abondances protéiques au cours d'un changement de source de carbone

Croissance exponentielle en glucose => fermentation en éthanol



Rappels sur les analyses semi-quantitatives par MS

Précision, justesse... des mesures quantitatives

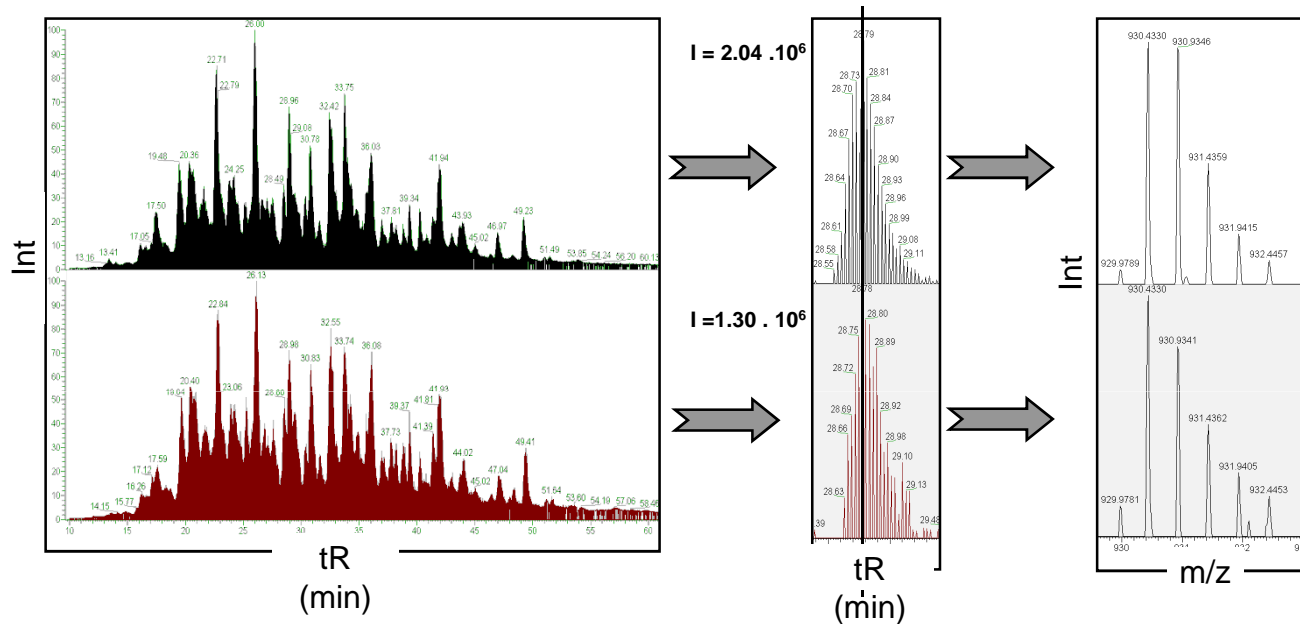
Analyses protéomiques ciblées

**Quantification relative ... et absolue en 'label free'**

# Quantification relative en 'label free'

**'Label-free':**

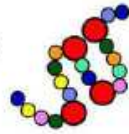
- comparaison des aires des pics chromatographiques



- 'spectral counting' : nombre de peptides identifiant une protéine, normalisé par rapport à la masse de la protéine

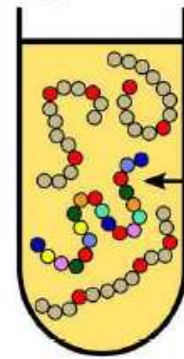
# Quantification absolue ... avec marquage isotopique

PSAQ standard  
(isotope-labeled protein)



● ARG or LYS

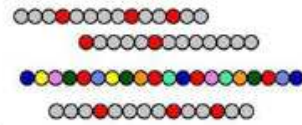
● Stable isotope-labeled ARG or LYS



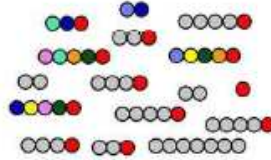
Target protein in  
a body fluid

Sample  
prefractionation

QconCAT standard  
(isotope-labeled concatamer of  
proteotypic peptides)



