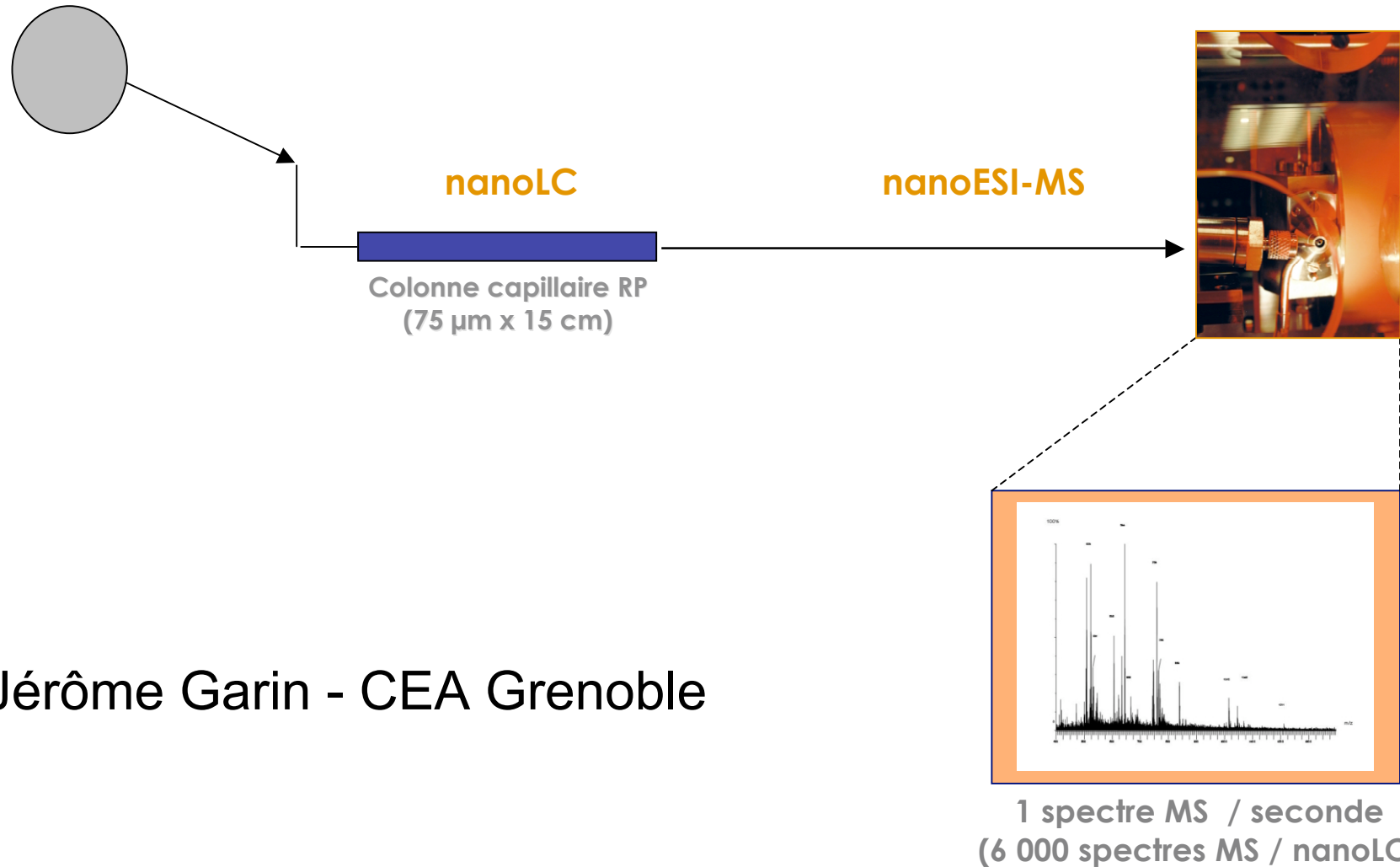


Protéomique quantitative

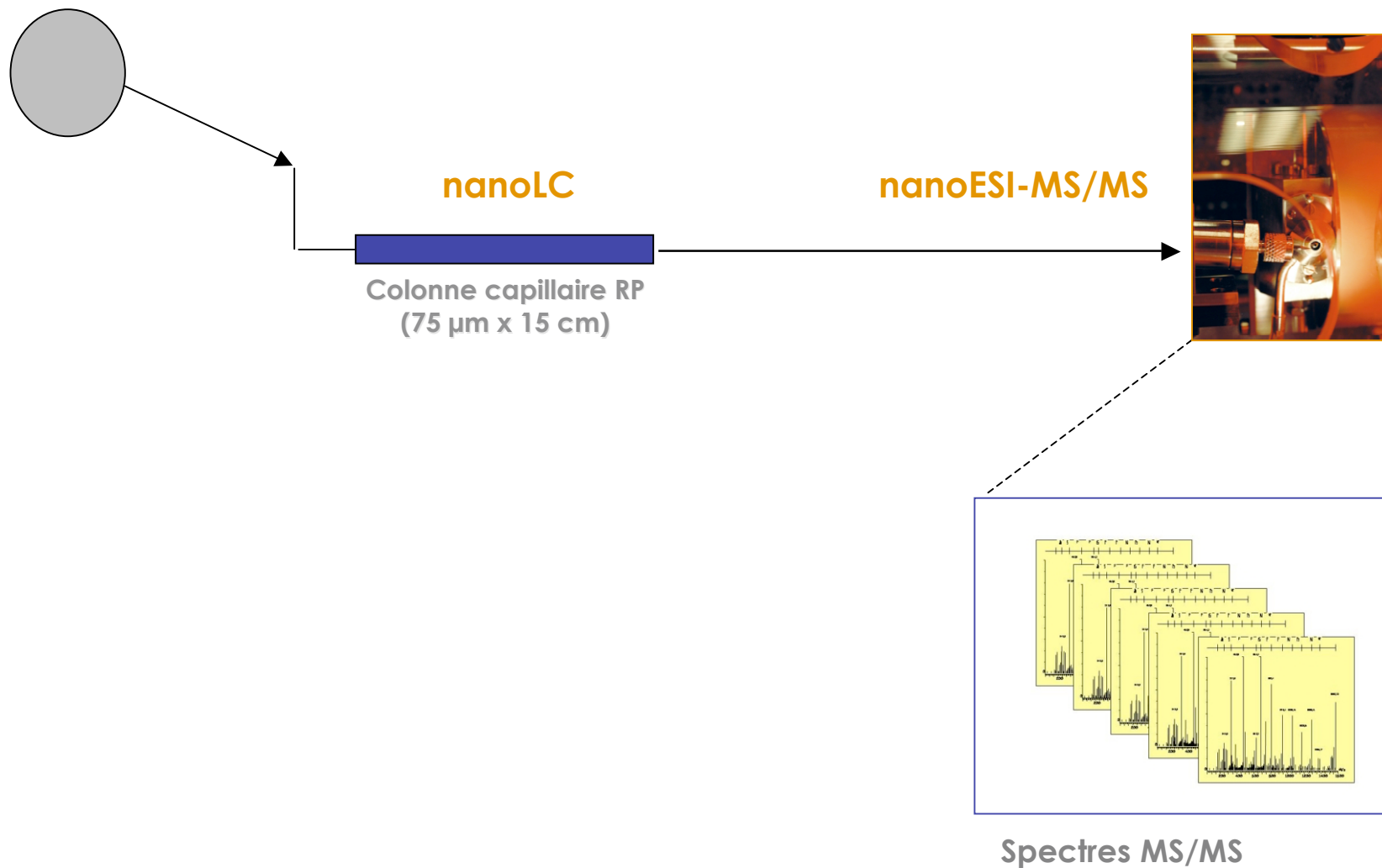
Couplage NanoLC-NanoESI-MS



Jérôme Garin - CEA Grenoble

Protéomique quantitative

Couplage NanoLC-NanoESI-MS/MS



Protéomique quantitative

Marquage isotopique différentiel des protéines (SILAC, ICAT)

