

Vers une caractérisation fine des protéines du cheveu

BARTHÉLEMY Nicolas,
Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique
Strasbourg

Protéines du cheveu : 2 niveaux de complexité

1) Modifications post-traductionnelles (PTMs)

→ PTMs naturelles induites enzymatiquement

↳ Méthylations (K, H), Transglutamination (liaison K-Q), Ubiquitination

→ PTMs chimiques induites par traitements ou expositions

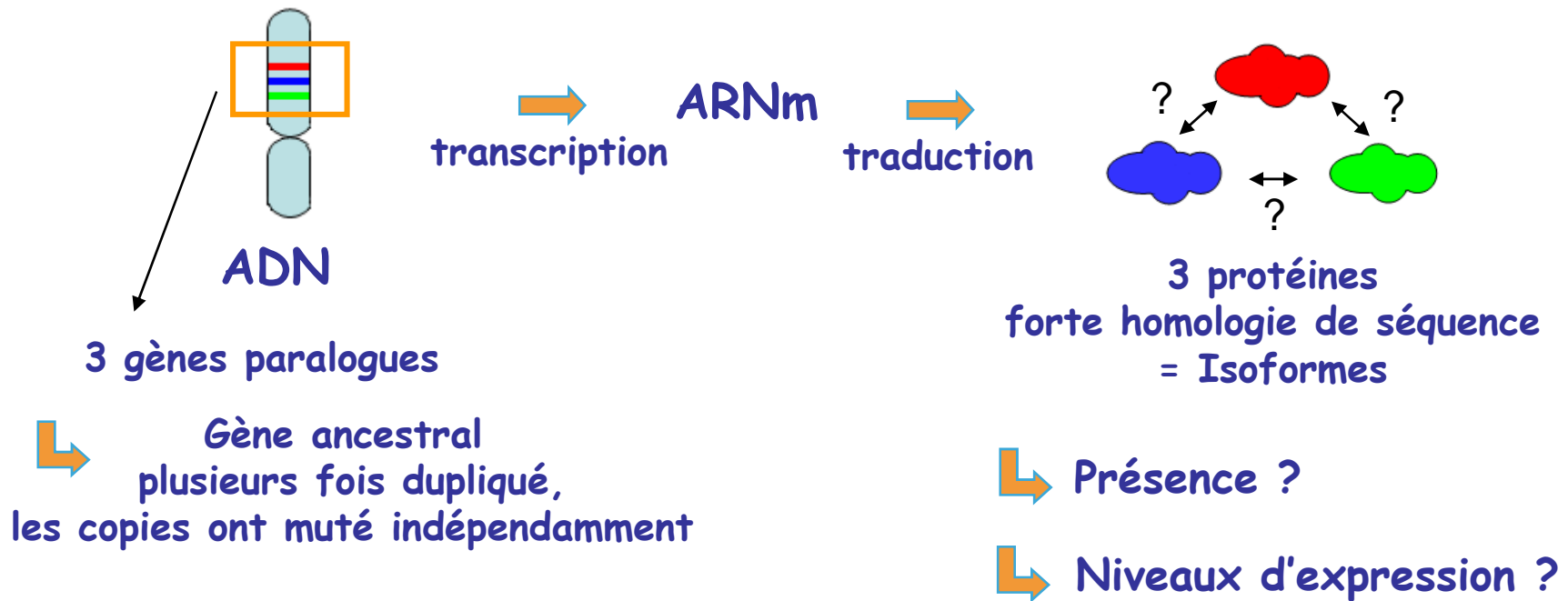
↳ Oxydations (C), Déamidations (Q, N)

↳ Formation de liaisons covalentes inter-chaines :
• lanthionine (C-C)
• lysino alanine (C-K)
• dityrosine (Y-Y)

↳ Dégradation des liaisons peptidiques

2) Mélange de familles de protéines isoformes

Protéines isoformes issues de familles multigéniques

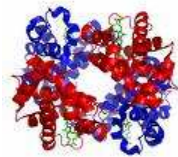


Les familles multigéniques sont nombreuses

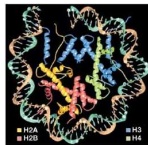
→ Grande variété d'exemples

↳ Protéines fonctionnelles

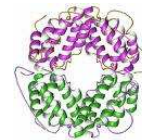
Hémoglobines



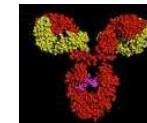
Histones



Interférons



Immunoglobulines



↳ Protéines de structure

Actines



Tubulines



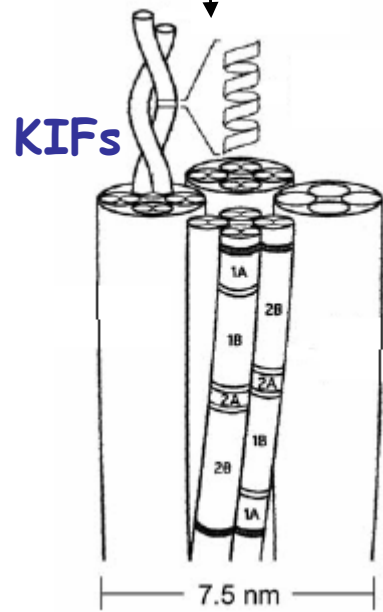
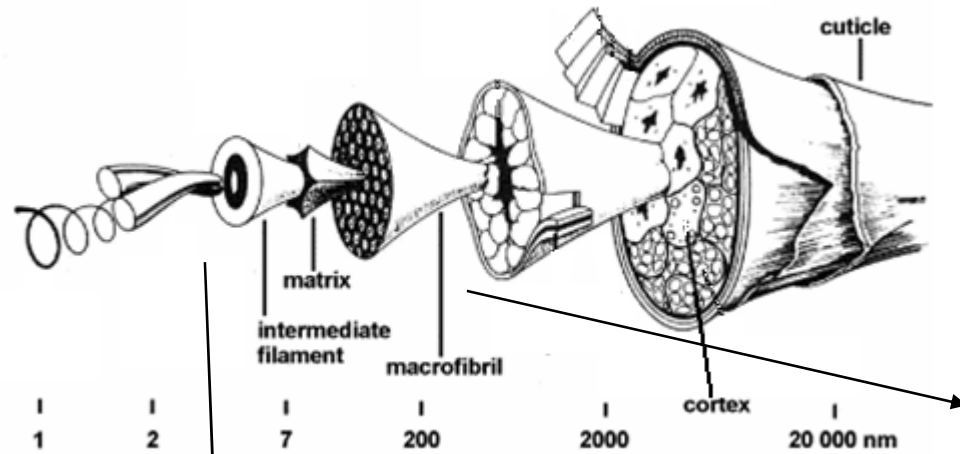
Collagènes



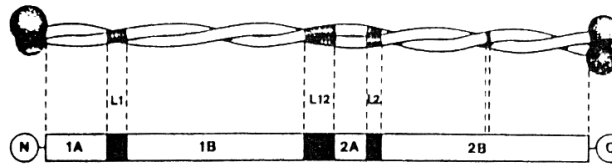
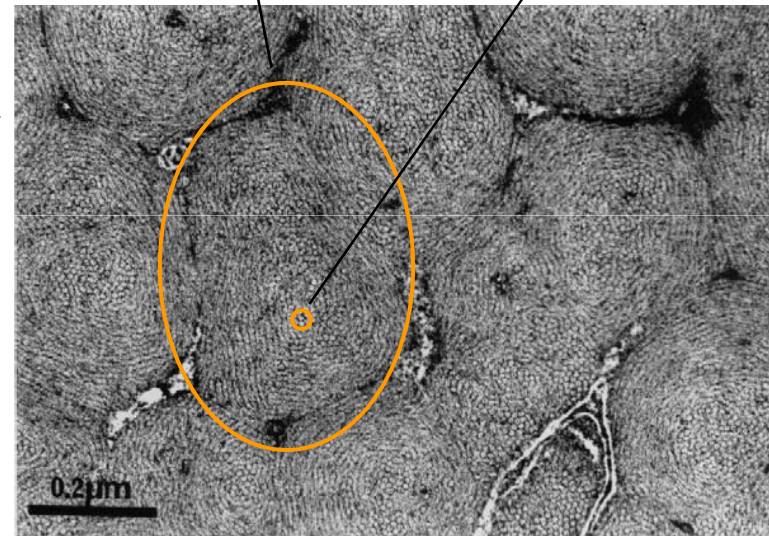
Kératines



Structure du cheveu

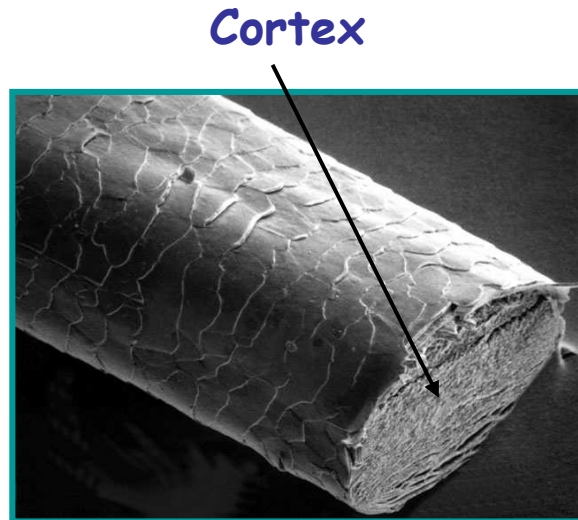


Macrofibrille
Filament intermédiaire de kératine (KIF)