Digestion with  
trypsin

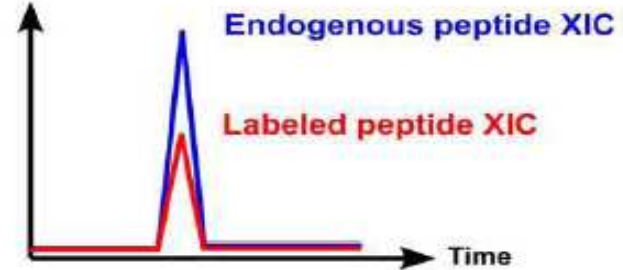


AQUA standard  
(isotope-labeled proteotypic peptide)

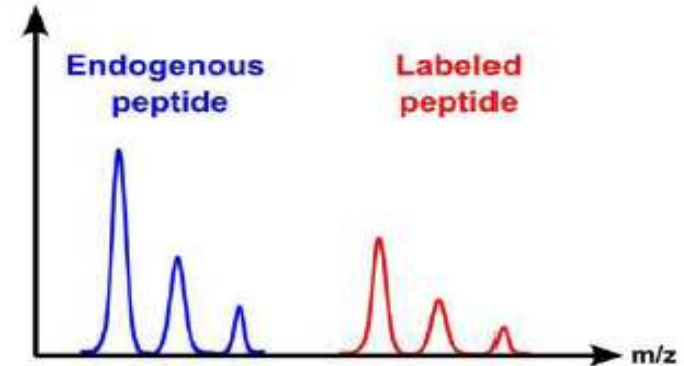


Liquid chromatography and  
mass spectrometry analysis

Signal  
intensity



Signal  
intensity



## Quantification absolue et 'label free'

< Int MS top 3 peptides >  $\propto$  abondance absolue de la protéine

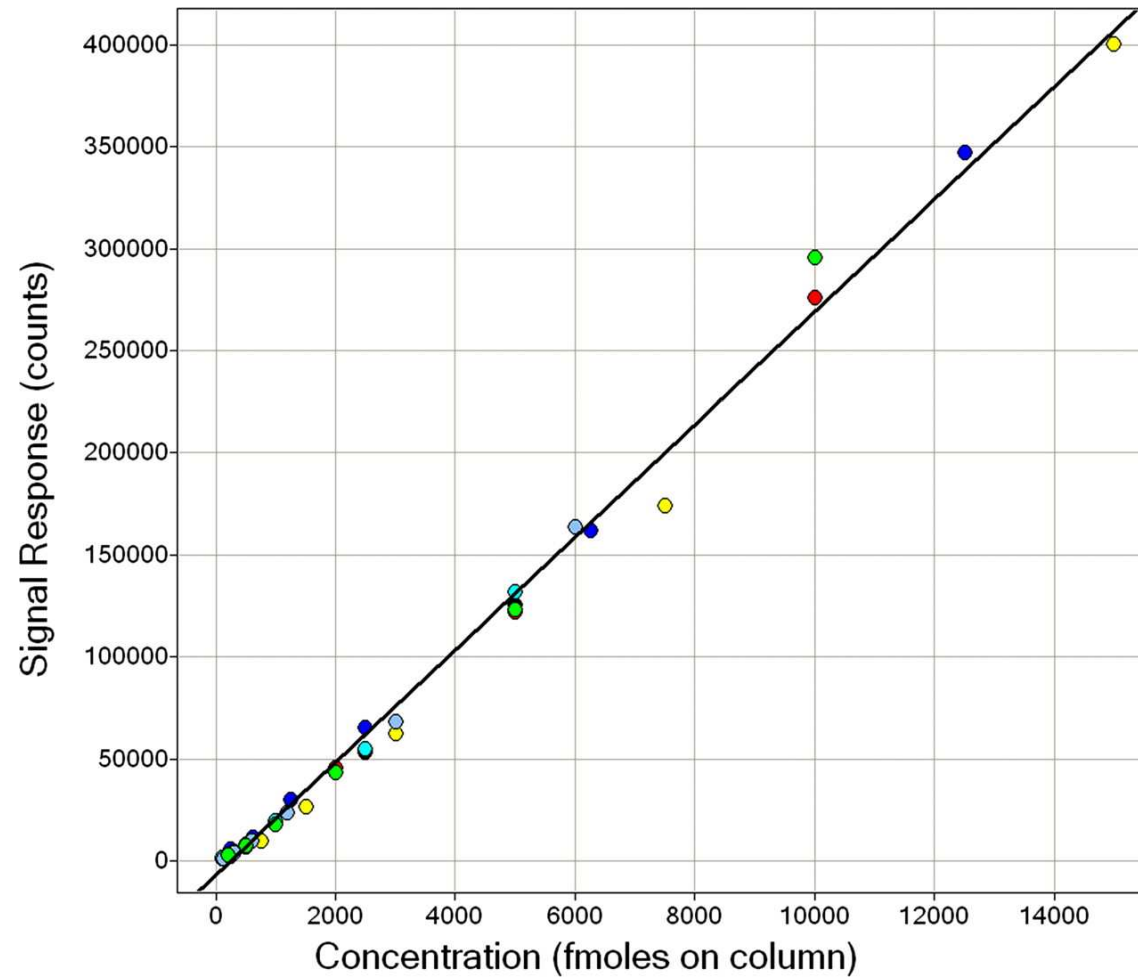


Les trois peptides les plus intenses qui cachent la forêt de peptides ...  
sont-ils bien représentatifs de toute la forêt ??

