



TEQAP: Tri Et Quantification d'Analyses Protéomiques

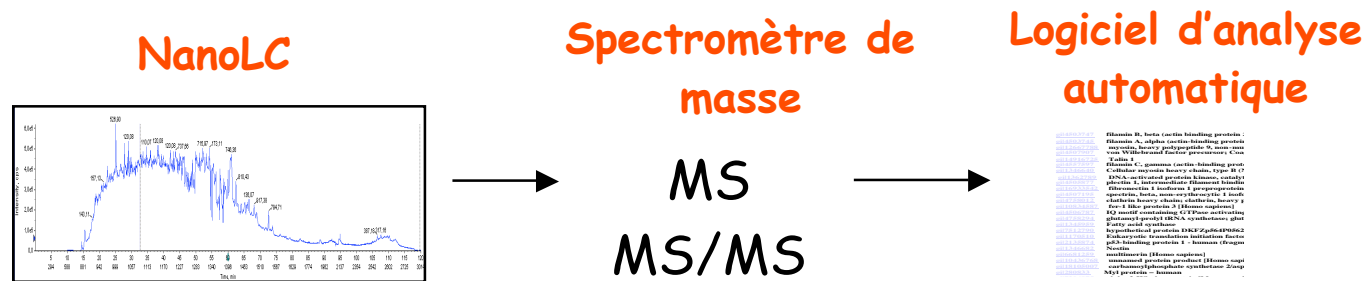
D. Bouyssié, E. Mouton, A. Gonzalez de Peredo, R. Albigot
O. Schiltz et B. Monsarrat.

Laboratoire de Protéomique et Spectrométrie de Masse des biomolécules

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS UMR 5089 Toulouse



Stratégies de protéomique différentielle basées sur l'analyse de mélanges peptidiques par nanoLC-MS/MS

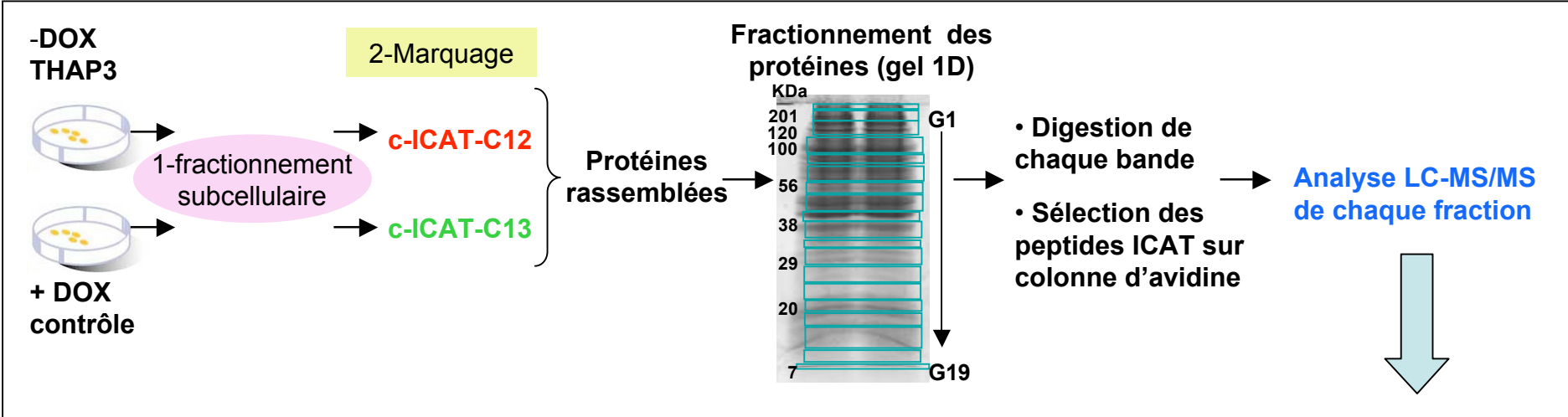


- Comparaison des listes de protéines
- Comparaison basée sur les spectres MS/MS
- Comparaison basée sur les spectres MS
 - Avec marquage isotopique (ICAT, SILAC, iTRAQ,....)
 - Sans marquage