Dimère de
kératines

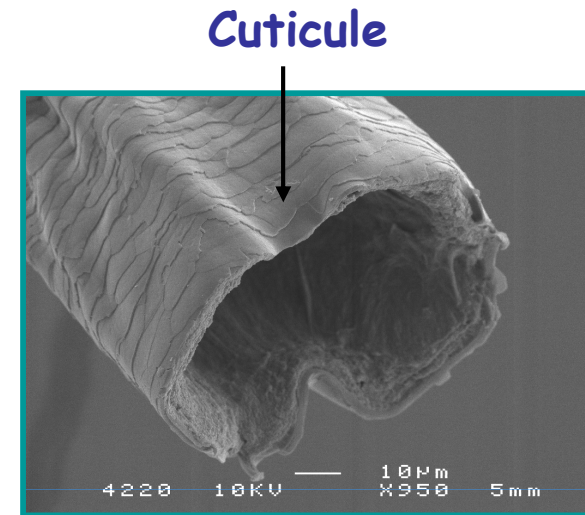
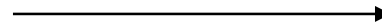
Extraction des protéines du cortex



Extraction
(tampon TrisHCl,
détergent CHAPS, Triton)

+

Réduction DTT



+

Cortex solubilisé

Homologie de séquence : un "rempart" à l'identification des isoformes

Isoformes des KAPs 2 :

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	129																																																																																																														
KAP2-1	H	T	G	S	C	C	G	S	T	F	S	S	L	S	Y	G	G	G	C	C	P	C	C	R	D	P	C	C	R	P	Y	T	C	Q	T	T	V	C	R	P	Y	T	C	V	P	R	C	T	R	P	I	C	E	P	C	R	R	P	Y	C	D	P	C	S	L	Q	E	G	C	C	R	P	I	T	C	C	P	S	S	C	T	A	V	V	C	R	P	C	C	H	A	T	T	C	C	Q	P	V	S	V	Q	S	P	C	R	P	-	P	C	G	Q	P	T	P	C	S	T	T	C	R	T	S	S	C
KAP2-4	H	T	G	S	C	C	G	S	T	L	S	S	L	S	Y	G	G	C	C	P	C	C	R	I	P	C	C	C	R	P	Y	T	C	Q	T	T	V	C	R	P	Y	T	C	V	P	R	C	T	R	P	I	C	E	P	C	R	R	P	Y	C	D	P	C	S	L	Q	E	G	C	C	R	P	I	T	C	C	P	S	S	C	T	A	V	V	C	R	P	C	C	H	A	T	T	C	C	Q	P	V	S	V	Q	S	P	C	R	P	-	P	C	G	Q	P	T	P	C	S	T	T	C	R	T	S	S	C
KAP2-3	H	T	G	S	C	C	G	S	T	L	S	S	L	S	Y	G	G	C	C	P	C	C	R	I	P	C	C	C	R	P	Y	T	C	Q	T	T	V	C	R	P	Y	T	C	V	P	R	C	T	R	P	I	C	E	P	C	R	R	P	Y	C	D	P	C	S	L	Q	E	G	C	C	R	P	I	T	C	C	P	S	S	C	T	A	V	V	C	R	P	C	C	H	A	T	T	C	C	Q	P	V	S	V	Q	S	P	C	R	P	-	P	C	G	Q	P	T	P	C	S	T	T	C	R	T	S	S	C
KAP2-2	H	T	G	S	C	C	G	S	T	F	S	S	L	S	Y	G	G	C	C	P	C	C	R	D	P	C	C	C	R	P	Y	T	C	Q	T	T	V	C	R	P	Y	T	C	V	P	R	C	T	R	P	I	C	E	P	C	R	R	P	Y	C	D	P	C	S	L	Q	E	G	C	C	R	P	I	T	C	C	P	S	S	C	T	A	V	V	C	R	P	C	C	H	A	T	T	C	C	Q	P	V	S	V	Q	S	P	C	R	P	-	P	C	G	Q	P	T	P	C	S	T	T	C	R	T	S	S	C
KAP2-X	H	T	G	S	C	C	G	S	T	F	S	S	L	S	Y	G	G	C	C	P	C	C	R	D	P	C	C	C	R	P	Y	T	C	Q	T	T	V	C	R	P	Y	T	C	V	P	R	C	T	R	P	I	C	E	P	C	R	R	P	Y	C	D	P	C	S	L	Q	E	G	C	C	R	P	I	T	C	C	P	S	S	C	T	A	V	V	C	R	P	C	C	H	A	T	T	C	C	Q	P	V	S	V	Q	S	P	C	R	P	-	P	C	G	Q	P	T	P	C	S	T	T	C	R	T	S	S	C
Consensus	H	T	G	S	C	C	G	S	T	F	S	S	L	S	Y	G	G	C	C	P	C	C	R	D	P	C	C	C	R	P	Y	T	C	Q	T	T	V	C	R	P	Y	T	C	V	P	R	C	T	R	P	I	C	E	P	C	R	R	P	Y	C	D	P	C	S	L	Q	E	G	C	C	R	P	I	T	C	C	P	S	S	C	T	A	V	V	C	R	P	C	C	H	A	T	T	C	C	Q	P	V	S	V	Q	S	P	C	R	P	-	P	C	G	Q	P	T	P	C	S	T	T	C	R	T	S	S	C



Un recouvrement moyen ne suffit pas à caractériser un mélange d'isoformes



Tendre vers 100% de recouvrement protéique



Cibler les peptides **protéotypiques**
(= discriminants des isoformes)

Stratégie Shotgun



Extrait
Cortical



 Digestion enzymatique

S'affranchir des problèmes
de séparation des isoformes

Stratégie Shotgun



Extrait
Cortical



 Digestion enzymatique :
trypsine, chymotrypsine ou GluC

Augmenter le nombre de peptides
protéotypiques

Stratégie Shotgun



Extrait
Cortical



 Digestion enzymatique :
trypsine, chymotrypsine ou GluC



Préfractionnement LC
Phase inverse C18 pH basique



Analyse offline des collectes
en nanoLC-MS/MS (C18 pH acide)

Minimiser les risques
de coélution des peptides

Stratégie Shotgun



Extrait
Cortical



 Digestion enzymatique :
trypsin, chymotrypsine ou GluC

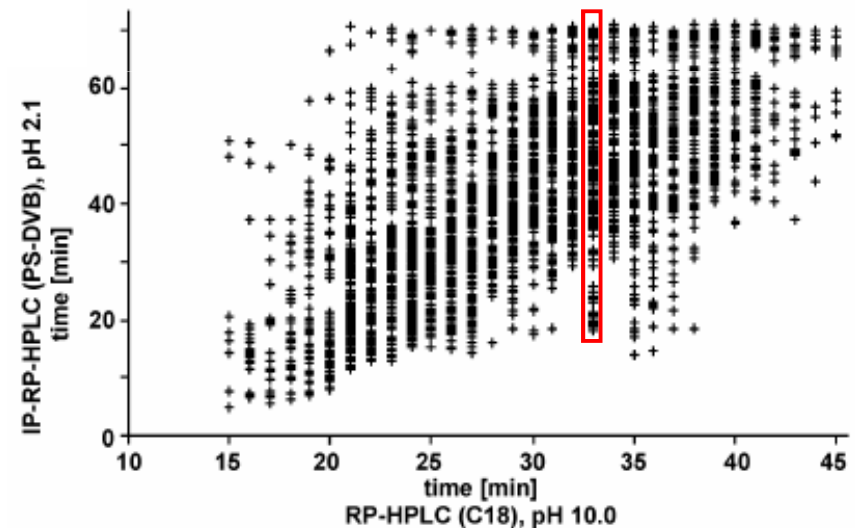
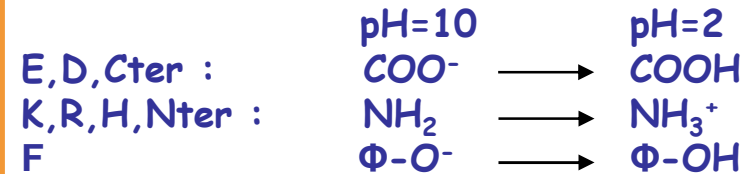