Echantillon A



Echantillon léger

Echantillon B

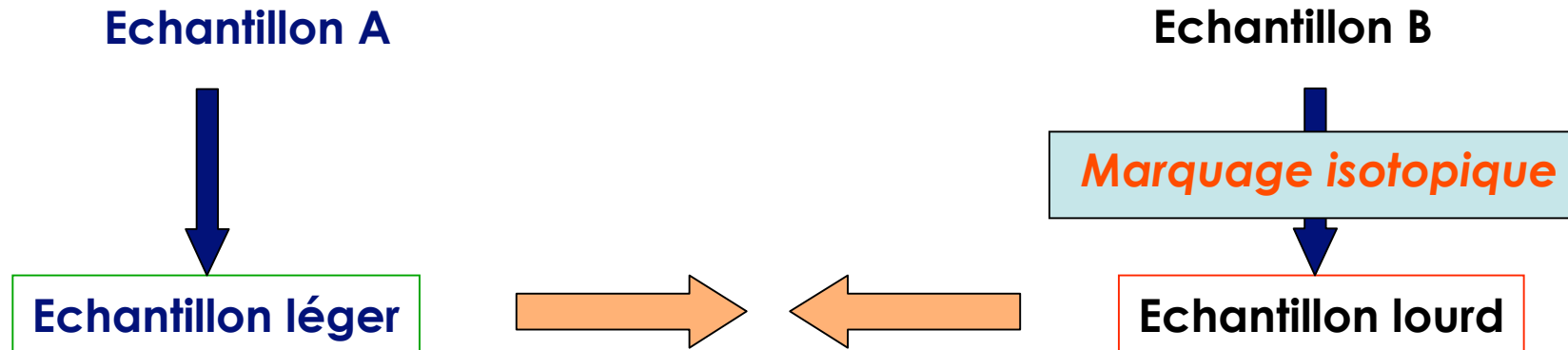
Marquage isotopique



Echantillon lourd

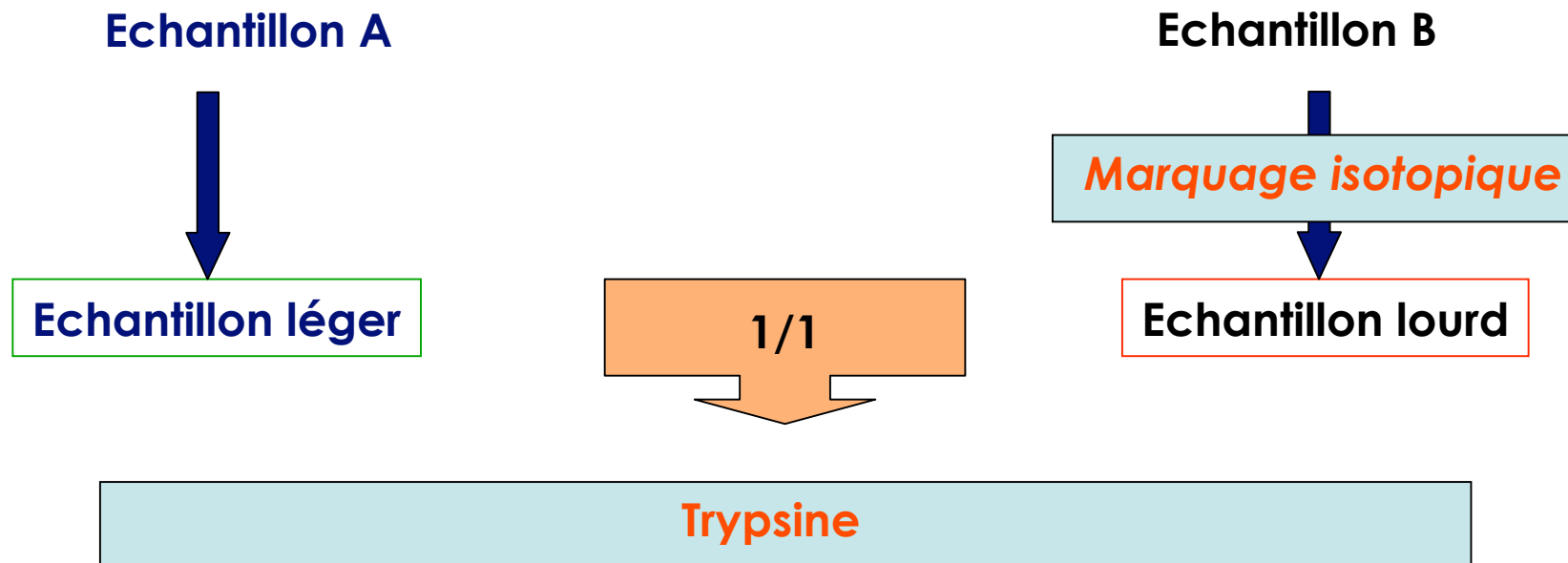
Protéomique quantitative

Marquage isotopique différentiel des protéines (SILAC, ICAT)



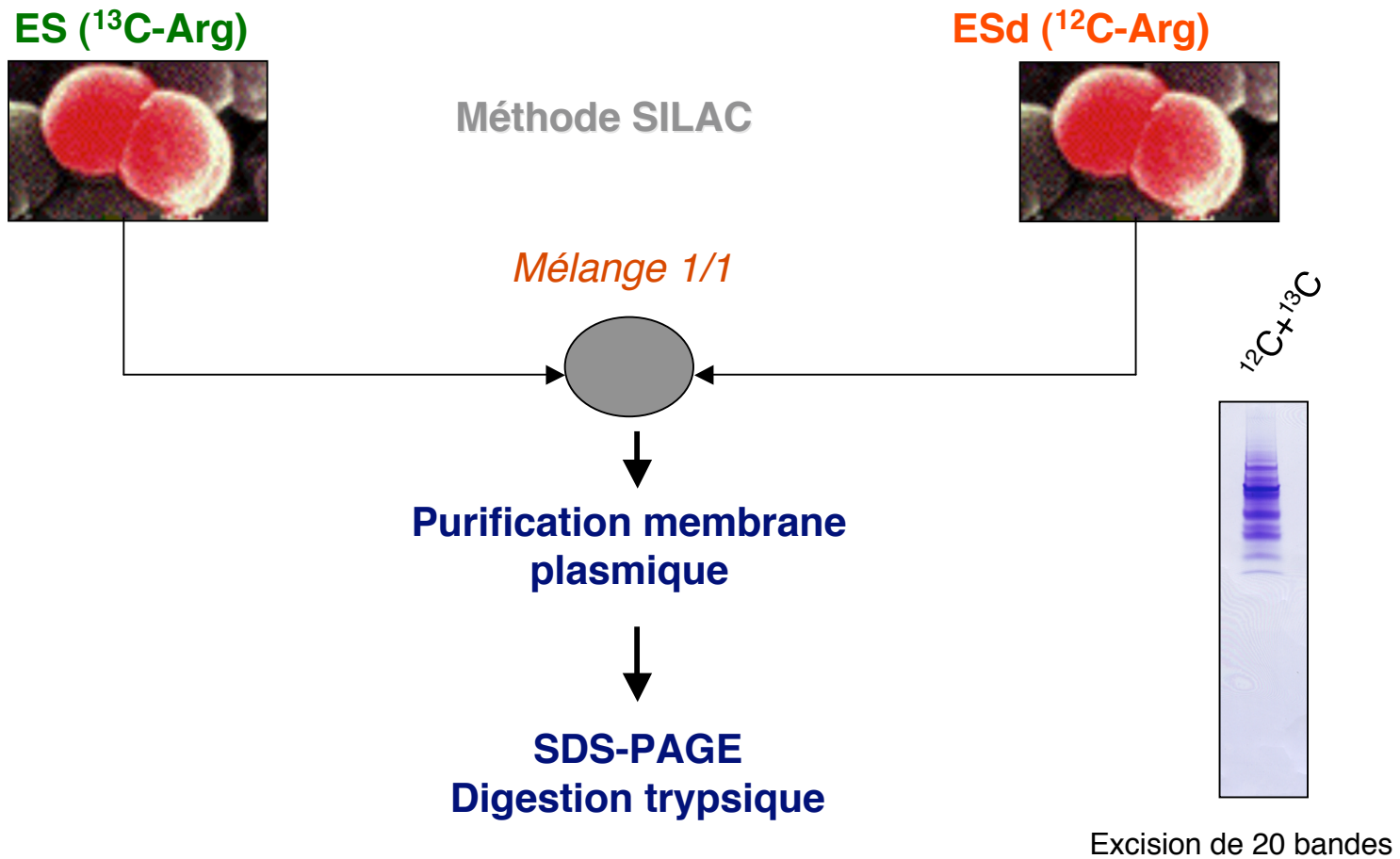
Protéomique quantitative

Marquage isotopique différentiel des protéines (SILAC, ICAT)