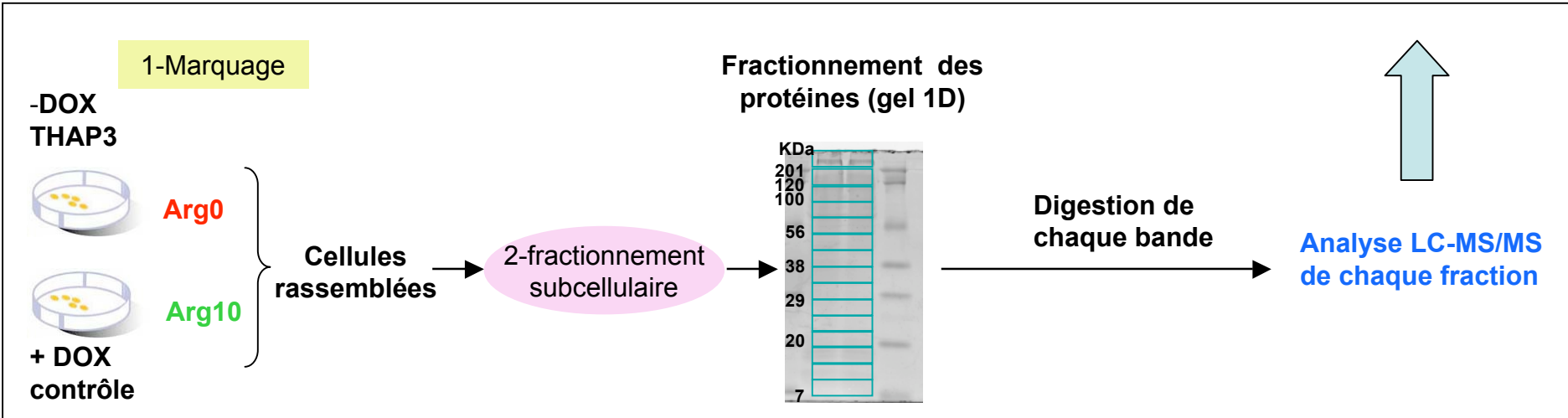
*Outils
bioinformatiques*

Stratégies de protéomique différentielle par marquage isotopique et nanoLC-MS/MS

ICAT



SILAC



Analyses Mascot

Traitement bioinformatique des données de nanoLC-MS/MS: Problèmes et objectifs

- Présence de faux positifs et de faux négatifs dans les listes Mascot

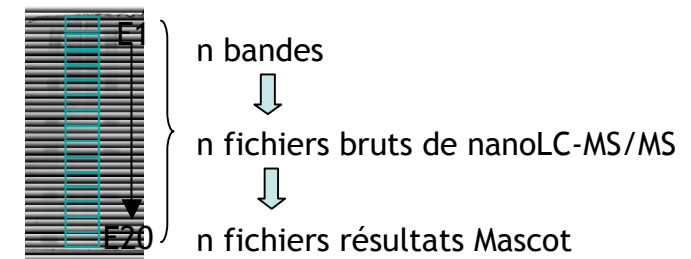
⇒ Tri et Validation

```

IPI00001159 Tax_Id=9606 GCN1-like protein 1
IPI00009930 Tax_Id=9606 Splice Isoform LAMP-2A of Lysosome-associated membrane glycoprotein 2
IPI00020210 Tax_Id=9606 Dysferlin
IPI00297415 Tax_Id=9606 Splice Isoform 1 of Dedicator of cytokinesis protein 4
IPI00021983 Tax_Id=9606 Splice Isoform 1 of Nicastrin precursor
IPI00012490 Tax_Id=9606 Splice Isoform XD of Plasma membrane calcium-transporting protein 1
IPI00132940 Tax_Id=9606 OTHURP00000016748
IPI00219249 Tax_Id=9606 Contactin associated protein 1 precursor
IPI00007150 Tax_Id=9606 Tubulin alpha-1 chain
IPI00102885 Tax_Id=9606 Transmembrane protein
IPI00220068 Tax_Id=9606 HE-4 protein
IPI00386330 Tax_Id=9606 Hypothetical protein FLJ14335
IPI00022228 Tax_Id=9606 Vigilin
IPI00045914 Tax_Id=9606 Hmx2-interacting protein
IPI00294834 Tax_Id=9606 Asparaginyl (asparaginyl) beta-hydroxylase
IPI00018730 Tax_Id=9606 Neuronal voltage-dependent calcium channel alpha 2D subunit
IPI00455968 Tax_Id=9606 Hypothetical protein FLJ44048
IPI00455689 Tax_Id=9606 PREDICTED: similar to Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin 18)
IPI00289861 Tax_Id=9606 Splice Isoform 1 of Zinc finger CCHC domain containing protein 1
  
```

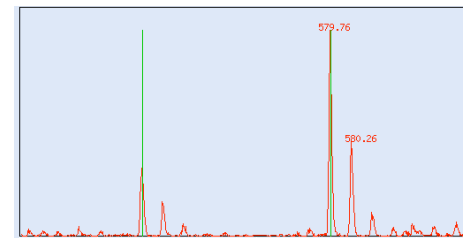
- Fractionnement protéique: présence de protéines redondantes dans des fractions consécutives

⇒ Concaténation des résultats



- Expériences de marquage isotopique ICAT et SILAC: calculer le ratio des protéines validées

⇒ Quantification à partir des données brutes

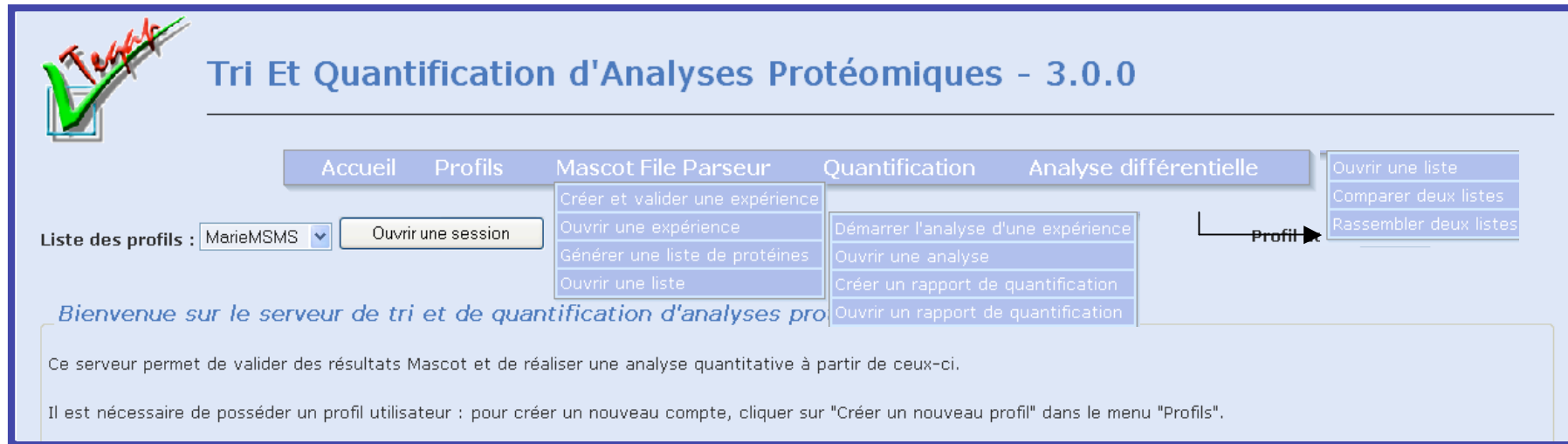


- Utilisation des listes (rapports, autres applications)