Préfractionnement LC
Phase inverse C18 pH basique



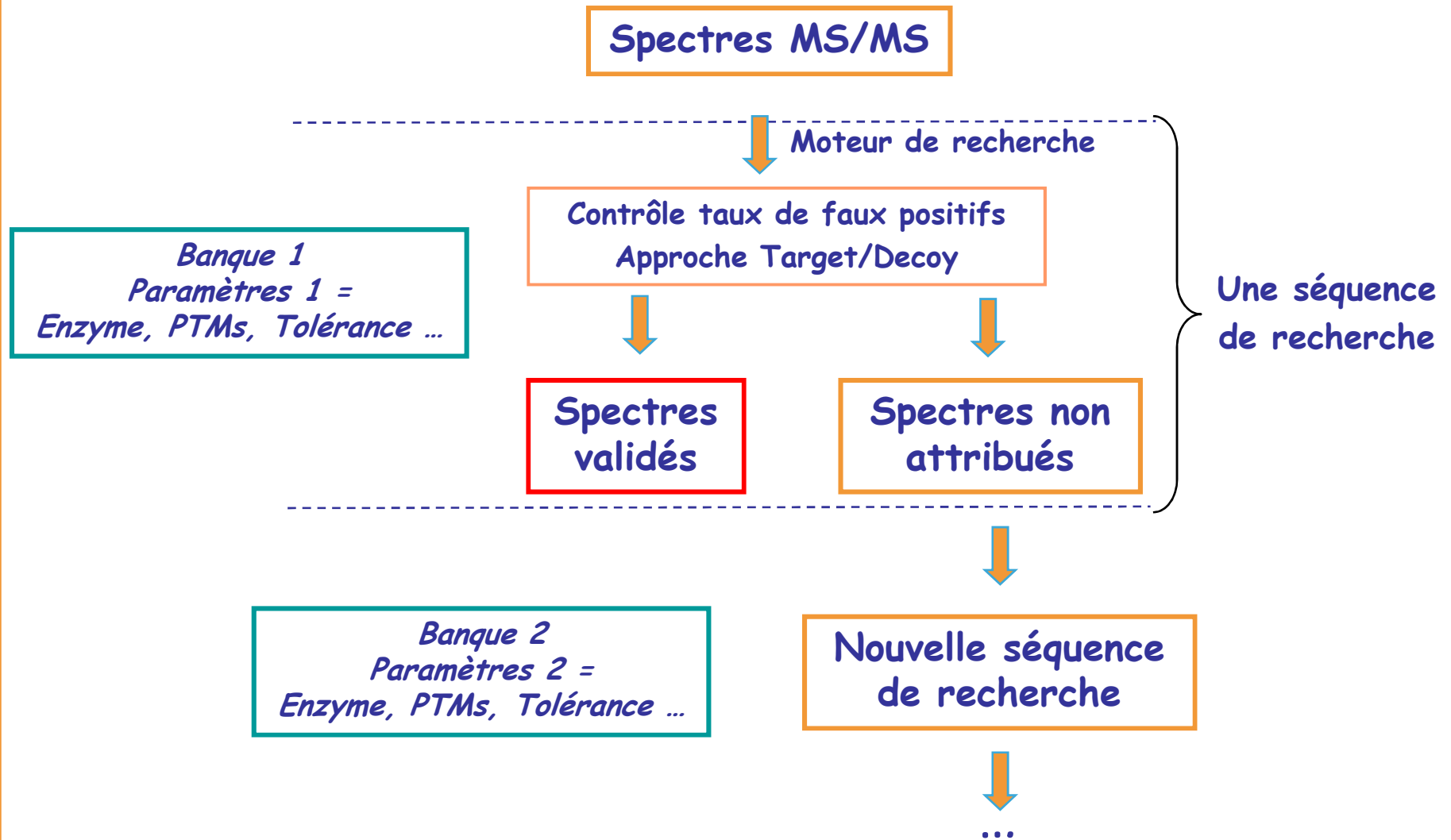
Analyse offline des collectes
en nanoLC-MS/MS (C18 pH acide)

Modification de l'hydrophobicité
des peptides :



N. Delmotte et al., *J. Proteome Res.* 2006, 5, 2760-68

Analyse séquentielle des données MS/MS



Analyse séquentielle des données MS/MS

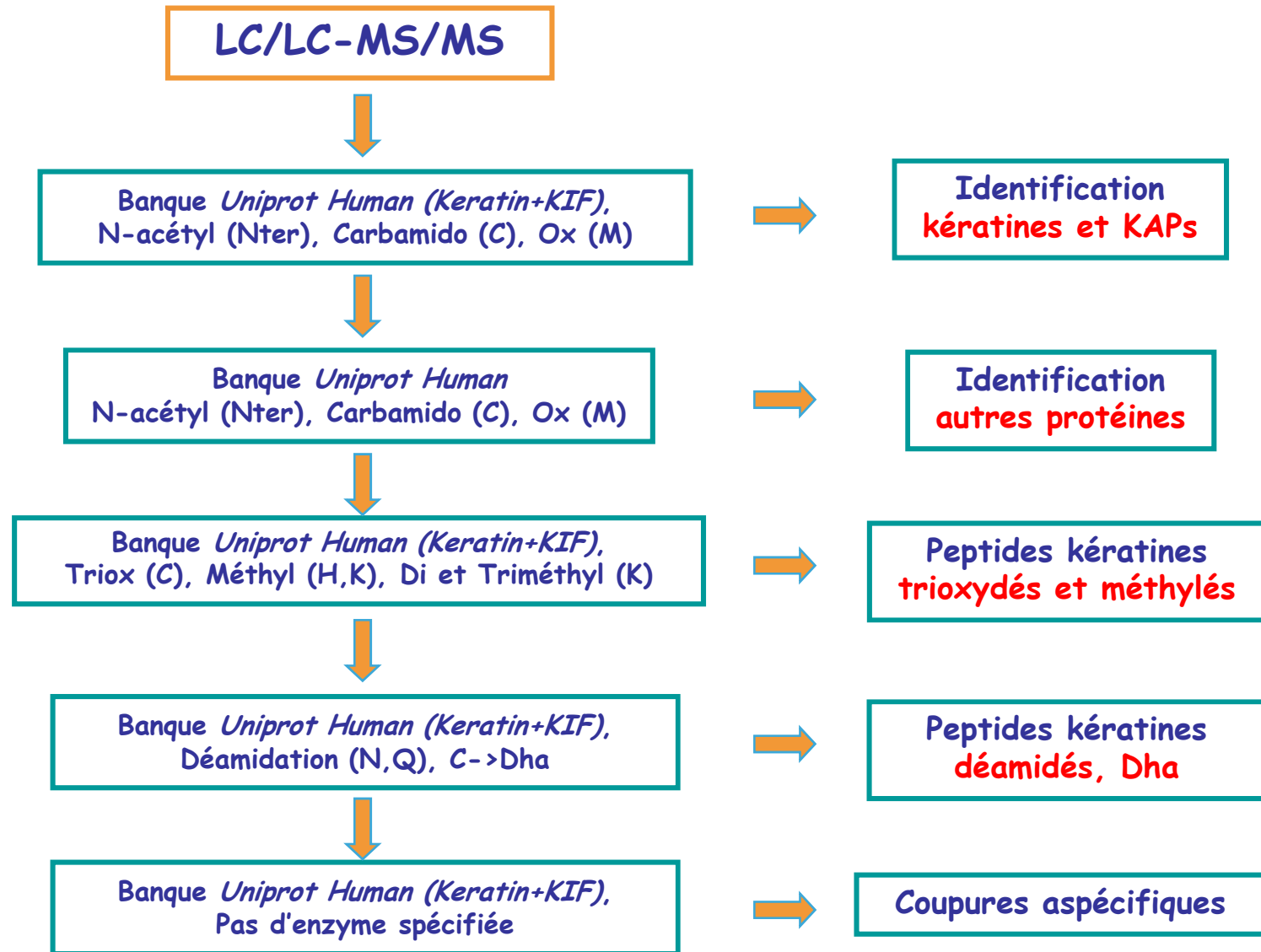
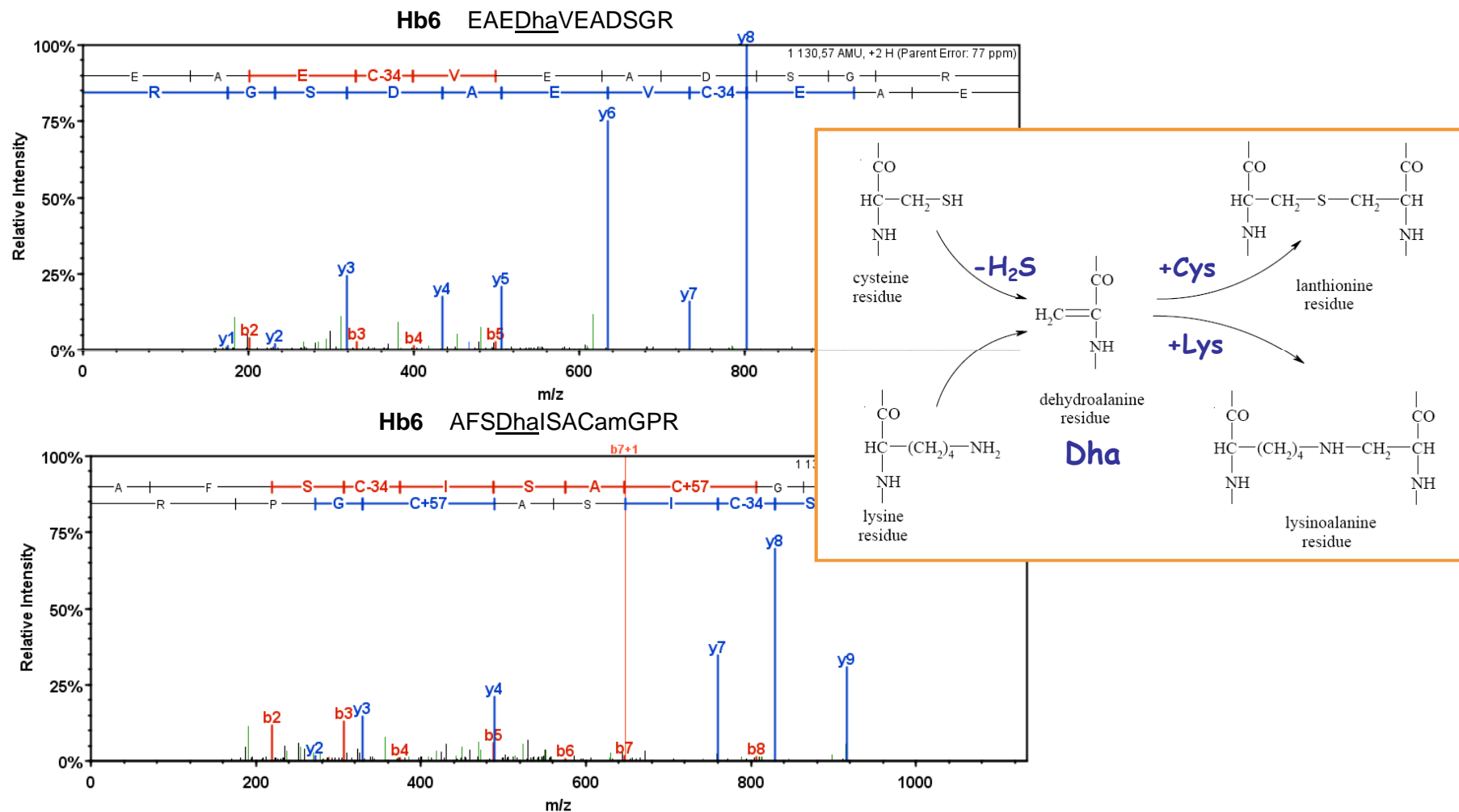
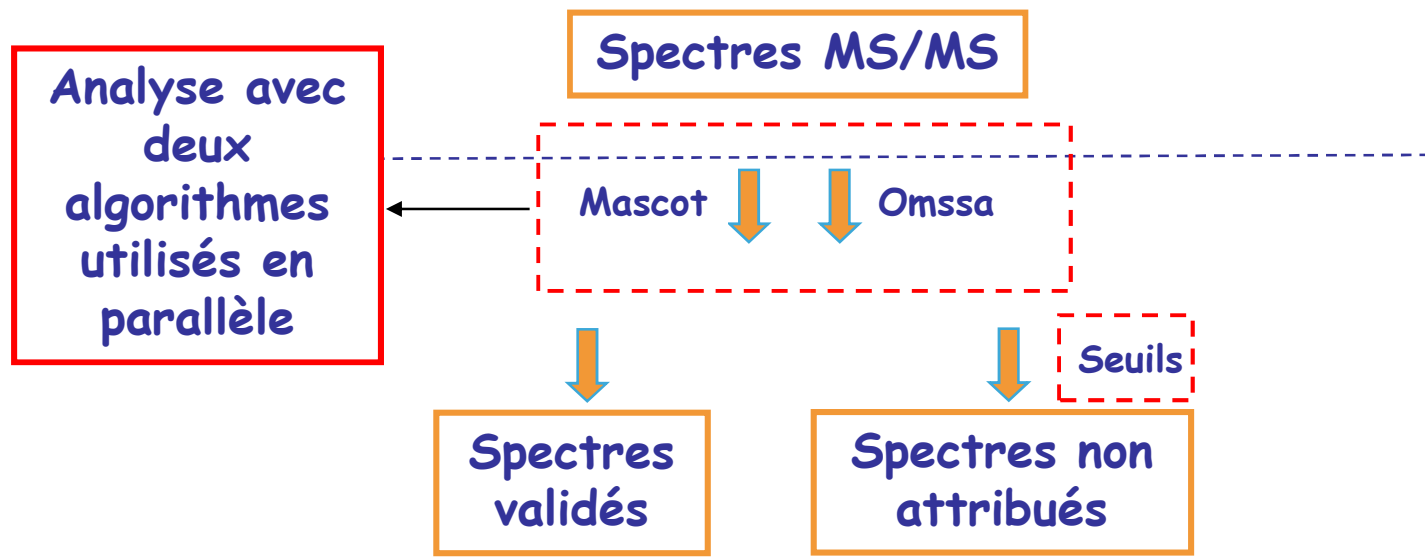