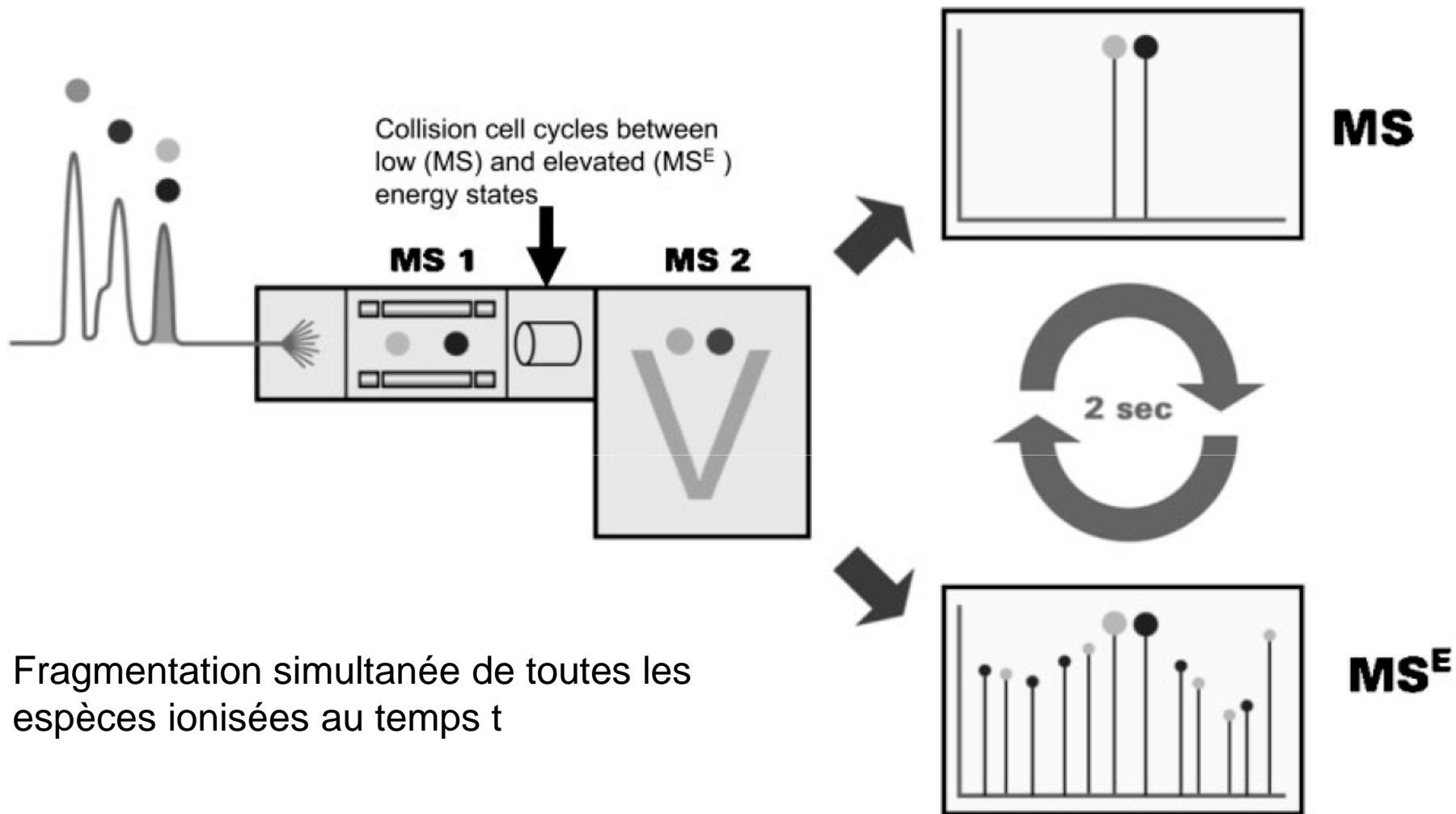
MCP 2006, 5, 144-156, Silva *et al.*

# Quantification absolue et label free