⇒ Exportation au format XML et Excel

| Seq# | Accession | Description | Score | MS/MS | Protein | Protein | |
|------|-----------|-------------|--|-------|---------|---------|-----|
| 1 | Q9H024 | MYO7A_HUMAN | Myosin VIIa (non-protein) | 2912 | 28100 | 114 | 112 |
| 2 | Q9H025 | MYO7A_HUMAN | Non-Muscle myosin heavy chain (NMII) (Contractile) | 1630 | 32000 | 81 | 81 |
| 3 | Q9H026 | MYO7A_HUMAN | Dystrobryon (Dystrobryon-associated protein-1-like protein) (DAP-1-like protein) | 611 | 29000 | 96 | 21 |
| 4 | Q9H027 | MYO7A_HUMAN | Calcium-binding transcription factor 1 (CBTF1) (Calcium-binding transcription factor 1) | 311 | 11400 | 27 | 10 |
| 5 | Q9H028 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type A (Cellular myosin heavy chain, type A) (Nonmuscle myosin A) | 341 | 29700 | 94 | 8 |
| 6 | Q9H029 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type B (Cellular myosin heavy chain, type B) (Nonmuscle myosin B) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 7 | Q9H030 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type C (Cellular myosin heavy chain, type C) (Nonmuscle myosin C) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 8 | Q9H031 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type D (Cellular myosin heavy chain, type D) (Nonmuscle myosin D) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 9 | Q9H032 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type E (Cellular myosin heavy chain, type E) (Nonmuscle myosin E) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 10 | Q9H033 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type F (Cellular myosin heavy chain, type F) (Nonmuscle myosin F) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 11 | Q9H034 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type G (Cellular myosin heavy chain, type G) (Nonmuscle myosin G) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 12 | Q9H035 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type H (Cellular myosin heavy chain, type H) (Nonmuscle myosin H) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 13 | Q9H036 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type I (Cellular myosin heavy chain, type I) (Nonmuscle myosin I) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 14 | Q9H037 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type J (Cellular myosin heavy chain, type J) (Nonmuscle myosin J) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 15 | Q9H038 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type K (Cellular myosin heavy chain, type K) (Nonmuscle myosin K) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 16 | Q9H039 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type L (Cellular myosin heavy chain, type L) (Nonmuscle myosin L) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 17 | Q9H040 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type M (Cellular myosin heavy chain, type M) (Nonmuscle myosin M) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 18 | Q9H041 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type N (Cellular myosin heavy chain, type N) (Nonmuscle myosin N) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 19 | Q9H042 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type O (Cellular myosin heavy chain, type O) (Nonmuscle myosin O) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 20 | Q9H043 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type P (Cellular myosin heavy chain, type P) (Nonmuscle myosin P) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 21 | Q9H044 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type Q (Cellular myosin heavy chain, type Q) (Nonmuscle myosin Q) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 22 | Q9H045 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type R (Cellular myosin heavy chain, type R) (Nonmuscle myosin R) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 23 | Q9H046 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type S (Cellular myosin heavy chain, type S) (Nonmuscle myosin S) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 24 | Q9H047 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type T (Cellular myosin heavy chain, type T) (Nonmuscle myosin T) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 25 | Q9H048 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type U (Cellular myosin heavy chain, type U) (Nonmuscle myosin U) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 26 | Q9H049 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type V (Cellular myosin heavy chain, type V) (Nonmuscle myosin V) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 27 | Q9H050 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type W (Cellular myosin heavy chain, type W) (Nonmuscle myosin W) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 28 | Q9H051 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type X (Cellular myosin heavy chain, type X) (Nonmuscle myosin X) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 29 | Q9H052 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type Y (Cellular myosin heavy chain, type Y) (Nonmuscle myosin Y) | 341 | 29700 | 94 | 12 |
| 30 | Q9H053 | MYO7A_HUMAN | Myosin heavy chain, non-muscle type Z (Cellular myosin heavy chain, type Z) (Nonmuscle myosin Z) | 341 | 29700 | 94 | 12 |

TEQAP: Tri Et Quantification d'Analyses Proteomiques



Tri Et Quantification d'Analyses Protéomiques - 3.0.0

Accueil Profils Mascot File Parseur Quantification Analyse différentielle

Liste des profils : MarieMSMS

Mascot File Parseur
Créer et valider une expérience
Ouvrir une expérience
Générer une liste de protéines
Ouvrir une liste

Quantification
Démarrer l'analyse d'une expérience
Ouvrir une analyse
Créer un rapport de quantification
Ouvrir un rapport de quantification

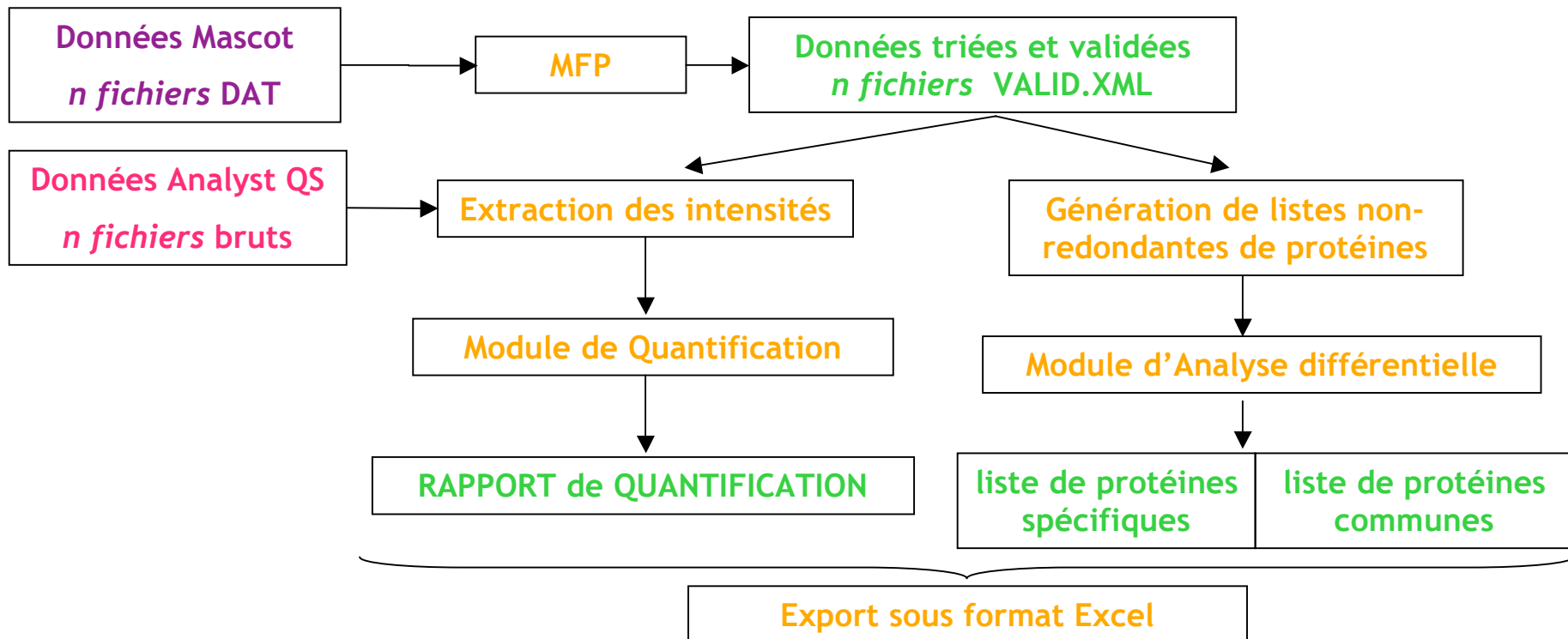
Analyse différentielle
Ouvrir une liste
Comparer deux listes
Rassembler deux listes