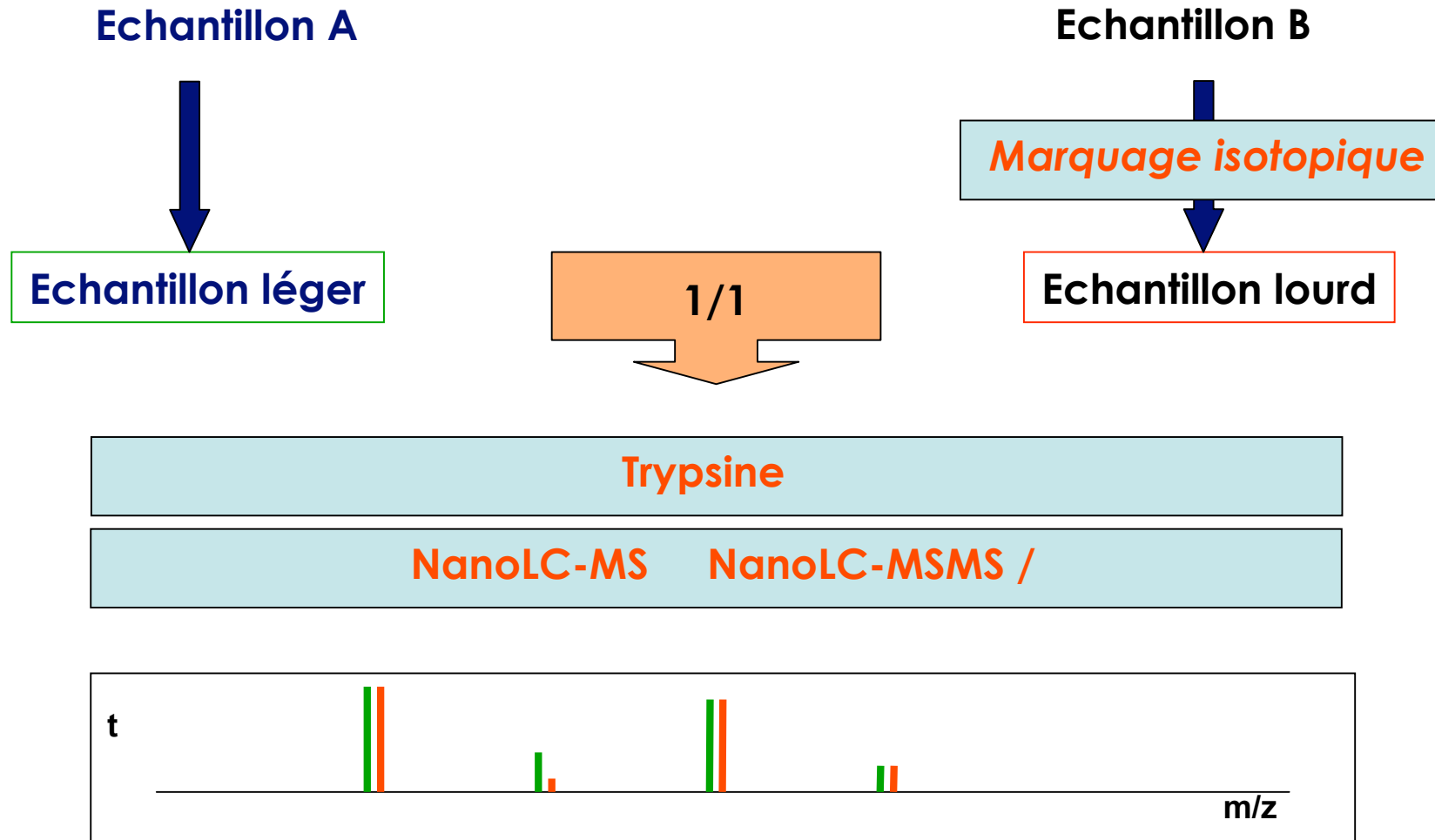
Protéomique quantitative

Marquage isotopique différentiel des protéines (SILAC, ICAT)



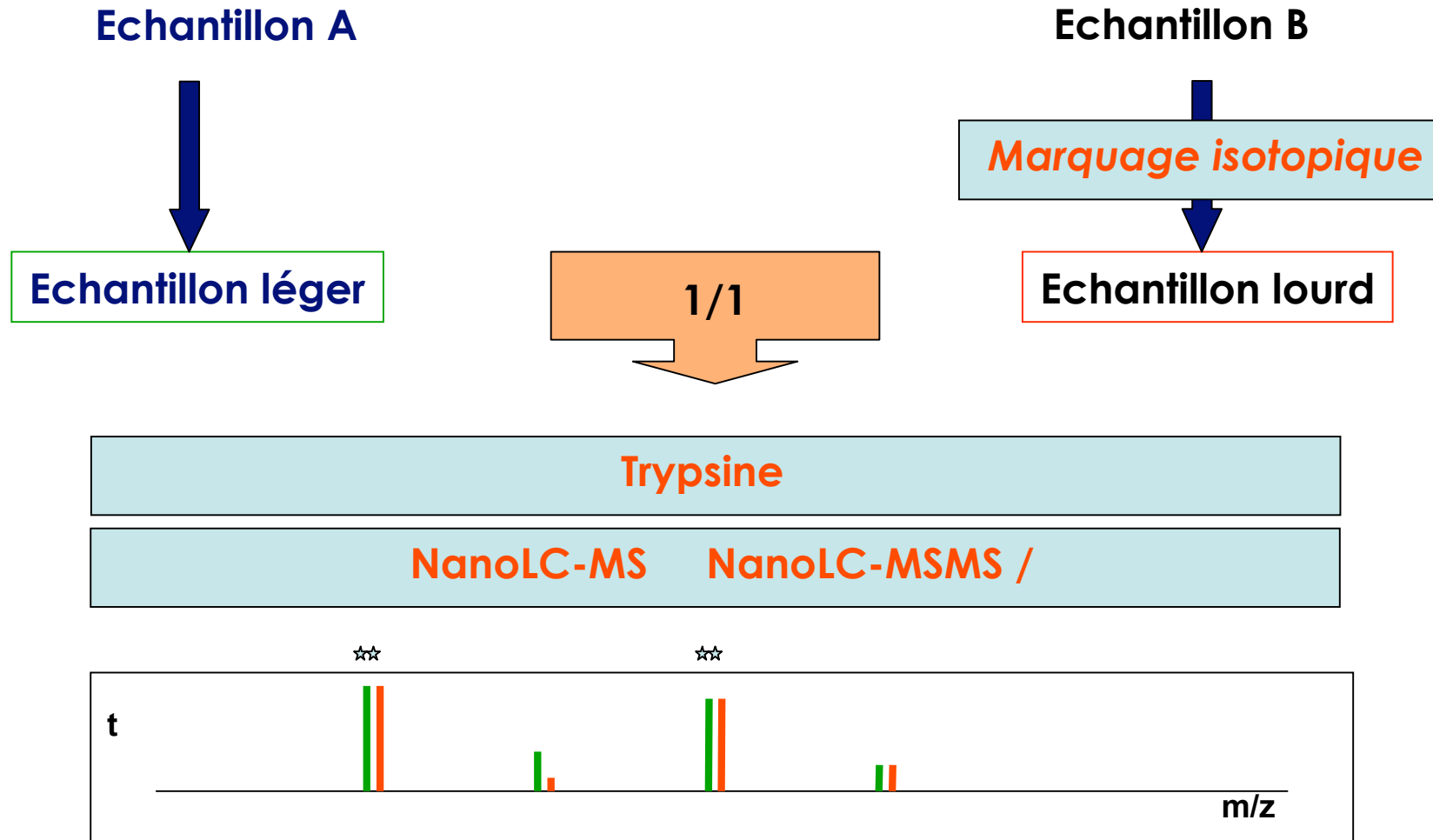
Protéomique quantitative

Marquage isotopique différentiel des protéines (SILAC, ICAT)