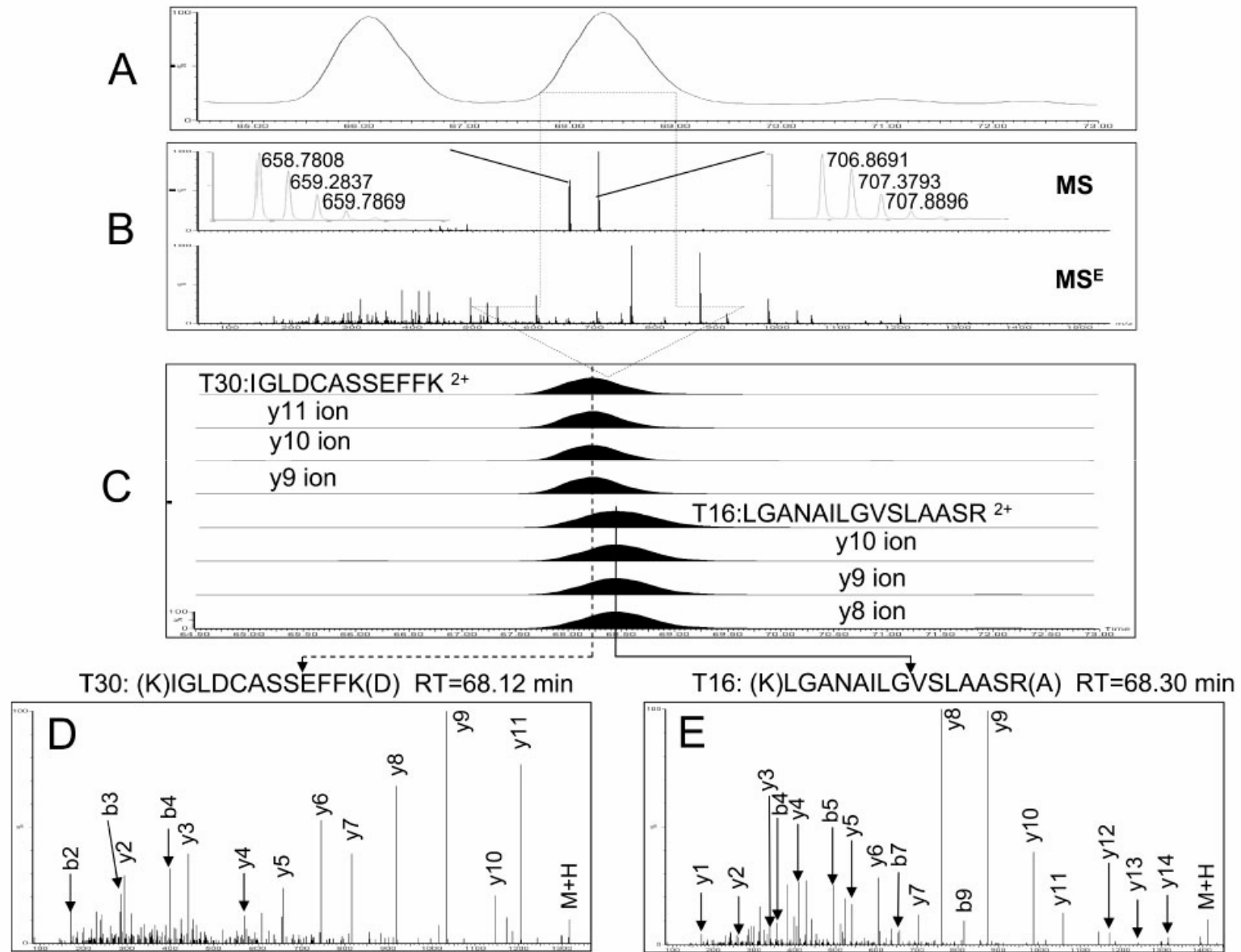
<Int MS top 3 peptides >  $\propto$  abondance absolue de la protéine