Profil

Bienvenue sur le serveur de tri et de quantification d'analyses proteomiques

Ce serveur permet de valider des résultats Mascot et de réaliser une analyse quantitative à partir de ceux-ci.

Il est nécessaire de posséder un profil utilisateur : pour créer un nouveau compte, cliquer sur "Créer un nouveau profil" dans le menu "Profils".



Module MFP (Mascot File Parseur)

1ère étape: tri automatique des protéines

Règles de filtrage définies par l'utilisateur, basées sur le nombre, le rang, et le score des peptides:

- critères de validation
- critères d'exclusion

Options générales

Type de profil : Extraction du score :

Règles de filtrage

Filtrer sur le score des protéines (extraction des "significants hits")

Filtrer sur le score des peptides :

Une protéine est valide si elle possède au moins :

peptides de rang minimum et dont le score est supérieur à

ou

peptides de rang minimum et dont le score est supérieur à

ou

peptides de rang minimum et dont le score est supérieur à

Une protéine n'est pas valide si elle ne possède pas au moins :

peptides de rang minimum et dont le score est supérieur à

ou

peptides de rang minimum et dont le score est supérieur à

Résultat de la validation automatique (tableau concis):

- Les protéines répondant aux critères prédéfinis sont validées (vert)
- Les protéines ambiguës apparaissent en rouge et doivent être vérifiées manuellement

MFP - Protéines identifiées dans le fichier n°008928 (échantillon F2 de l'expérience anne série F)

[Générer une liste d'exclusion](#) [Exporter au format Microsoft Excel®](#)