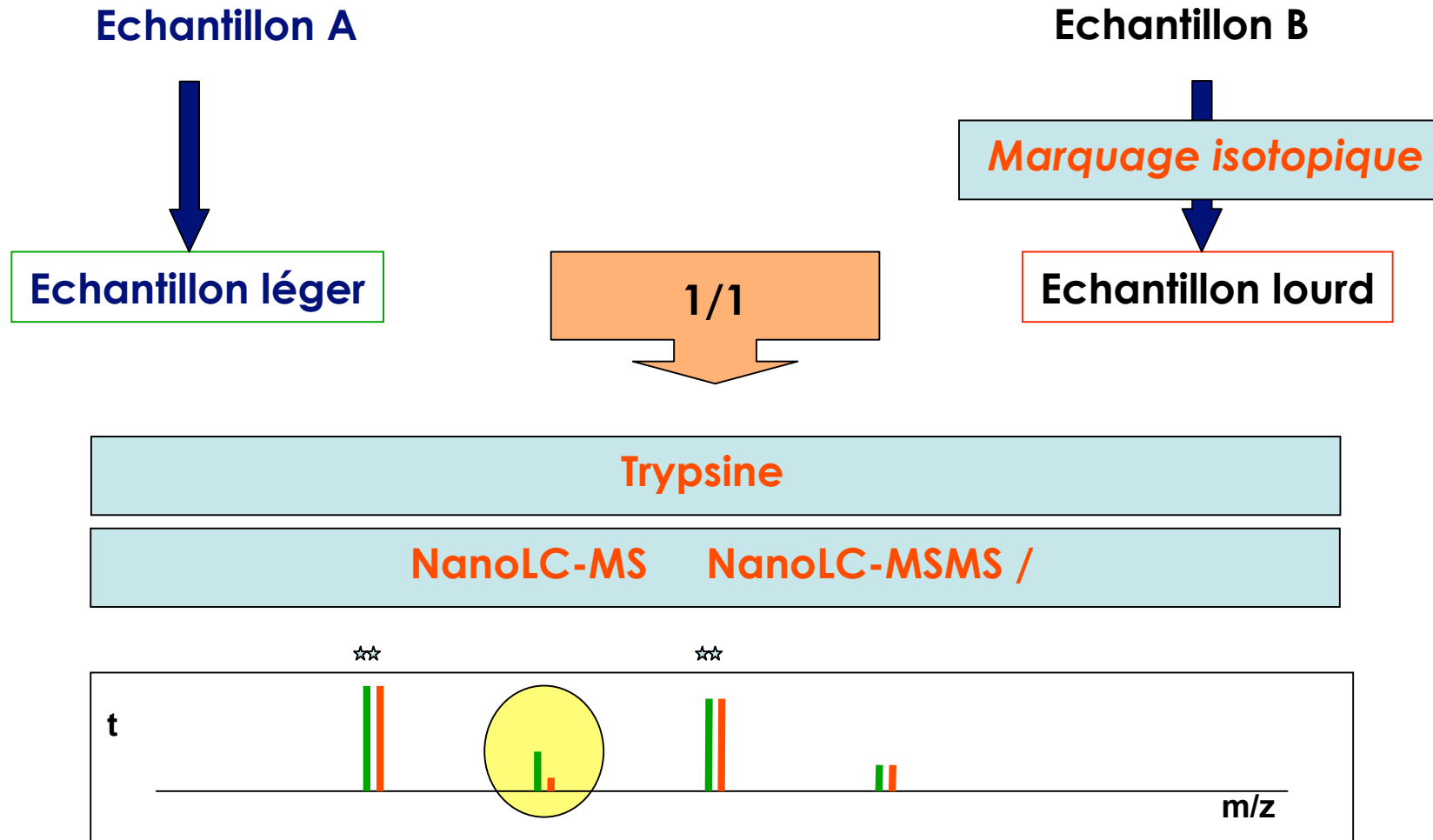
Protéomique quantitative

Marquage isotopique différentiel des protéines (SILAC, ICAT)



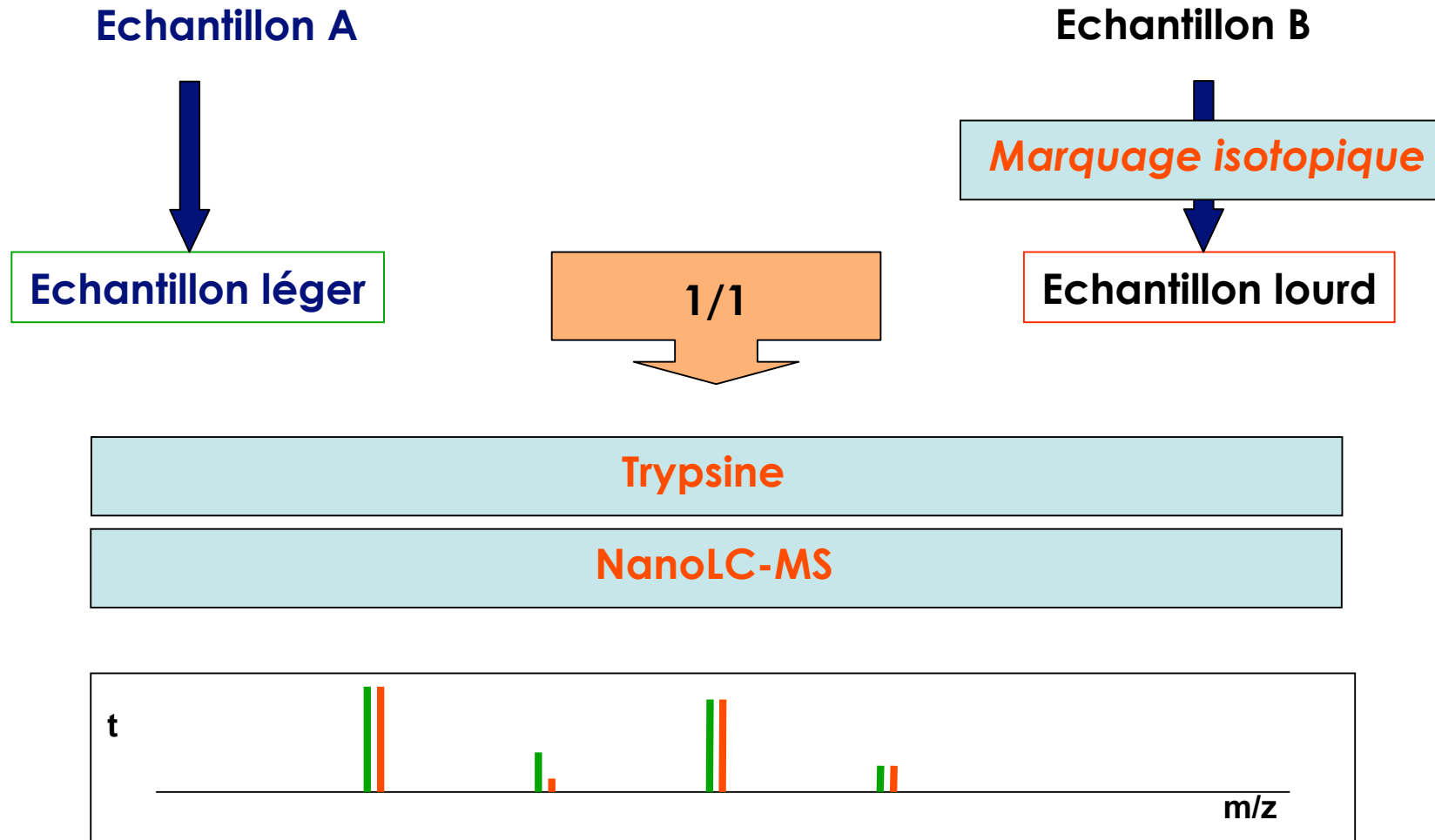
Protéomique quantitative

Marquage isotopique différentiel des protéines (SILAC, ICAT)