# Label free et fragmentation large bande MS-MS<sup>E</sup>



# Label free et fragmentation large bande MS-MSE

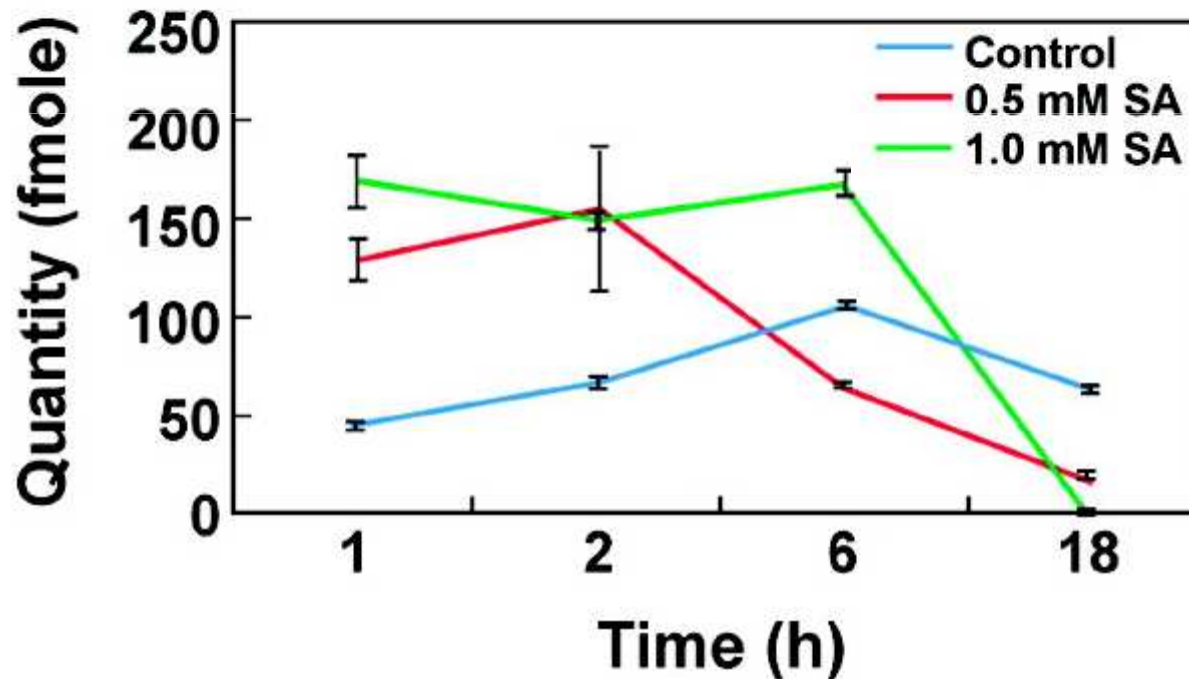


# Label free et quantification absolue

**Application** : suivi de la sécrétion de protéines dans la paroi cellulaire d'*A. thaliana* par stimulation à l'acide salicylique (AS)

**Etude bi-factorielle** : temps de stimulation (4 valeurs et 2 réplicats)  
concentration en AS appliquée (3 valeurs)

## Peroxidase 34



# Label free et quantification absolue

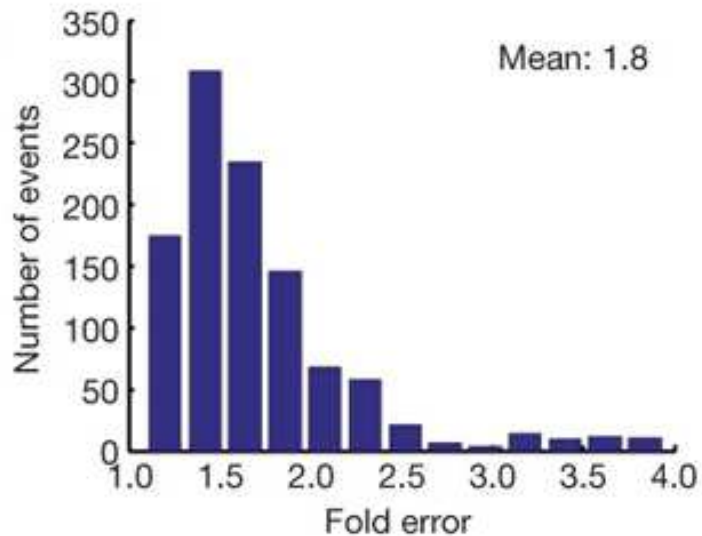
## Quantification absolue en 'label free' : quelle erreur par rapport au SRM ?