| Hit | N° accession - désignation | Description | Score | PM | PI | % de Peptides couv. | Peptides R&G | Protéine valide |
|--------|----------------------------|---|-------|--------|-------|---------------------|--------------|-----------------|
| 1 | IP100013744 - | Integrin alpha-2 precursor | 292 | 129214 | 5.16 | 7 | 9 | 9 |
| 2 | IP100157687 - | Splice Isoform Delta15 of Platelet endothelial cell adhesion molecule precursor | 272 | 81326 | 6.82 | 15 | 13 | 13 |
| 3 | IP100006482 - | Splice Isoform Long of Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-1 chain precursor | 176 | 112824 | 5.33 | 5 | 5 | 4 |
| 4 | IP100016334 - | Cell surface glycoprotein MUC18 precursor | 157 | 71749 | 5.65 | 9 | 8 | 8 |
| 5 | IP100025054 - | Splice Isoform Long of Heterogenous nuclear ribonucleoprotein U | 146 | 90423 | 5.76 | 6 | 9 | 7 |
| 6 | IP100217561 - | Splice Isoform Beta-1C of Integrin beta-1 precursor | 135 | 91610 | 5.34 | 7 | 7 | 7 |
| 7 | IP100218845 - | Nitric-oxide synthase, endothelial | 134 | 133074 | 6.98 | 4 | 6 | 6 |
| 8 (3) | IP100003021 - | Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-2 chain precursor | 134 | 112193 | 5.47 | 5 | 5 | 0 |
| 9 (3) | IP100302840 - | Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-3 chain | 134 | 111663 | 5.22 | 5 | 5 | 0 |
| 10 (3) | IP100375339 - | Splice Isoform 1 of Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-4 chain | 130 | 114093 | 6.23 | 5 | 7 | 0 |
| 11 | IP100306604 - | Integrin alpha-5 precursor | 118 | 114465 | 5.50 | 3 | 7 | 6 |
| 12 | IP100010418 - | Myosin 1c | 102 | 121606 | 9.46 | 2 | 4 | 4 |
| 13 | IP100027505 - | Integrin alpha-V precursor | 94 | 115978 | 5.45 | 4 | 9 | 9 |
| 14 | IP100299485 - | Complement Component 1, q subComponent, receptor 1 | 90 | 68532 | 5.27 | 3 | 2 | 2 |
| 15 | IP100022143 - | Family with sequence similarity 62 (C2 domain containing), member A | 78 | 122780 | 5.57 | 4 | 3 | 3 |
| 16 | IP100219078 - | Splice Isoform SERCA2B of Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 | 72 | 114683 | 5.23 | 3 | 4 | 3 |
| 17 | IP100005737 - | Splice Isoform 1 of Surfeit locus protein 4 | 72 | 38374 | 7.64 | 5 | 2 | 2 |
| 18 | IP100414717 - | Golgi apparatus protein 1 | 64 | 137132 | 6.52 | 3 | 3 | 3 |
| 19 | IP100221224 - | Aminopeptidase N | 60 | 109312 | 5.27 | 1 | 6 | 6 |
| 20 | IP100296992 - | Splice Isoform Long of Tyrosine-protein kinase receptor UFO precursor | 55 | 97375 | 5.14 | 2 | 1 | 1 |
| 21 | IP100220350 - | Splice Isoform Beta-3B of Integrin beta-3 precursor | 48 | 86212 | 5.10 | 4 | 2 | 2 |
| 22 | IP100012490 - | Splice Isoform XD of Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4 | 44 | 137833 | 6.19 | 1 | 1 | 1 |
| 23 | IP100019530 - | Tyrosine-protein kinase receptor Tie-1 precursor | 43 | 125010 | 6.63 | 1 | 2 | 2 |
| 24 | IP100006608 - | Splice Isoform APP770 of Amyloid beta A4 protein precursor | 41 | 86888 | 4.73 | 2 | 1 | 1 |
| 25 | IP100010697 - | Splice Isoform Alpha-6X1X2B of Integrin alpha-6 precursor | 39 | 126539 | 6.39 | 1 | 2 | 2 |
| 26 | IP100334191 - | Hypothetical protein EIF389 | 37 | 92295 | 4.91 | 1 | 1 | 1 |
| 27 | IP100185919 - | KIAA0731 protein | 34 | 123434 | 8.91 | 1 | 2 | 2 |
| 28 | IP100029012 - | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10 | 33 | 166468 | 6.38 | 1 | 1 | 1 |
| 29 | IP100303182 - | Hypothetical protein LOC90557 | 33 | 41580 | 10.52 | 2 | 1 | 0 |
| 30 | IP100221240 - | Splice Isoform 2 of Leucyl-cystinyl aminopeptidase | 33 | 115532 | 5.50 | 1 | 2 | 2 |
| 31 | IP100026944 - | Nidogen precursor | 32 | 136403 | 5.16 | 1 | 1 | 1 |
| 32 | IP100063523 - | PREDICTED: similar to Centromeric protein E (CENP-E protein) | 31 | 741434 | 9.06 | 1 | 3 | 2 |
| 39 | IP100297160 - | Hypothetical protein DKFZp451K1918 | 22 | 39363 | 5.20 | 3 | 2 | 2 |
| 44 | IP100293423 - | Perforin 1 precursor | 19 | 61339 | 8.05 | 1 | 1 | 1 |
| 46 | IP100026305 - | Hook homolog 1 | 18 | 84595 | 5.09 | 1 | 1 | 1 |
| 47 | IP100216550 - | Splice Isoform 1 of Complement decay-accelerating factor precursor | 18 | 48686 | 8.72 | 3 | 1 | 0 |
| 49 | IP100423380 - | Ankyrin-repeat-ARM domain protein | 17 | 40496 | 6.23 | 2 | 1 | 1 |
| 50 | IP100024067 - | Clathrin heavy Chain 1 | 16 | 191493 | 5.48 | 1 | 1 | 1 |
| 52 | IP100373784 - | PREDICTED: Similar to hypothetical gene supported by AL050367 | 16 | 77714 | 10.51 | 1 | 1 | 1 |
| 54 | IP100457064 - | PREDICTED: similar to zonadhesin | 16 | 426439 | 6.85 | 0 | 1 | 1 |

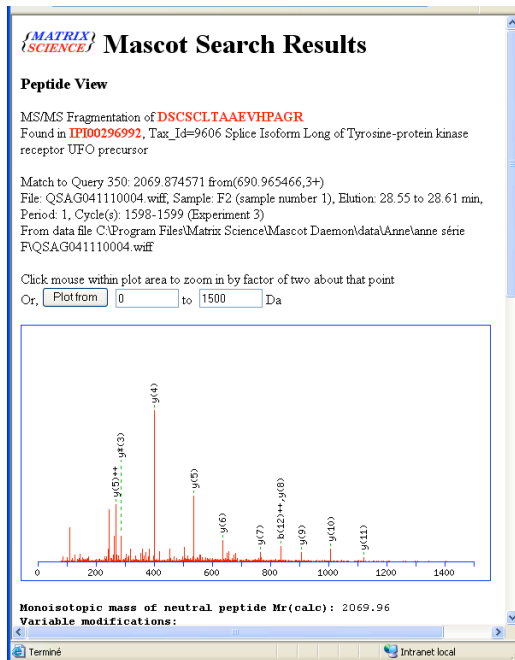
Valider et enregistrer les résultats

Module MFP (Mascot File Parseur)

2ème étape: validation manuelle des protéines ambiguës

Tableau détaillé:

- Affichage des peptides attribués à chaque protéine
- Visualisation rapide des spectres MS/MS
- L'utilisateur peut choisir de valider une protéine ambiguë