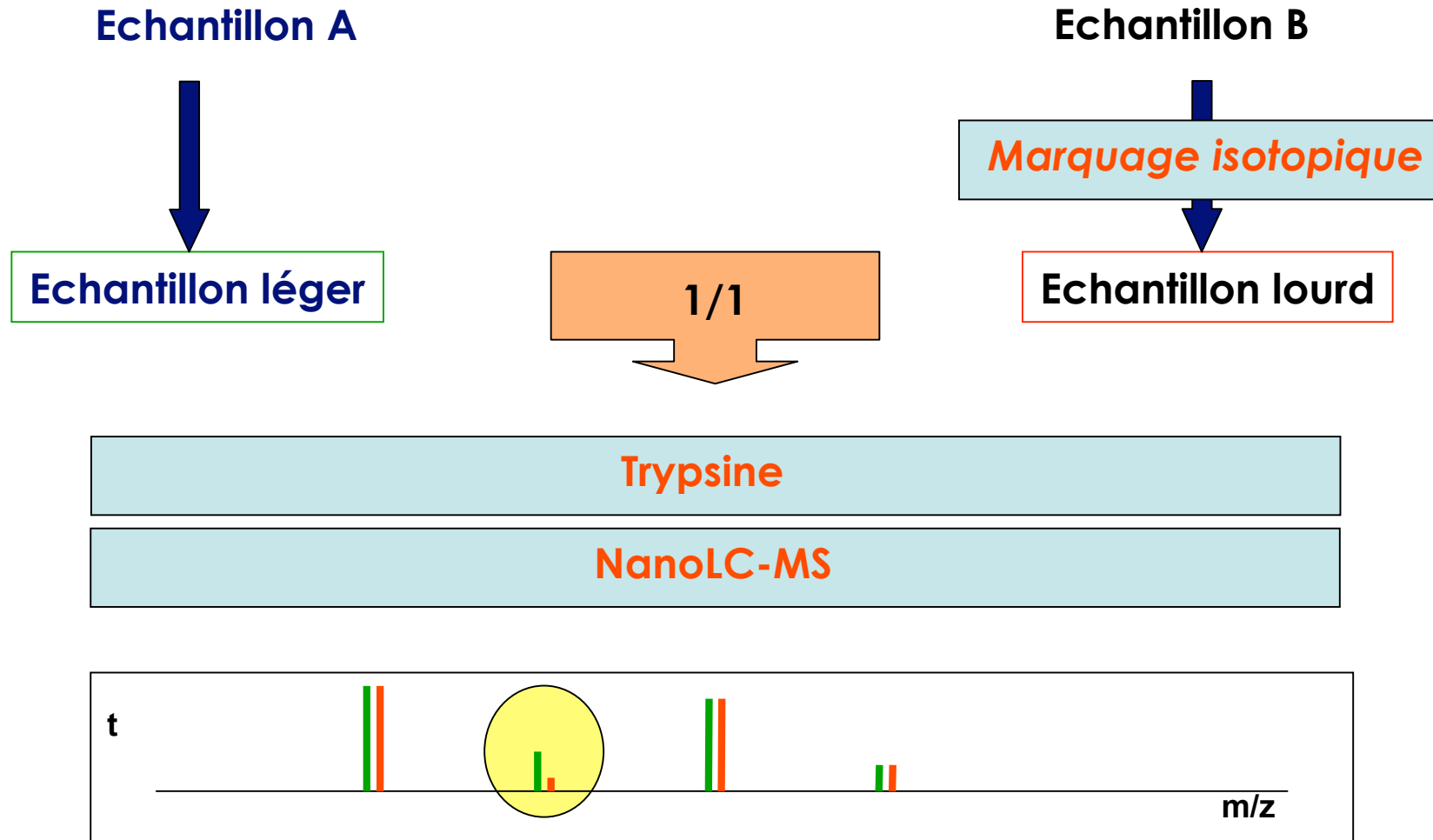
Protéomique quantitative

Marquage isotopique différentiel des protéines (SILAC, ICAT)



Protéomique quantitative

Marquage isotopique différentiel des protéines (SILAC, ICAT)



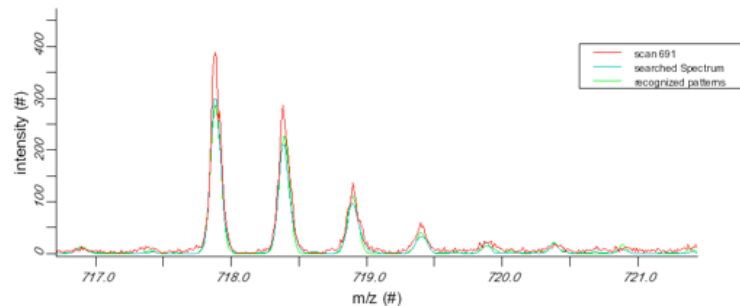
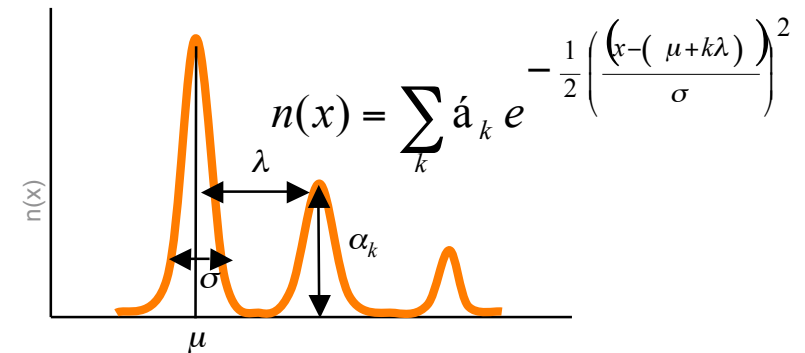
Protéomique quantitative

Développement d'outils informatiques pour **l'analyse systématique** des données d'expression

- **Détection des peptides en MS**

- **Principe**

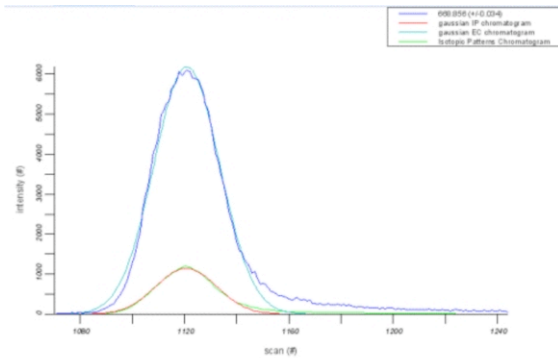
- **Modèle mathématique de massif isotopique**
 - **Estimation de la distribution isotopique caractérisant le peptide**
 - **Ajustement du modèle sur les données expérimentales**



Protéomique quantitative

Développement d'outils informatiques pour l'analyse systématique des données d'expression

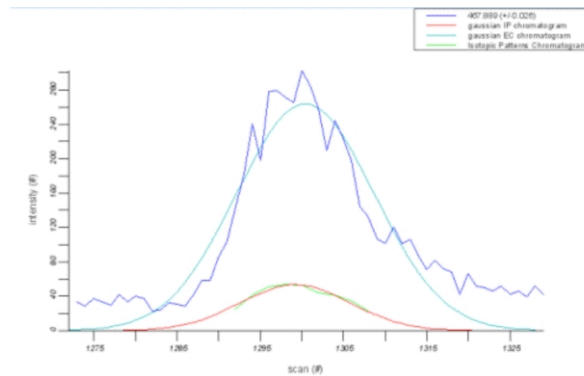
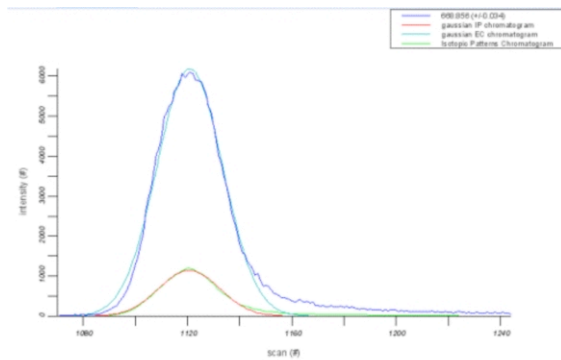
- **Détection des peptides en MS**
 - Regroupement des massifs en peptide et caractérisation du pic d'éluion



Protéomique quantitative

Développement d'outils informatiques pour l'analyse systématique des données d'expression

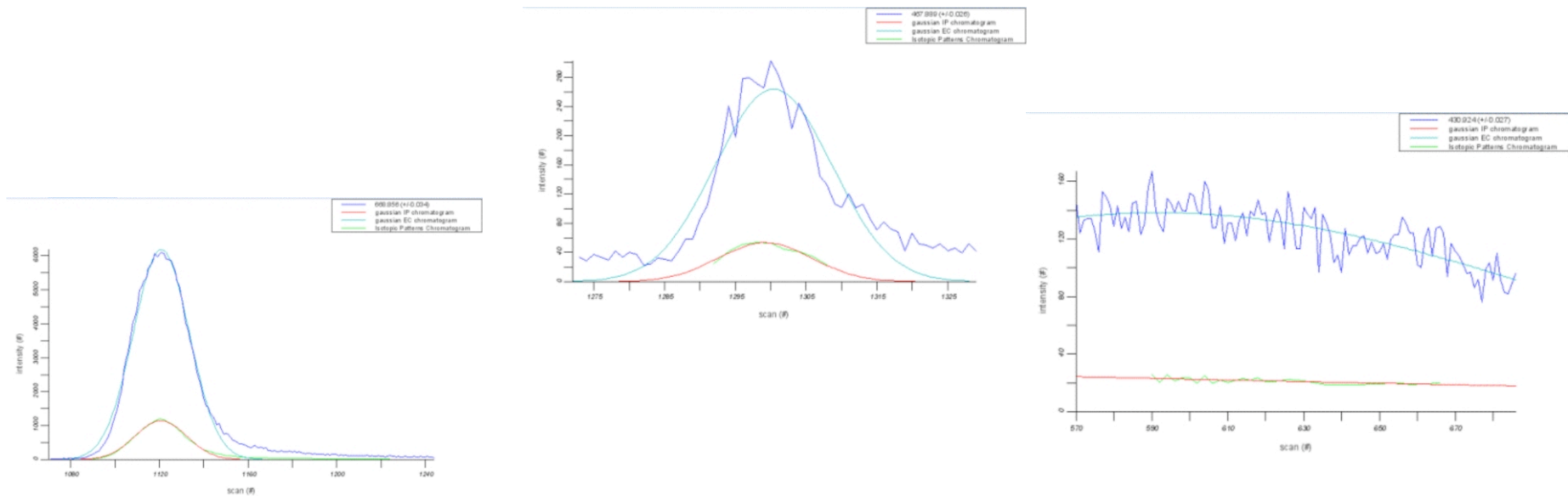
- **Détection des peptides en MS**
 - **Regroupement des massifs en peptide et caractérisation du pic d'éluion**