Illustration de l'intérêt de la recherche séquentielle

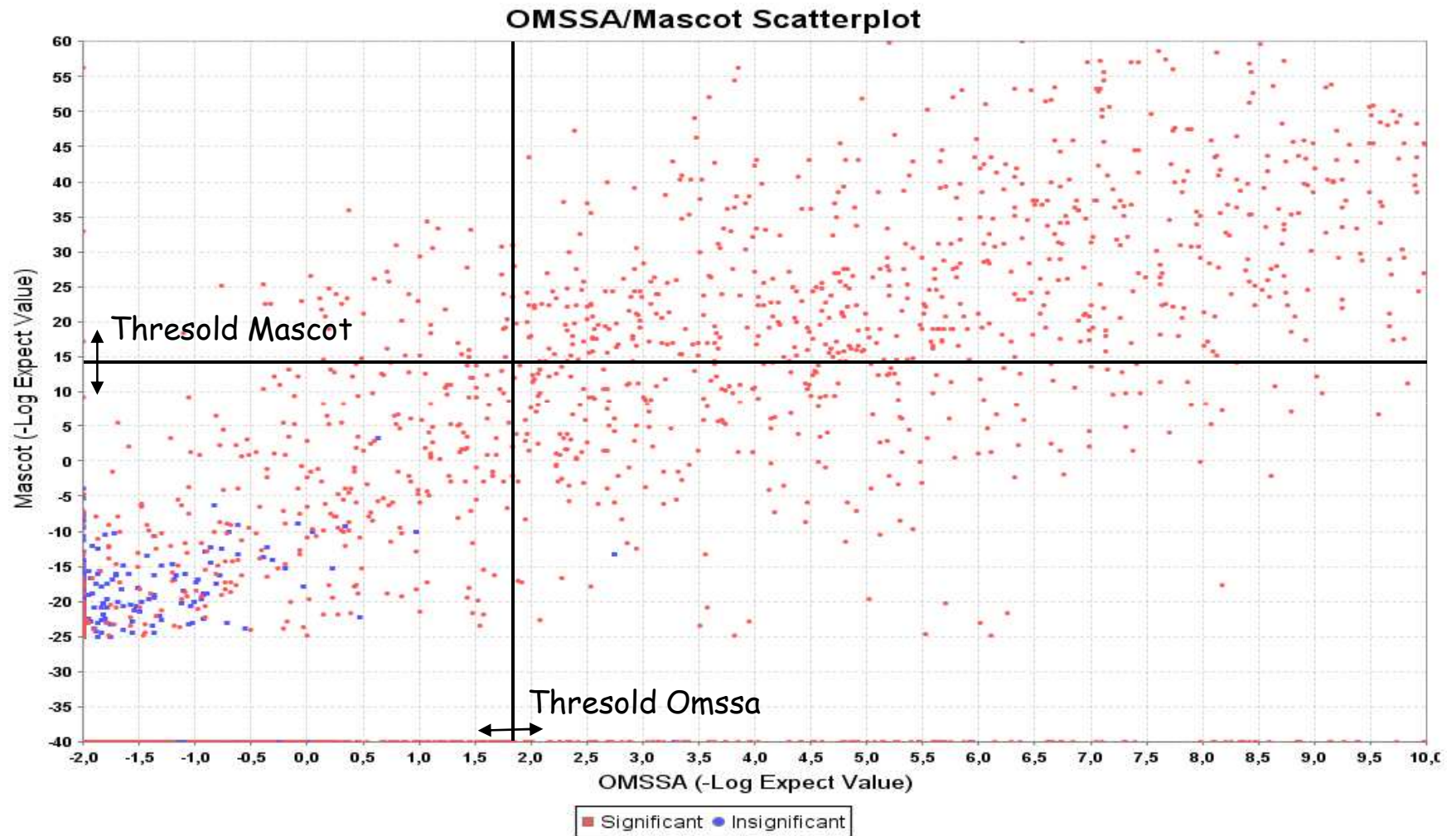
↳ Ex = Localisation des sites de désulfuration dans les kératines