Lien
hypertexte
vers spectre
MS/MS

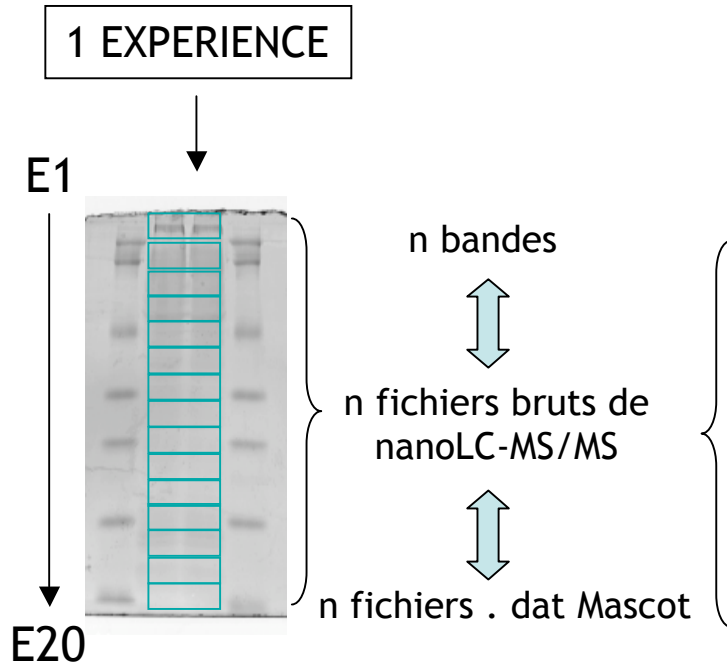
| Hit | N° accession - désignation | Description | Score | PM | PI | % de Peptides couv. | Peptides R&G | Protéine valide | | | |
|-------|----------------------------|---|---------|---------|---------|---------------------|--------------|-----------------|------|---|----------|
| 19 | IPI00221224 - | Aminopeptidase N | 60 | 109312 | 5.27 | 1 | 6 | 6 | | | |
| Query | m/z | Charge | M exp. | M théo. | Delta | CM | Score | Expect | Rang | Séquence | Position |
| 242 | 754.34 | 2 | 1506.67 | 1506.69 | -0.027 | 0 | 37 | 0.0231 | 1 | SFPCFDEPAMK + C_ICAT_heavy (C) | 219-229 |
| 244 | 505.53 | 3 | 1513.57 | 1513.66 | -0.085 | 0 | 25 | 0.268 | 1 | SFPCFDEPAMK + Oxidation (M); C_ICAT_light (C) | 219-229 |
| 245 | 757.8 | 2 | 1513.59 | 1513.66 | -0.07 | 0 | 23 | 0.404 | 1 | SFPCFDEPAMK + Oxidation (M); C_ICAT_light (C) | 219-229 |
| 249 | 762.31 | 2 | 1522.61 | 1522.69 | -0.076 | 0 | 23 | 0.491 | 1 | SFPCFDEPAMK + Oxidation (M); C_ICAT_heavy (C) | 219-229 |
| 281 | 548.24 | 3 | 1641.69 | 1641.75 | -0.065 | 1 | 22 | 0.665 | 1 | K8FPCFDEPAMK + Oxidation (M); C_ICAT_light (C) | 218-229 |
| 282 | 551.24 | 3 | 1650.7 | 1650.78 | -0.085 | 1 | 22 | 0.753 | 1 | K8FPCFDEPAMK + Oxidation (M); C_ICAT_heavy (C) | 218-229 |
| Hit | N° accession - désignation | Description | Score | PM | PI | % de Peptides couv. | Peptides R&G | Protéine valide | | | |
| 20 | IPI00296992 - | Splice Isoform Long of Tyrosine-protein kinase receptor UFO precursor | 55 | 97375 | 5.14 | 2 | 1 | 1 | | | |
| Query | m/z | Charge | M exp. | M théo. | Delta | CM | Score | Expect | Rang | Séquence | Position |
| 350 | 690.97 | 3 | 2069.87 | 2069.96 | -0.088 | 0 | 55 | 0.000335 | 1 | DSCSCLTAAEVHPAGR + 2 C_ICAT_light (C) | 843-858 |
| Hit | N° accession - désignation | Description | Score | PM | PI | % de Peptides couv. | Peptides R&G | Protéine valide | | | |
| 21 | IPI00220350 - | Splice Isoform Beta-3B of Integrin beta-3 precursor | 48 | 86212 | 5.10 | 4 | 2 | 2 | | | |
| Query | m/z | Charge | M exp. | M théo. | Delta | CM | Score | Expect | Rang | Séquence | Position |
| 342 | 667.29 | 3 | 1998.84 | 1998.94 | -0.1 | 0 | 39 | 0.0128 | 1 | DNCAPESIEFFVSEAR + C_ICAT_heavy (C) | 73-88 |
| 369 | 750.33 | 3 | 2247.96 | 2248.01 | -0.048 | 0 | 11 | 6.159 | 1 | DAPEGGFDAIMQATVCDEK + Oxidation (M); C_ICAT_heavy (C) | 243-261 |
| Hit | N° accession - désignation | Description | Score | PM | PI | % de Peptides couv. | Peptides R&G | Protéine valide | | | |
| 22 | IPI00012490 - | Splice Isoform XD of Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4 | 44 | 137893 | 6.19 | 1 | 1 | 1 | | | |
| Query | m/z | Charge | M exp. | M théo. | Delta | CM | Score | Expect | Rang | Séquence | Position |
| 280 | 818.93 | 2 | 1635.84 | 1635.85 | -0.0092 | 0 | 44 | 0.0052 | 1 | TECALLGFVTLK + C_ICAT_light (C) | 535-547 |
| Hit | N° accession - désignation | Description | Score | PM | PI | % de Peptides couv. | Peptides R&G | Protéine valide | | | |
| 23 | IPI00019530 - | Tyrosine-protein kinase receptor Tie-1 precursor | 43 | 125010 | 6.63 | 1 | 2 | 2 | | | |
| Query | m/z | Charge | M exp. | M théo. | Delta | CM | Score | Expect | Rang | Séquence | Position |
| 227 | 725.85 | 2 | 1449.68 | 1449.72 | -0.036 | 0 | 43 | 0.00733 | 1 | DFAGELEVLCCK + C_ICAT_light (C) | 883-893 |
| 231 | 730.35 | 2 | 1458.68 | 1458.75 | -0.066 | 0 | 43 | 0.00769 | 1 | DFAGELEVLCCK + C_ICAT_heavy (C) | 883-893 |
| Hit | N° accession - désignation | Description | Score | PM | PI | % de Peptides couv. | Peptides R&G | Protéine valide | | | |

Une fois la validation terminée sur un fichier résultat:

- Enregistrement de la liste de protéines et de peptides au format XML
- Exportation de la liste au format Excel
- Génération d'une liste d'exclusion pour une 2ème analyse nanoLC-MS/MS

Module MFP (Mascot File Parseur)

3ème étape: Concaténation des résultats



TEQAP 3.0.0 - Tri Et Quantification d'Analyses Protéomiques

Accueil Profils Mascot File Parseur Quantification Analyse différentielle

Profil actif : Anne

[Ouvrir une expérience](#) → [Détail de l'expérience](#)