### Deux méthodes :

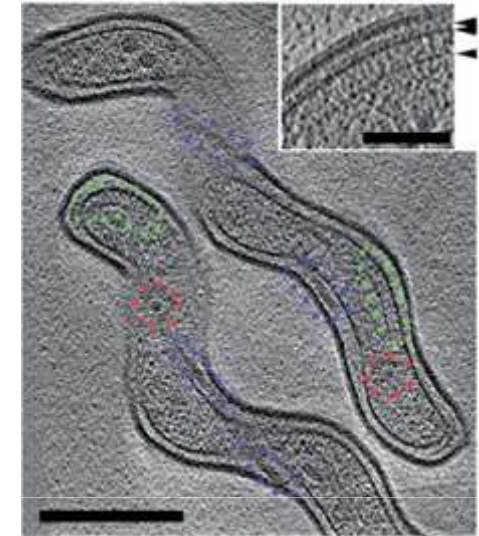
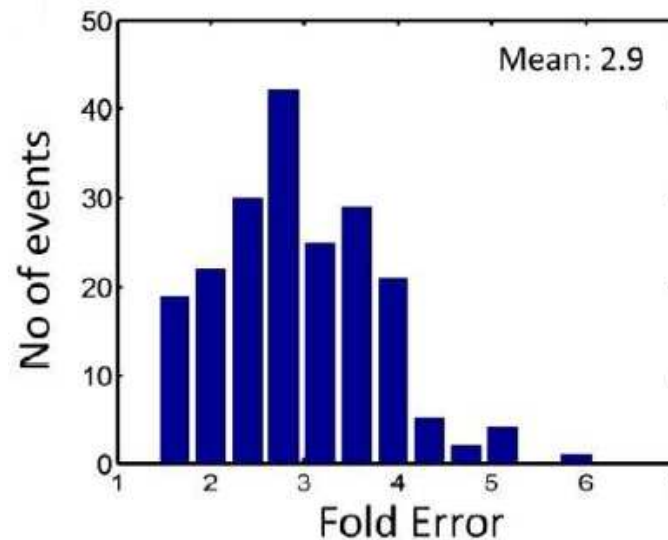
- intensité moyenne des trois peptides les plus intenses ('3 peptides')
- spectral counting

### Comparaison à 19 protéines référence quantifiées par SRM (bootstrapping)

Erreur moyenne '3 peptides' :  
facteur 1,8



Erreur moyenne 'spectral counting' :  
facteur 2,9



200 nm

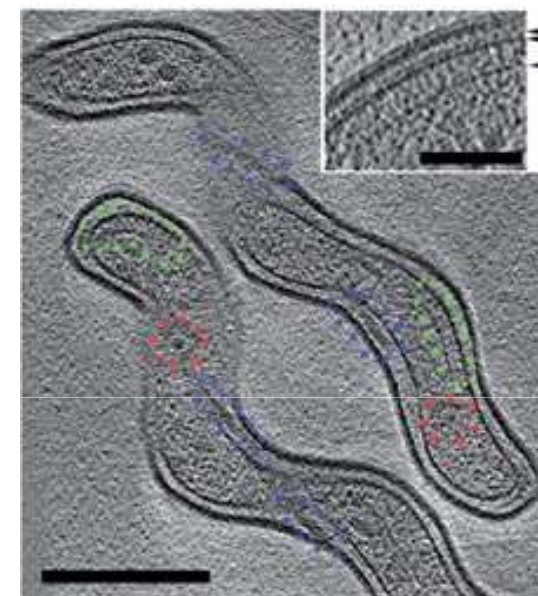
# Label free et quantification absolue

Quantification absolue de 51% des ORFs du pathogène *Leptospira interrogans* par la combinaison des deux méthodes 'label free'.

**Confrontation à une méthode orthogonale :  
cryo électro-tomographie.**

Mesure du nombre et de la taille de structures morphologiques de compositions protéiques connues (flagelle, récepteurs, quantité totale de protéine cellulaire).

**Méthode applicable en raison de la faible épaisseur de la cellule.**



200 nm

# Conclusions / Perspectives

■ **Marquage isotopique ou 'label free' ?**

■ **Traitements statistiques des données quantitatives**

**Problème des peptides de faible S/B ... des peptides portant des MPTs variables**

■ **Analyses ciblées : pour une quantification reproductible de protéines d'intérêt**

**=> Mesures quantitatives plus précises**