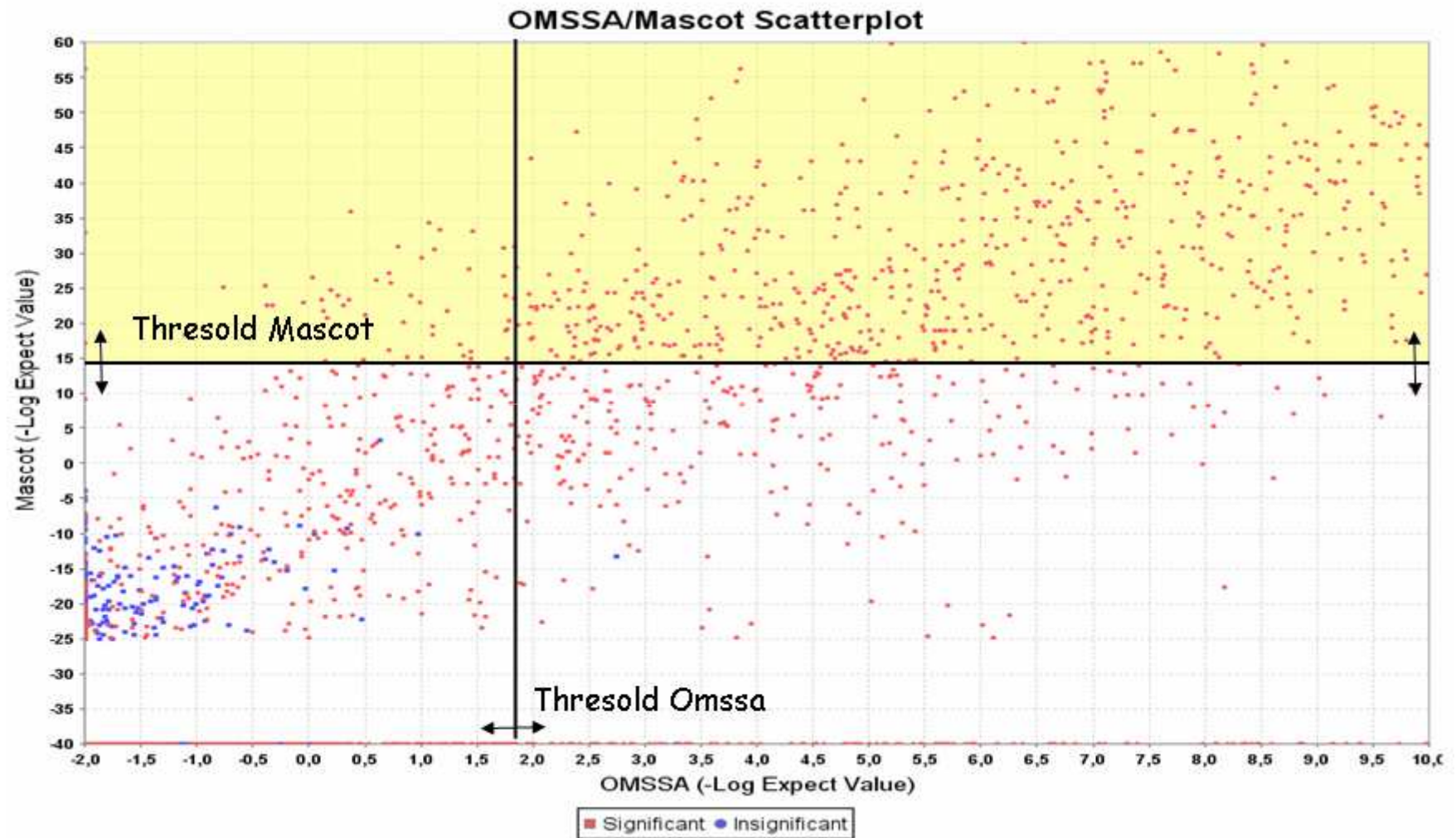
Utilisation de 2 moteurs de recherche



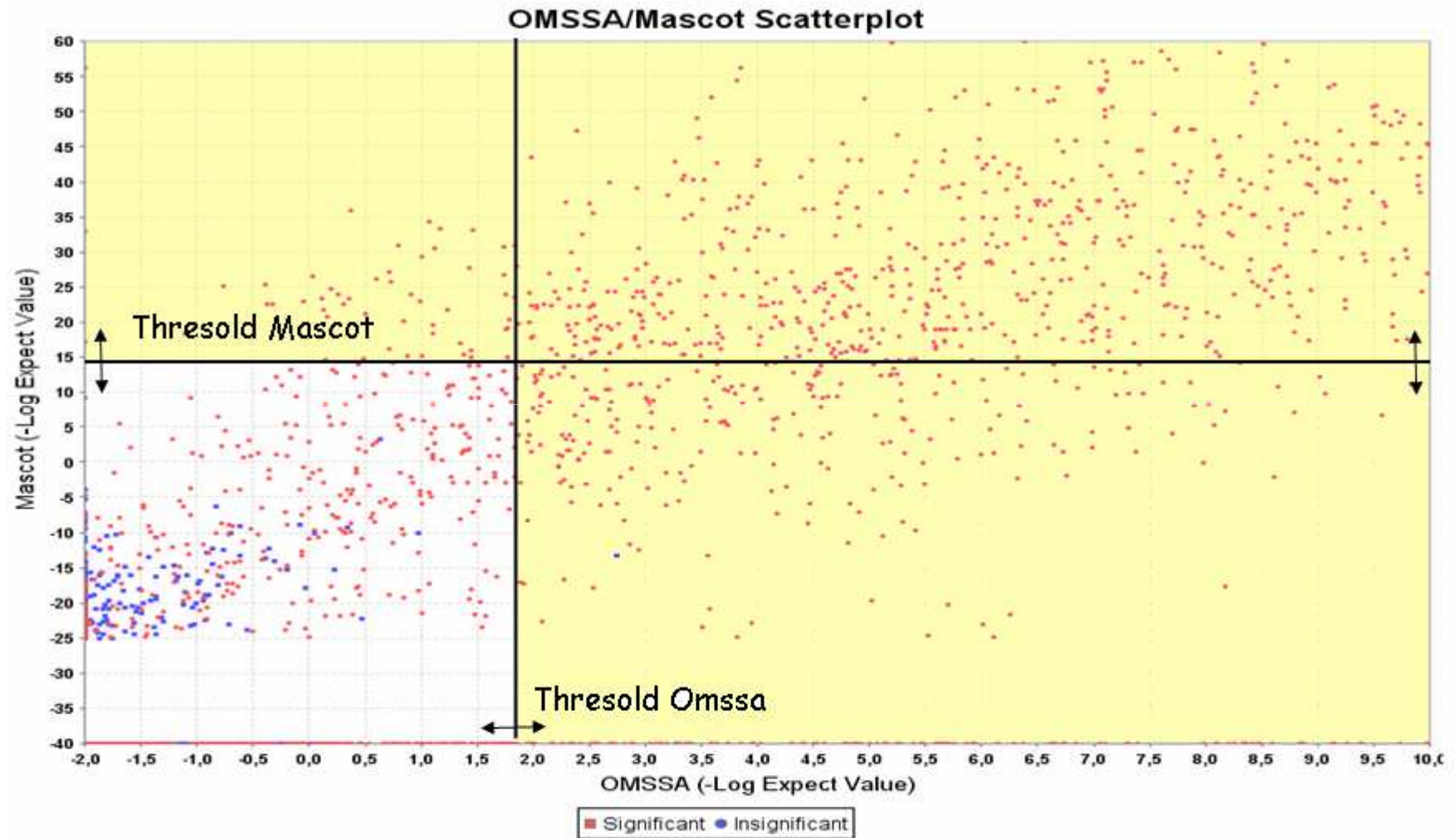
Utilisation combinée de 2 moteurs de recherche



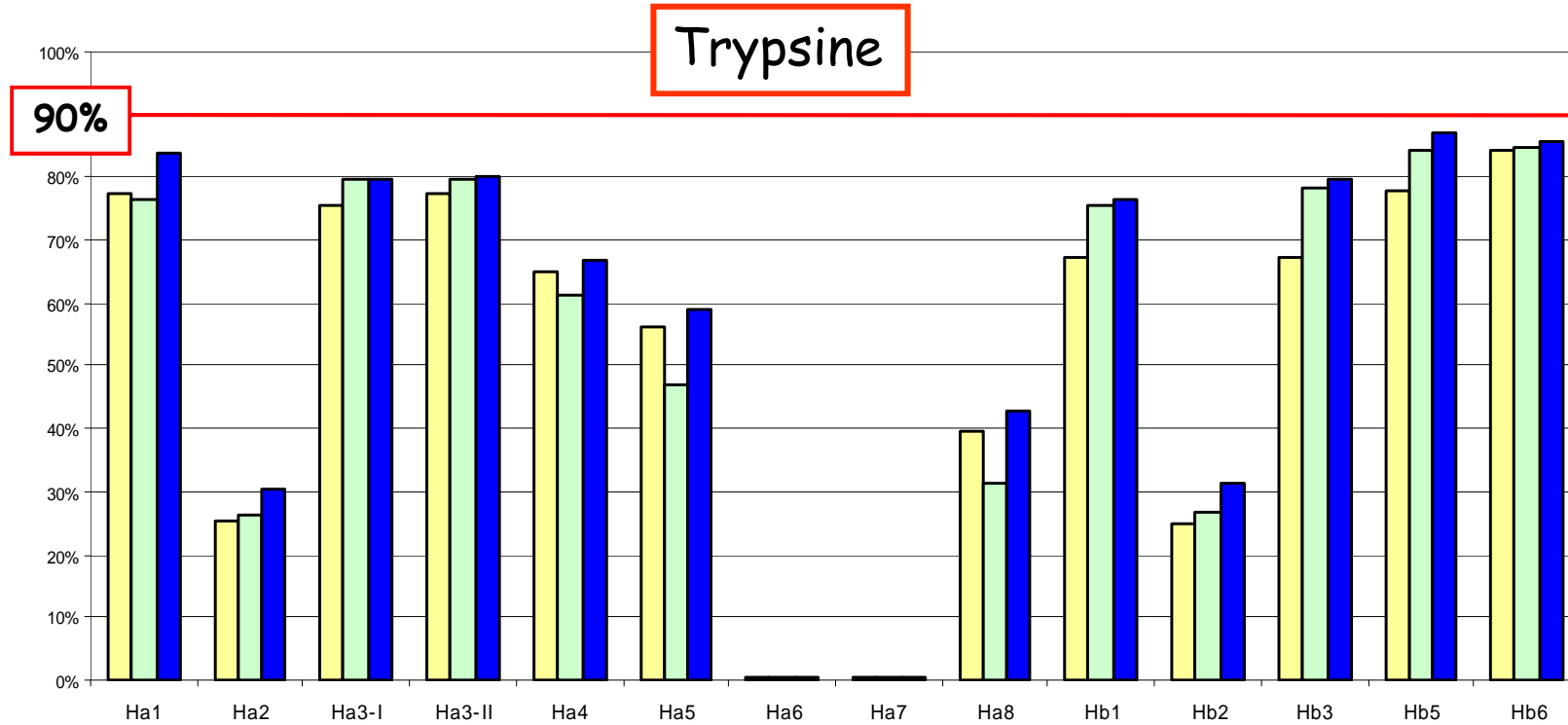
Utilisation combinée de 2 moteurs de recherche