Protéomique quantitative

Développement d'outils informatiques pour *l'analyse systématique* des données d'expression

- Détection des peptides en MS
 - Regroupement des massifs en peptide et caractérisation du pic d'éluion

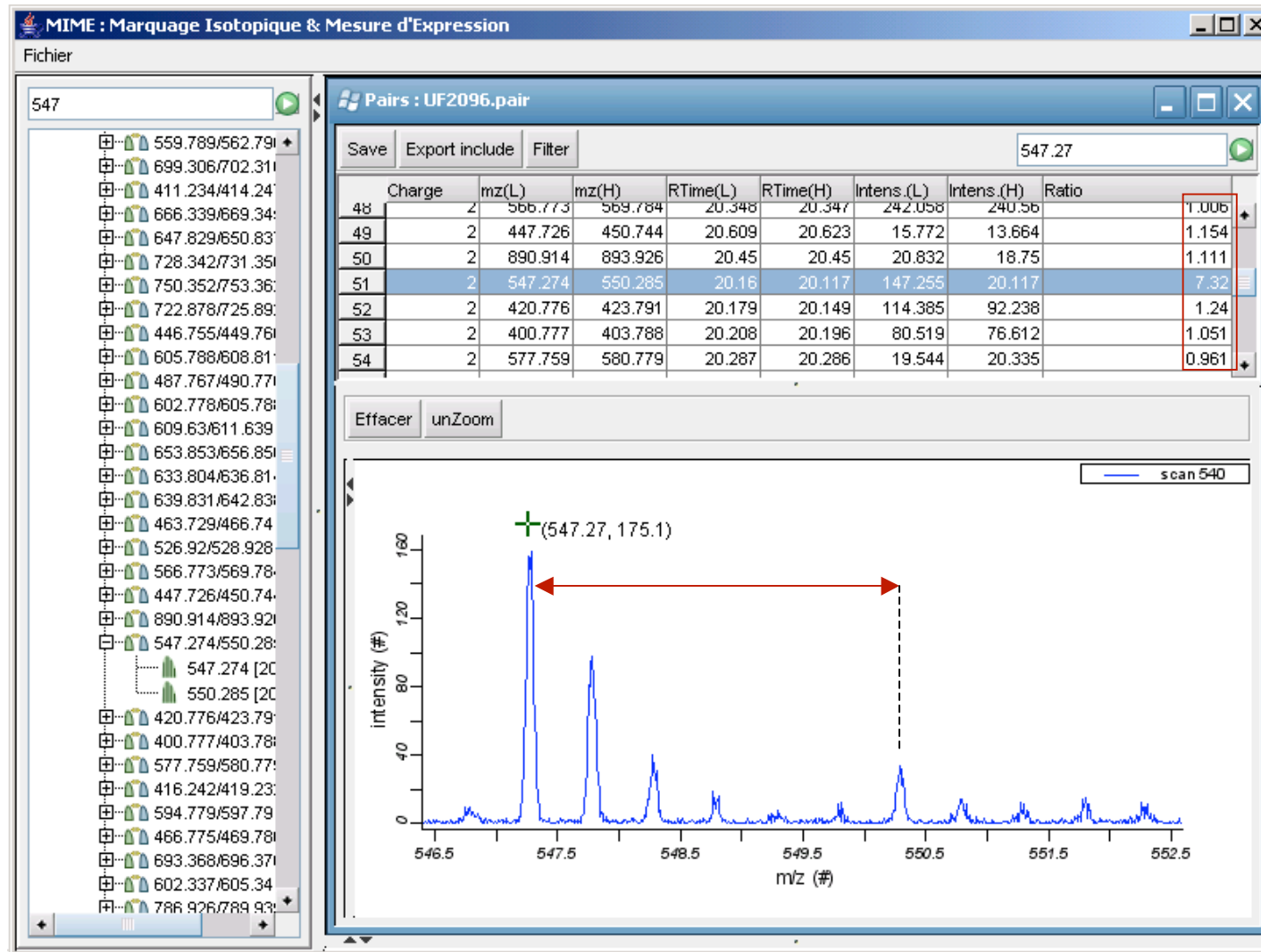


Protéomique quantitative

Développement d'outils informatiques pour l'analyse systématique des données d'expression

RMI

MIME



Protéomique quantitative

Bilan des analyses à réaliser

NanoLC-MS :

Marquage $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$: 20 échantillons (x 3)

Marquage $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: 20 échantillons (x 3)

NanoLC-MS/MS :

Marquage $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$: 20 échantillons

Marquage $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: 20 échantillons

Protéomique quantitative

Bilan des analyses à réaliser

NanoLC-MS :

Marquage $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$: 20 échantillons (x 3)

Marquage $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: 20 échantillons (x 3)

NanoLC-MS/MS

Marquage $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$: 20 échantillons

Marquage $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: 20 échantillons

Timing des analyses

J0	NanoLC-MS (3 échantillons) + RMI/MIME
J1	NanoLC-MS/MS (3 échantillons) + NanoLC-MS (nouveaux éch.)

Protéomique quantitative

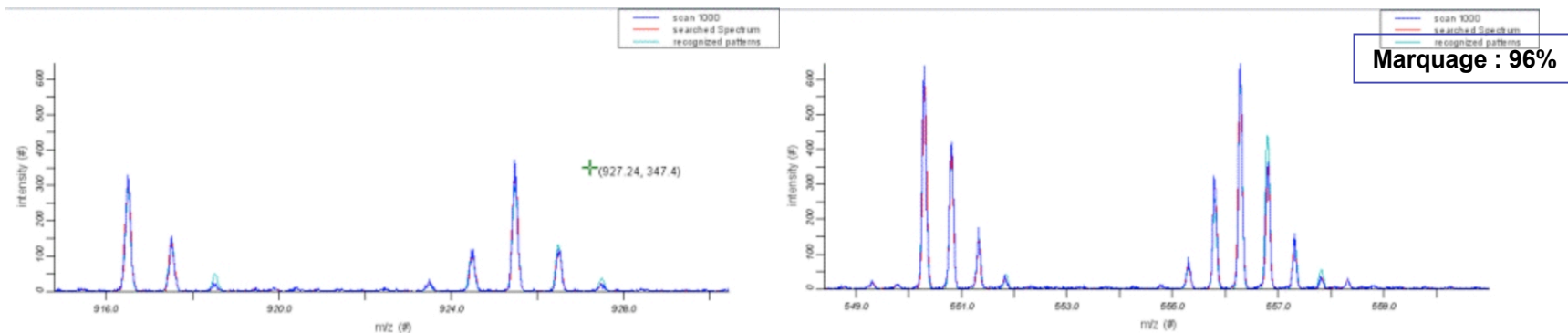
Méthodes de marquage isotopique des protéines (N15)

- **Contexte**
 - Quantification des protéines de la membrane plasmique des cellules d'*Arabidopsis Thaliana* soumises à un stress.