MFP - Détail de l'expérience anne série E

[Liste des .dat de l'expérience](#)

| Dat n° | Echantillon | Titre | Date de création | Base de données | Taxonomie | "Hits" | "Queries" |
|--------|-------------|--------------------|---------------------------------------|-----------------|----------------------|--------|-----------|
| 9071 | E1 | anne_serie_E (E1) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 14H04 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 464 |
| 9072 | E2 | anne_serie_E (E2) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 14H08 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 461 |
| 9073 | E3 | anne_serie_E (E3) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 14H14 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 557 |
| 9074 | E4 | anne_serie_E (E4) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 14H20 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 586 |
| 9075 | E5 | anne_serie_E (E5) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 14H25 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 514 |
| 9076 | E6 | anne_serie_E (E6) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 14H31 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 551 |
| 9077 | E7 | anne_serie_E (E7) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 14H37 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 530 |
| 9078 | E8 | anne_serie_E (E8) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 14H42 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 502 |
| 9079 | E9 | anne_serie_E (E9) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 14H47 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 465 |
| 9078 | E10 | anne_serie_E (E10) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 14H51 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 443 |
| 9077 | E11 | anne_serie_E (E11) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 14H56 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 453 |
| 9076 | E12 | anne_serie_E (E12) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 15H00 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 438 |
| 9075 | E13 | anne_serie_E (E13) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 15H04 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 450 |
| 9080 | E14 | anne_serie_E (E14) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 15H08 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 421 |
| 9081 | E15 | anne_serie_E (E15) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 15H12 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 425 |
| 9082 | E16 | anne_serie_E (E16) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 15H15 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 400 |
| 9083 | E17 | anne_serie_E (E17) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 15H18 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 409 |
| 9084 | E18 | anne_serie_E (E18) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 15H22 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 382 |
| 9085 | E19 | anne_serie_E (E19) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 15H24 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 350 |
| 9086 | E20 | anne_serie_E (E20) | Le vendredi 16 septembre 2005 à 15H27 | IPI_Human | Homo sapiens (human) | 500 | 317 |

Regroupement des résultats obtenus sur l'ensemble de l'expérience:

- Elimination des doublons
- Création d'une liste globale non redondante des protéines identifiées dans l'échantillon
- Exportation au format Excel

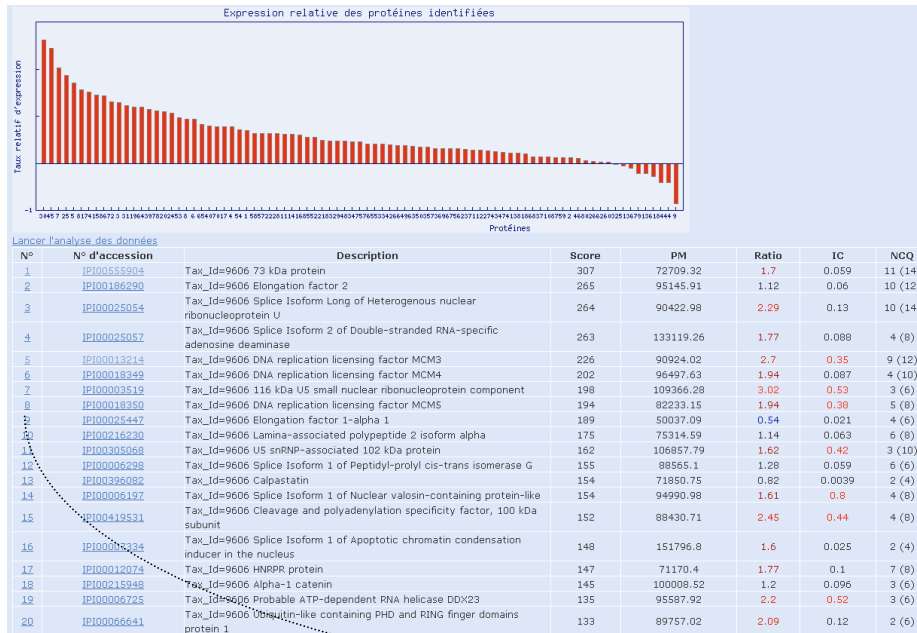
Module de Quantification

1- Extraction des intensités des précurseurs à partir des données brutes

Extraction en « batch » (Extract Daemon) en associant le fichier .dat de chacune des bandes de gel (après validation par MFP) au fichier brut correspondant.

2- Calcul des ratios des protéines

Fenêtre de visualisation des ratios de toutes les protéines d'une bande de gel



Fenêtre de vérification des ratios pour une protéine

Protéine n°5 (hit mascot 5) :
 Tax_Id=9606 DNA replication licensing factor MCM3
 Ratios moyens : H/L=2.7 L/H=0.37

Enregistrer

| Peptide | Mexp | Z | Séquence | Score | tMin | tMax | S. Ratio | Statut |
|----------|--------|--------------|-----------|---------------|------|---------------|----------|-------------------------------------|
| 1 | 575.27 | 2 | YVLC TAPR | 37 | 2352 | 2352 | 2.99 | OK |
| | | Temps | | Int. L | | Int. H | | Ratio H/L |
| 2347.962 | | 22 | | 41 | | | 1.86 | <input type="checkbox"/> |
| 2355.201 | | 130 | | 456 | | | 3.51 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 2362.441 | | 256 | | 745 | | | 2.91 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 2369.681 | | 110 | | 282 | | | 2.65 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 2376.916 | | 43 | | 88 | | | 2.05 | <input type="checkbox"/> |