Utilisation combinée de 2 moteurs de recherche

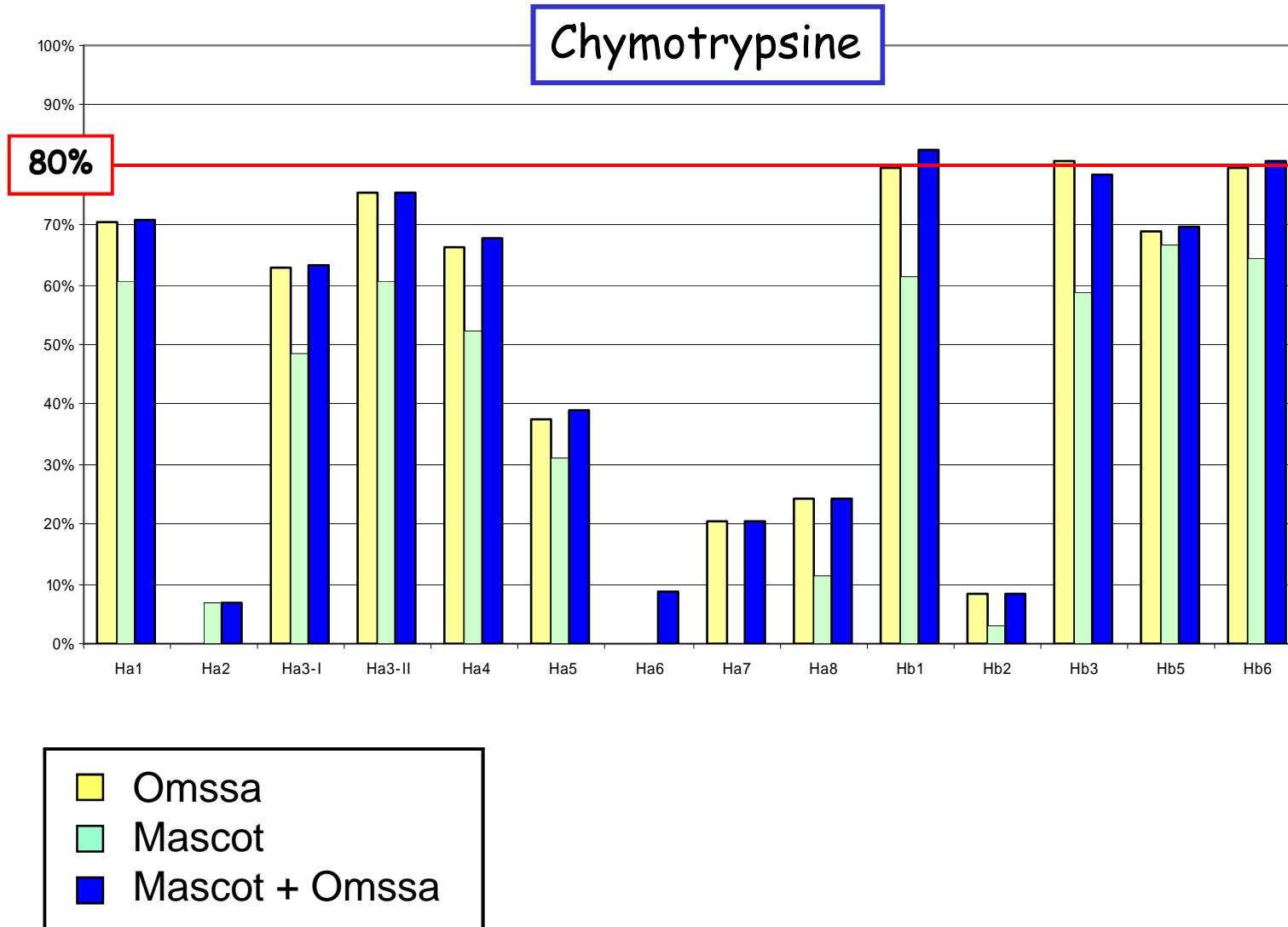


Combinaison 2 moteurs de recherche

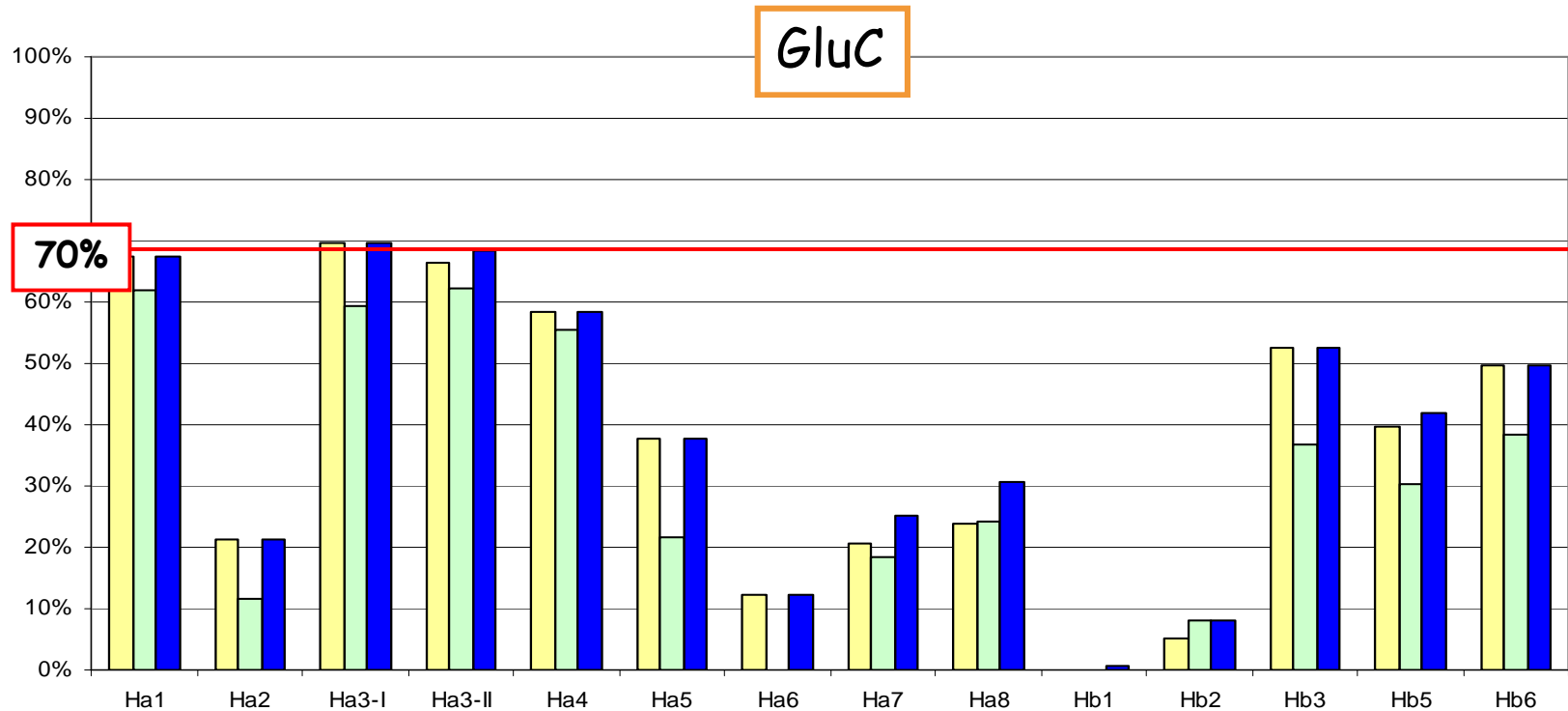


- Omssa
- Mascot
- Mascot + Omssa

Combinaison 2 moteurs de recherche



Combinaison 2 moteurs de recherche



- Omssa
- Mascot
- Mascot + Omssa

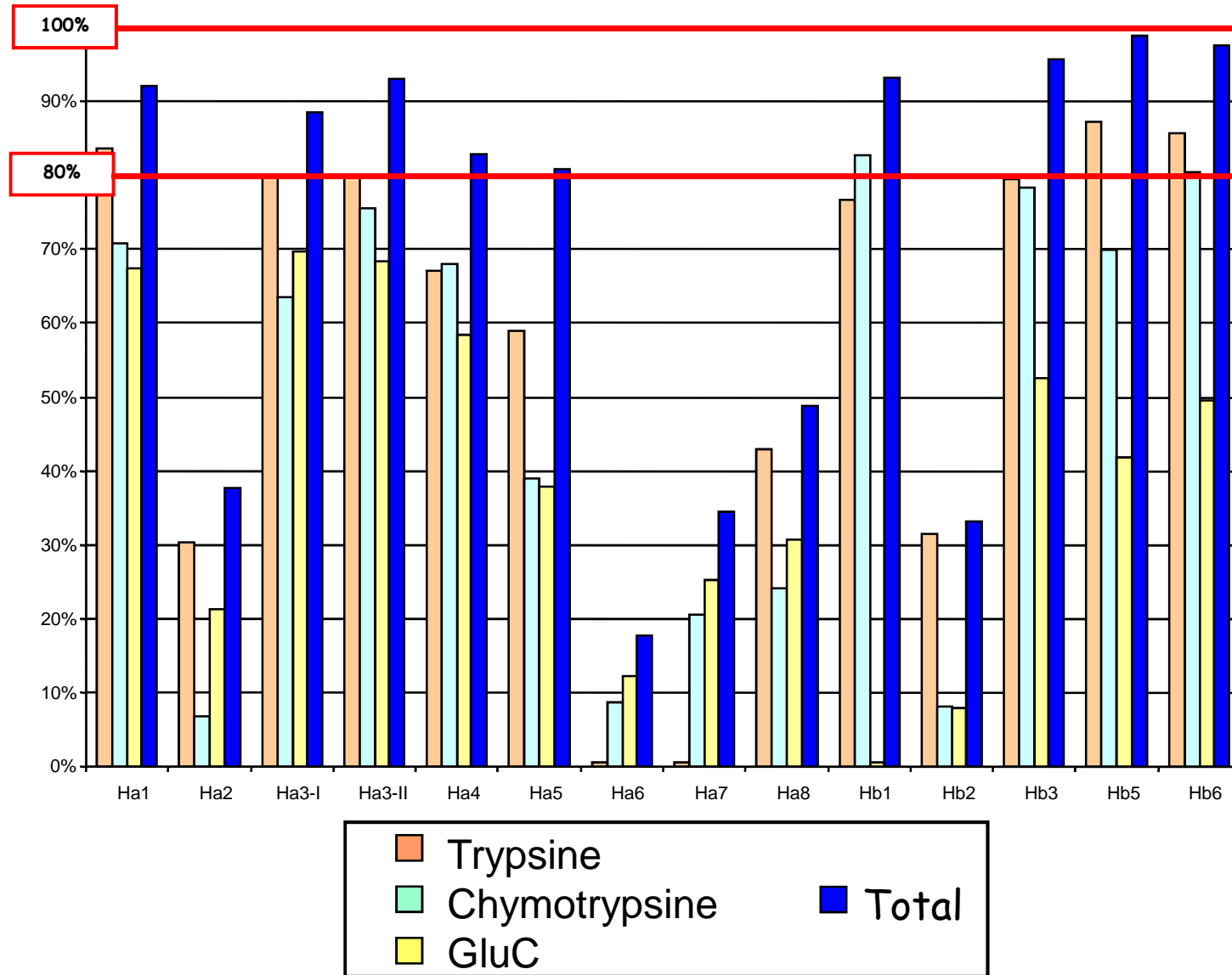


Complémentarité des moteurs



Gain sur le nombre de peptide identifié

Combinaison des 3 enzymes et des 2 moteurs



Intérêt d'un recouvrement protéique maximum

Kératine Ha4

1 MLYAKPPPTI NGIKGLQRKE RLKPAHIHLQ QLTFCFSITCS STMSYSCCLP
51 SLGCRTSCSS RPCVPPSCHG YTLPGACNIP ANVSNCNWFC EGSFNGSEKE
101 TMQFLNDRLA SYLEKVRQLE RDNAELEKLI QERSQQQEPL LCPSYQSYFK
151 TIEELQKIL CAKAENARLV VNIDNAKLAS DDFRSKYQTE QSLRLLVESD
201 INSIRRILDE LTLCKSDLES QVESLREELI CLKKNHEEEV NTLRSQLGDR
251 LNVEVDTAPT VDLNQVLNET RSQYEALVEI NRREVEQWFA TQTEELNKQV
301 VSSSEQLQSC QAEIIELRRT VNALEIELQA QHNLRDSLEN TLTESEAHYS
351 SQLSQVQSLI TNVESQLAEI RCDLERQNQE YQVLLDVRAR LECEINTYRS
401 LLESEDCKLP CNPCATTNAS GNSCGPCGTS QKGCCN

Intérêt d'un recouvrement protéique maximum

Kératine Ha4

1 MLYAKPPPTI NGIKGLQRKE RLKPAHIHLQ QLTCFSITCS STMSYSCCLP
51 SLGCRTSCSS RPCVPPSCHG YTLPGACNIP ANVSNCNWFC EGSFNGSEKE
101 **TMQFLNDRLA** **SYLEKVRQLE** **RDNAELEKLI** **QERSQQQEPL** **LCPSYQSYFK**
151 **TIEELQOKIL** **CAKAENARLV** **VNIDNAKLAS** **DDFRSKYQTE** **QSLRLLVESD**
201 **INSIRRILDE** **LTLCKSDLES** **QVESLREELI** **CLKKNHEEEV** **NTLRSQLGDR**
251 **LNVEVDTAPT** **VDLNQVLNET** **RSQYEALVEI** **NRREVEQWFA** **TQTEELNKQV**
301 **VSSSEQLQSC** **QAEIIELRRT** **VNALEIELQA** **QHNLRDSLEN** **TLTESEAHYS**