Protéomique quantitative

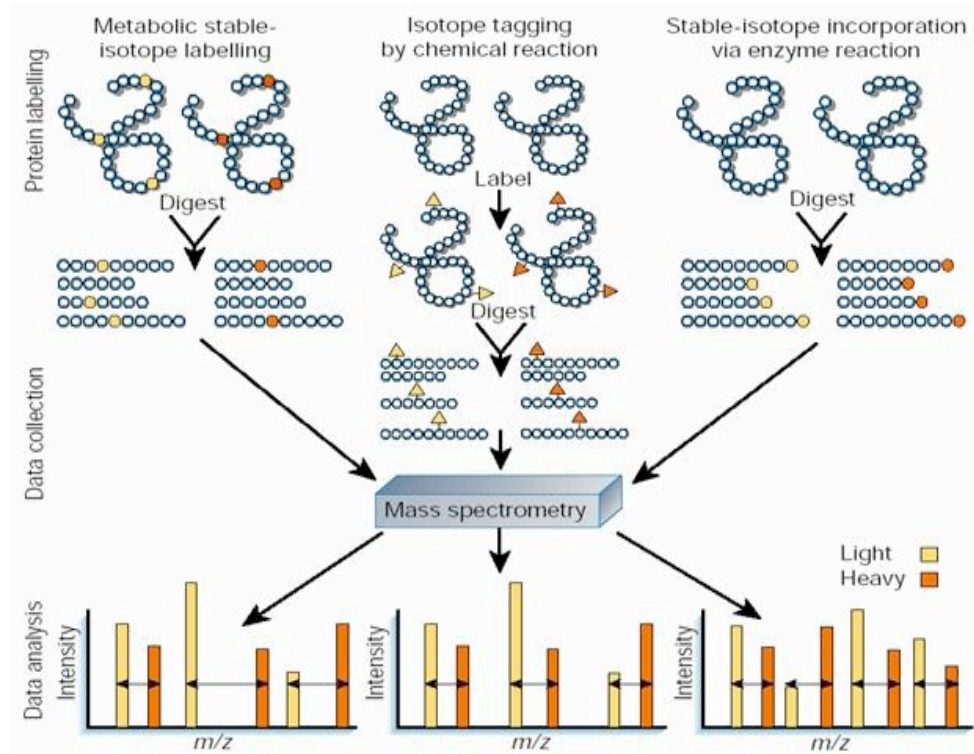
Méthodes de marquage isotopique des protéines (N15)

- Contexte
 - Quantification des protéines de la membrane plasmique des cellules d'*Arabidopsis Thaliana* soumises à un stress.
- Le marquage isotopique à l'azote 15 modifie le profil du massif isotopique
 - Modification du modèle utilisé dans RMI pour prendre en compte:
 - Le marquage N¹⁵ proprement dit (modification des abondances relatives des isotopes)
 - Son efficacité
 - Détection des peptides N¹⁴ et des peptides N¹⁵



Protéomique quantitative

Méthodes de marquage isotopique des protéines



(Aebersold, R.; Mann, M. *Nature* 2003, 422, 198-207)

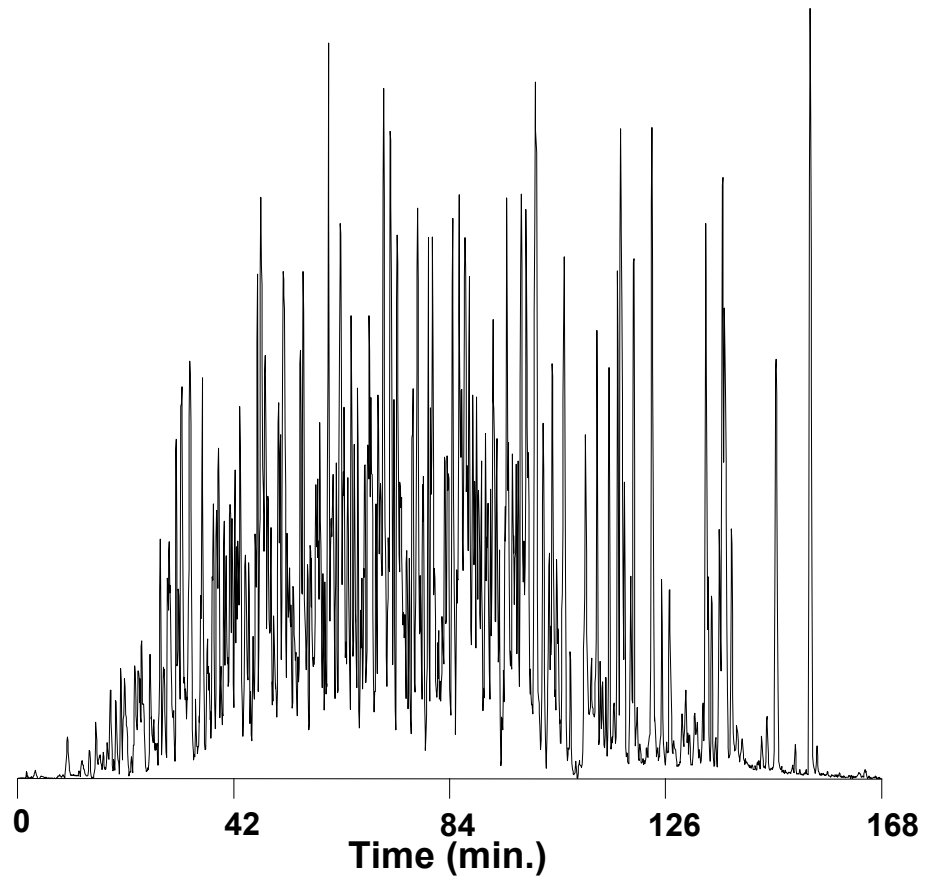
Protéomique quantitative

Méthodes de marquage isotopique des protéines : les difficultés

- **Masse des données (liée à complexité échantillon et/ou validation)**
- **Analyse du signal (gamme dynamique d'expression)**
- **Les paires présentant les ratios les plus forts sont les plus difficiles à détecter !**
- **Marquage avec δ faible (chevauchement de massifs isotopiques)**
- ...