351 **SQLSQVQSLI** **TNVESQLAEI** **RCDLERQNQE** **YQVLLDVRAR** **LECEINTYRS**
401 **LLESEDCKLP** **CNPCATTNAS** **GNSCGPCGTS** **QKGCCN**

Peptides
trypsiques,
chymotrypsiques
et gluC

Intérêt d'un recouvrement protéique maximum

Kératine Ha4

1 MDYAKPPPTI NGIKGLQRKE RLKPAHIHLQ QLTCFSITCS STMSYSCCLP
51 SLGCRISCS RPCVPPSCHG YTLPGACNIP ANVSNCNWFC EGSFNGSEKE
101 TMQFLNDRLA SYLEKVRQLE RDNAELEKLI QERSQQQEPL LCPSYQSYFK
151 TIEELQOKIL CAKAENARLV VNIDNAKLAS DDFRSKYQTE QSLRLLVESD
201 INSIRRILDE LTLCKSDLES QVESLREELI CLKKNHEEEV NTLRSQLGDR
251 LNVEVDTAPT VDLNQVLNET RSQYEALVEI NRREVEQWFA TQTEELNKQV
301 VSSSEQLQSC QAEIIELRRT VNALEIELQA QHNLRDSLEN TLTESEAHYS
351 SQLSQVQSLI TNVESQLAEI RCDLERQNQE YQVLLDVRAR LECEINTYRS
401 LLESEDCKLP CNPCATTNAS GNSCGPCGTS QKGCCN

Peptides
trypsiques,
chymotrypsiques
et gluC

+

Peptides
semi
chymotrypsiques

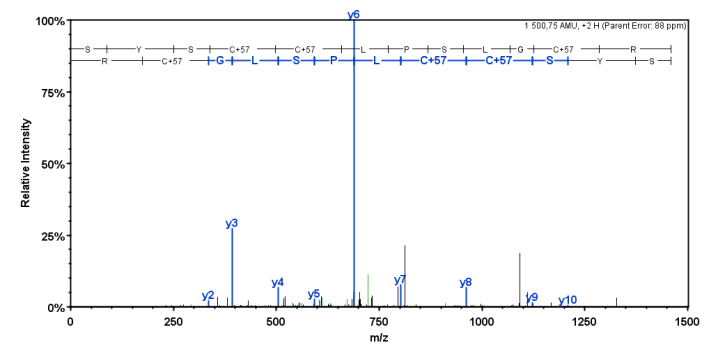
Intérêt d'un recouvrement protéique maximum

Kératine Ha4

1 MLYAKPPPTI NGIKGLQRKE RLKPAHIHLQ QLTCSFSTCS STMSY**SCCLP**
51 **SLGCRTSCSS** **RPCVPPSCHG** **Y**TLPGACNIP ANVSNCNWFC EGSFNGSEKE
101 **TMQFLNDRLA** **SYLEKVRQLE** **RDNAELEKLI** **QERSQQQEPL** **LCPSYQSYFK**
151 **TIEELQOKIL** **CAKAENARLV** **VNIDNAKLAS** **DDFRSKYQTE** **QSLRLLVESD**
201 **INSIRRILDE** **LTLCKSDLES** **QVESLREELI** **CLKKNHEEEV** **NTLRSQLGDR**
251 **LNVEVDTAPT** **VDLNQVLNET** **RSQYEALVEI** **NRREVEQWFA** **TQTEELNKQV**
301 **VSSSEQLQSC** **QAEIIELRRT** **VNALEIELQA** **QHNLRDSLEN** **TLTESEAHYS**
351 **SQLSQVQSLI** **TNVESQLAEI** **RCDLERQNQE** **YQVLLDVRAR** **LECEINTYRS**
401 **LLESEDCKLP** **CNPCATTNAS** **GNSCGPCGTS** **QKGCCN**