Protéomique quantitative

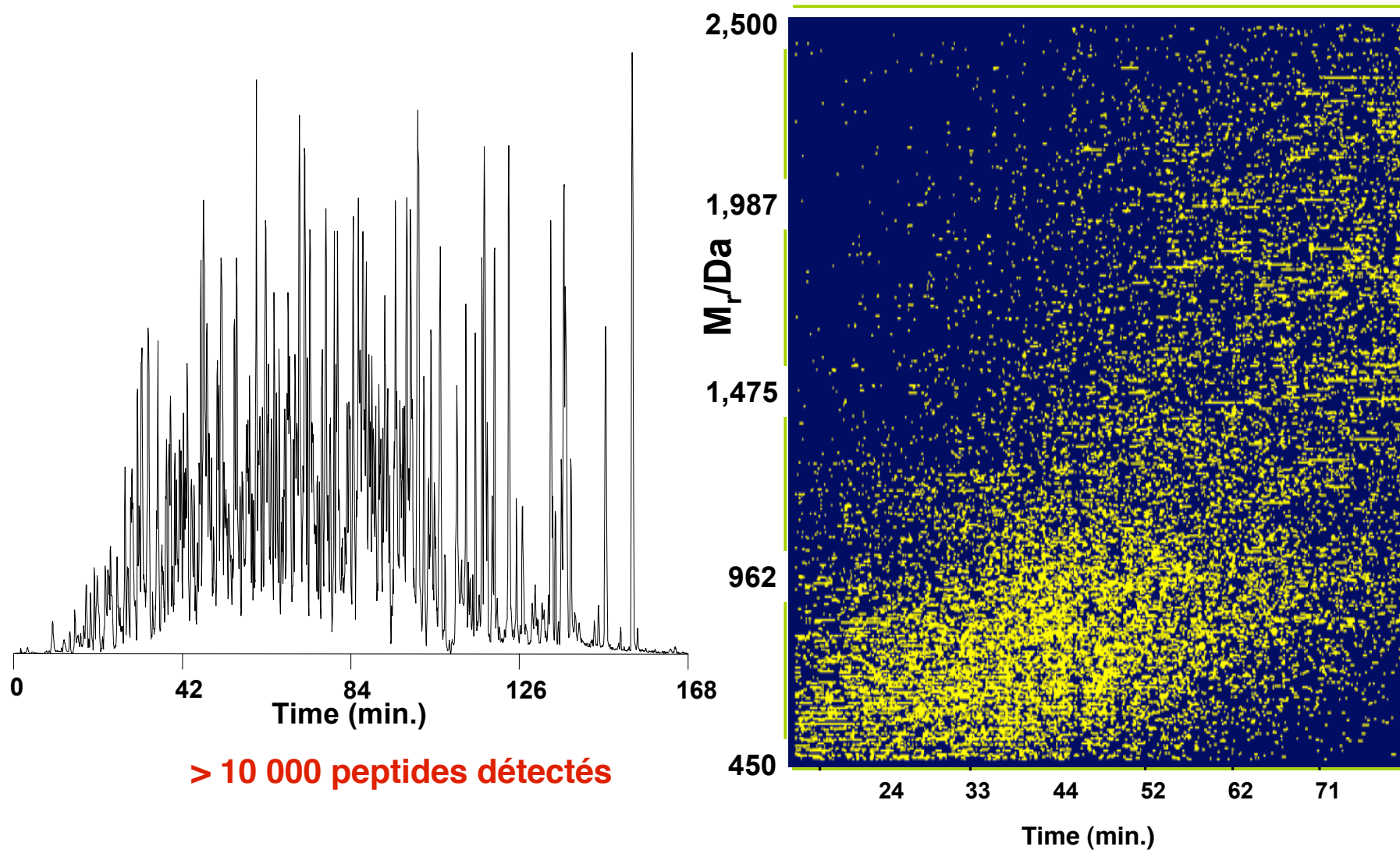
Analyse directe du signal d'ions



> 10 000 peptides détectés

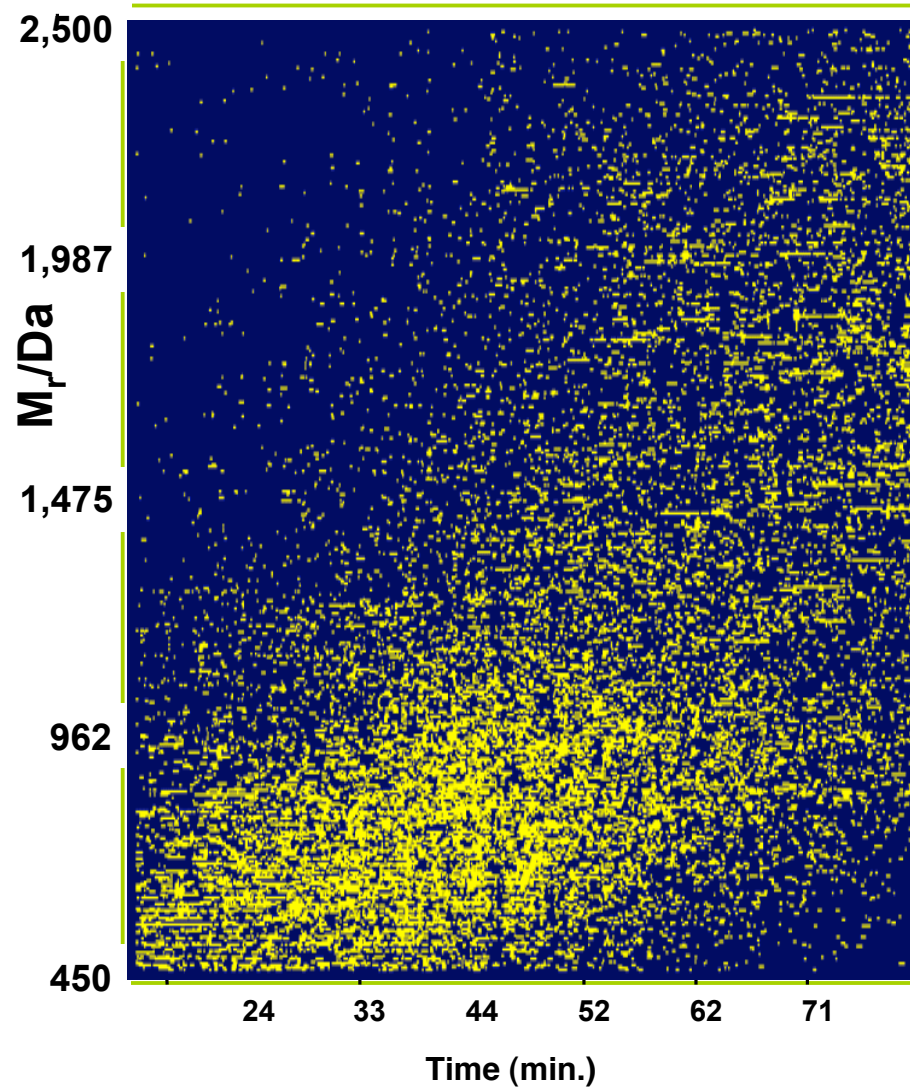
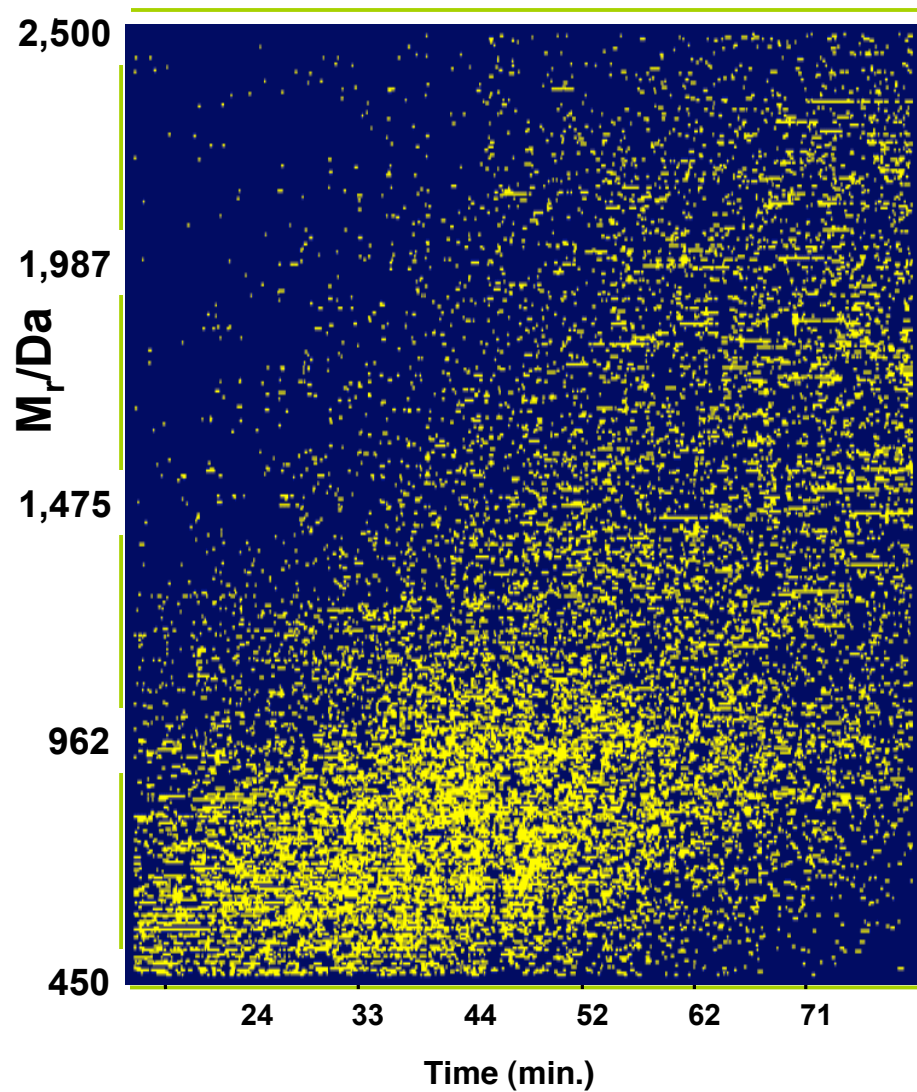
Protéomique quantitative

Analyse directe du signal d'ions



Protéomique quantitative

Analyse directe du signal d'ions



MCP recommendations ...

Manuscripts presenting any conclusions citing quantitative proteomic results should contain the following information:

The experimental design and data analysis methods should be described in sufficient detail to enable critical assessment of the reliability of the results and conclusions. **All relevant quantitative data must be made available.** The amount of data and method description is considered sufficient when it is possible to reproduce the reported results or critically reanalyze the data. Citation of standard methods covered in publications or specialized software may be used. However, where any deviations exist and for all methods not covered by citation, authors must describe:

- The methods for how the biological reliability of measurements was validated using biological replicates, **statistical methods**, independent experiments, etc.
- The methods for how the analytical reliability of measurements was validated using technical replicates and **statistical methods**.
- The **treatment of relevant systematic error effects** such as peptides shared by multiple proteins, interference from overlapping precursor ions, incomplete isotope labeling, bias correction for pipetting error, etc.
- The **treatment of random error** issues such as outlier rejection and the categorical exclusion of data by thresholds, for example, based on signal to noise or minimum ion counts.
- All quantitative results upon which conclusions are based must bear proper estimates of uncertainty and **the methods for the error analysis should be clearly described**.
- **The absence of thorough validation of both analytical and biological results, including error analysis should result in rejection.** Results with associated protein identifications or post-translational modifications must also follow the respective guidelines.