Peptides semi trypsiques
+ N-acétyl Nter pep

➔ Identification du peptide :
Nacétyl (S) **YSCCLPSLGCR**



Intérêt d'un recouvrement protéique maximum

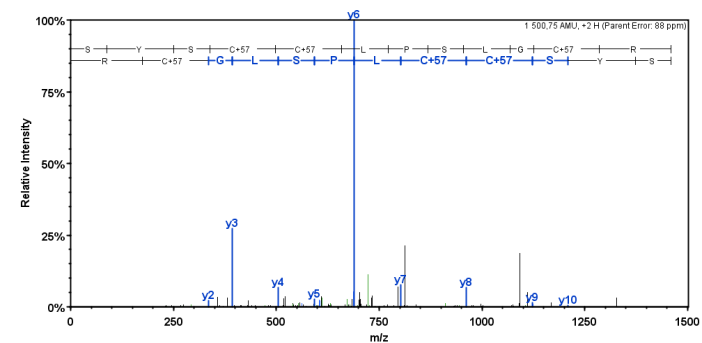
Kératine Ha4

1 ~~MLYAKPPPTI~~ ~~NGIKCLQRKE~~ ~~RLKPAHIHLQ~~ ~~QLTCFSITCS~~ **STMSYSCCLP**
51 **SLGCR****TS****CS** **RPCVPPSCHG** **Y**TLPGACNIP ANVSNCNWFC EGSFNGSEKE
101 **TMQFLNDRLA** **S**YLEKVRQLE **R**DNAELEKLI **Q**ERSQQQEPL **L**CPSYQSYFK
151 **T**IEELQOKIL **C**AKAENARLV **V**NIDNAKLAS **D**DFRSKYQTE **Q**SLRLLVESD
201 **I**NSIRRILDE **L**TLCKSDLES **Q**VESLREELI **C**LKKNHEEEV **N**TLRSQLGDR
251 **L**NVEVDTAPT **V**DLNQVLNET **R**SQYEALVEI **N**RREVEQWFA **T**QTEELNKQV
301 **V**SSEQLQSC **Q**AEIIELRRT **V**NALEIELQA **Q**HNLRDLEN **T**LTESEAHYS
351 **S**QLSQVQSLI **T**NVESQLAEI **R**CDLERQNGE **Y**QVLLDVRAR **L**ECEINTYRS
401 **L**LESEDCKLP **C**NPCATTNAS **G**NSCGPCGTS **Q**KGCCN

Peptides semi tryptiques
+ N-acétyl Nter pep

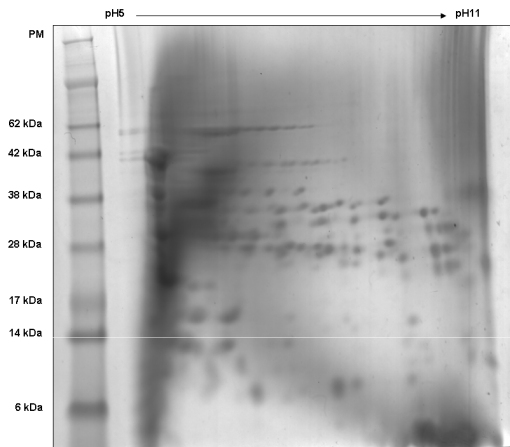
↳ Séquence de Ha4 corrigée
et exprimée dans le cortex

➔ Identification du peptide :
Nacétyl (S)YSCCLPSLGCR



Identification des Keratin Associated Protein (KAPs)

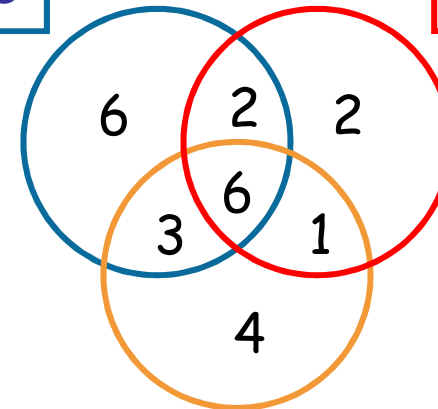
Approche par gel
Digestion tryps



8 KAPs identifiées
6 familles multigéniques

Trypsine

Gluc



Chymotrypsine



24 KAPs identifiées
9 familles multigéniques



Stratégie adaptée à l'étude des isoformes de KAPs

Localisation des PTMs

→ PTMs induites enzymatiquement

↳ 52 peptides uniques portant H(met), K(met, dimet ou trimet)

→ PTMs induites chimiquement

↳ 61 peptides uniques portant des trioxydations dont KAPs

↳ 19 peptides uniques portant des dehydroalanines

Conclusions

1) Identification de 132 peptides modifiés uniques dont des Dha

2) Stratégie d'identification efficace pour les isoformes

↳ Recouvrement de séquence 90 % pour les 2 familles de kératines

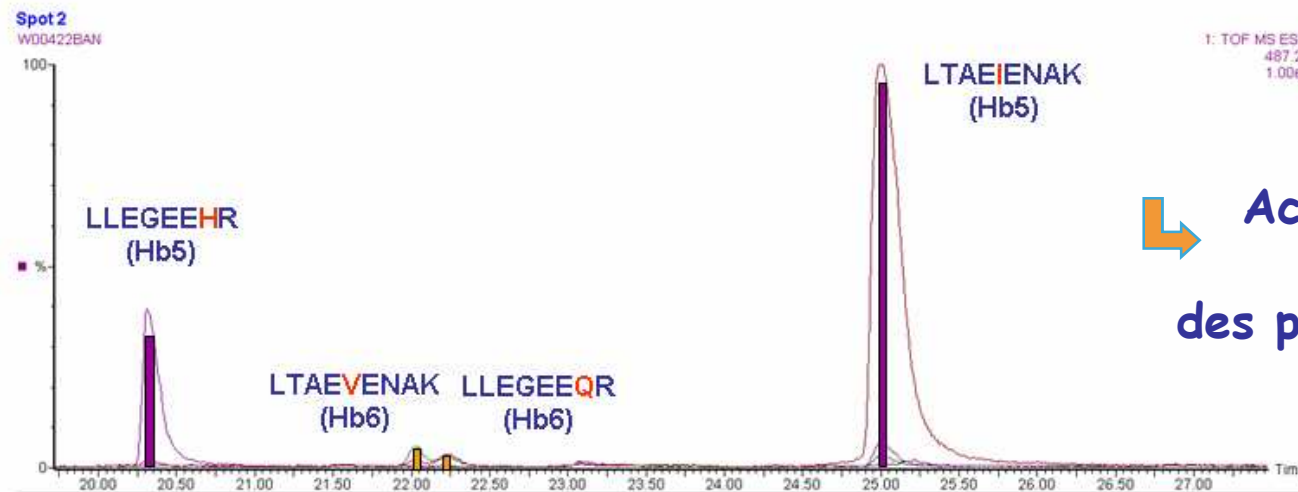
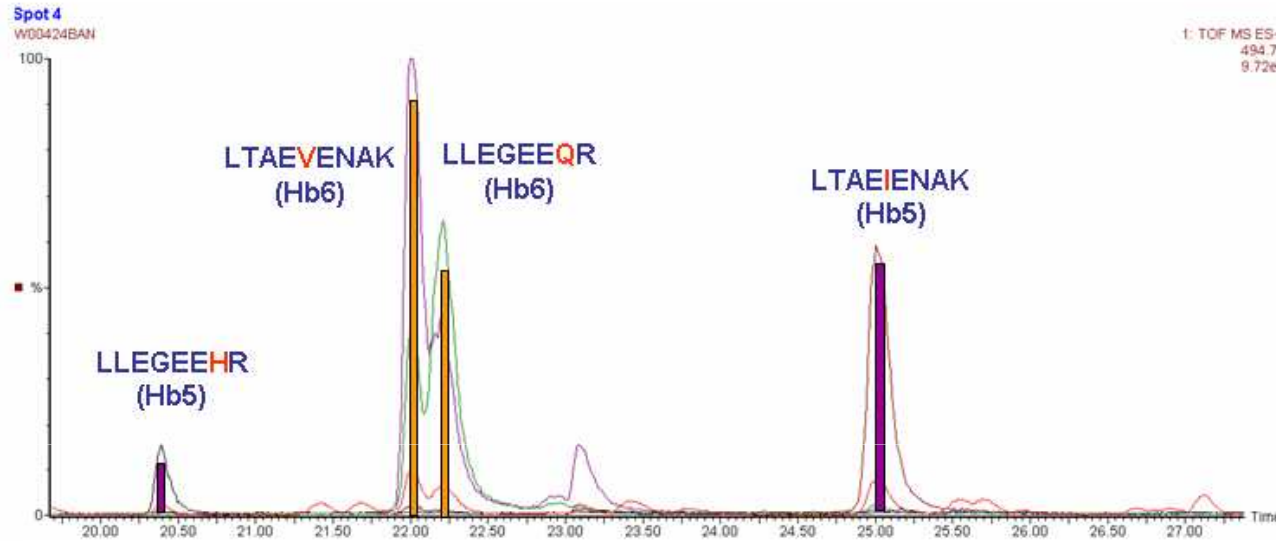
+ Mise en évidence d'une erreur d'annotation d'une kératine dans Uniprot

↳ Augmentation du nombre d'isoformes identifiées pour les KAPs

Identification des peptides protéotypiques (discriminants) pour les isoformes étudiées

Perspective : quantification des peptides protéotypiques

→ Etudier les intensités des peptides protéotypiques



↳ Accéder au niveau d'expression des protéines isoformes

Remerciements

➔ Nos collaborateurs du département Chimie Analytique de L'Oréal :

- Dominique JULLIEN
- Georges HUSSLER
- Nükhet CAVUSOGLU

➔ Mes responsables au LSMBO :

- Alain VAN DORSSELAER
- Christine SCHAEFFER

➔ Christine CARAPITO et Sébastien GALLIEN