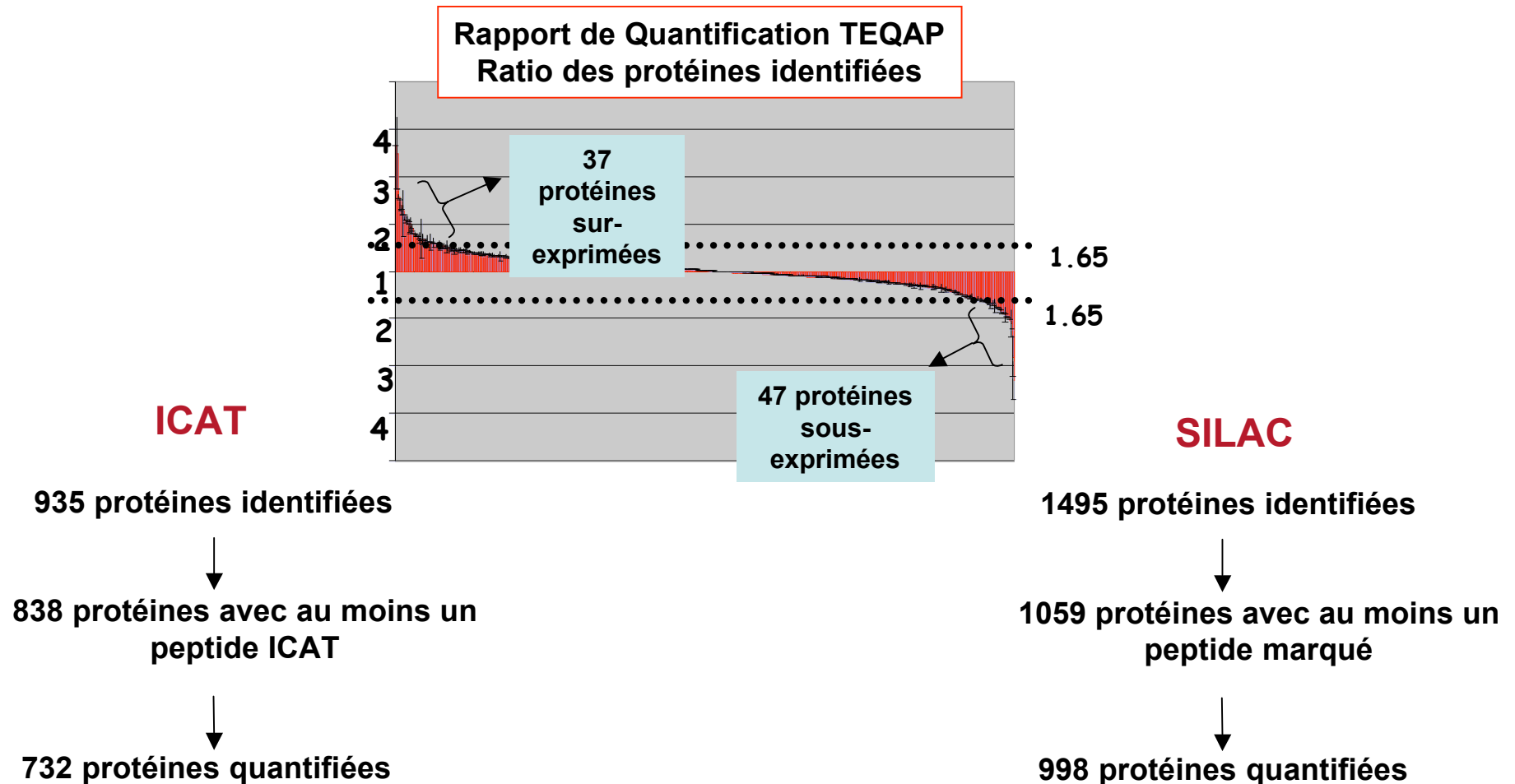
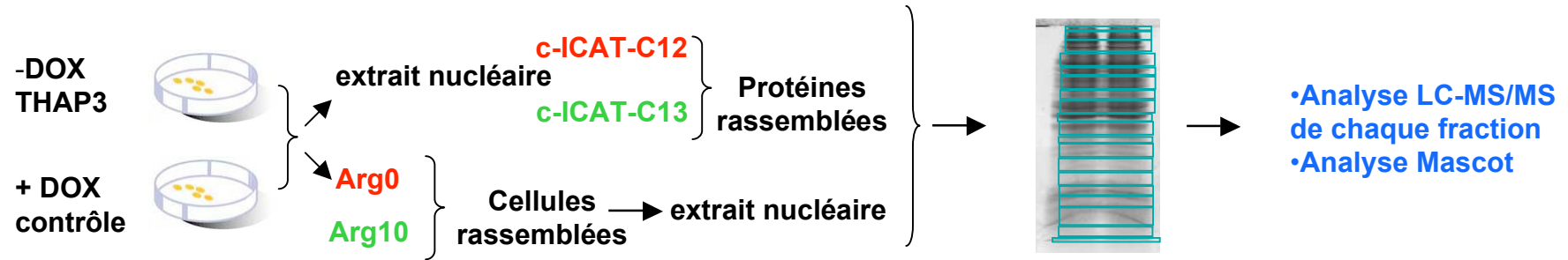
Spectre brut au temps 2362 s (39.4 min) :

| Peptide | Mexp | Z | Séquence | Score | tMin | tMax | S. Ratio | Statut |
|---------|----------|---|-----------|-------|--------|--------|----------|------------------------|
| 2 | 383.8467 | 3 | YVLC TAPR | | 2352 | 2352 | | faible intensité |
| | 386.8467 | | | | 2352 | 2352 | | |
| 3 | 594.3 | 2 | TVLIACNVK | 20 | 2503.2 | 2503.2 | 3.06 | OK |
| | 598.8 | | | 29 | 2496.6 | 2496.6 | | |
| 4 | 396.5333 | 3 | TVLIACNVK | | 2503.2 | 2503.2 | | coélution hypothétique |
| | 399.5333 | | | | 2503.2 | 2503.2 | | |
| 5 | 616.77 | 2 | SVHYCPATK | | 1429.2 | 1429.2 | 2.71 | coélution hypothétique |
| | 621.27 | | | 20 | 1429.2 | 1429.2 | | |
| 6 | 411.5133 | 3 | SVHYCPATK | | 1429.2 | 1429.2 | 2.07 | OK |
| | 414.5133 | | | | 1429.2 | 1429.2 | | |
| 7 | 676.28 | 2 | GVVCIDFDK | | 3112.8 | 3112.8 | 3.61 | OK |
| | 680.78 | | | 33 | 3112.8 | 3112.8 | | |
| 8 | 451.1867 | 3 | GVVCIDFDK | | 3112.8 | 3112.8 | 1.83 | faible intensité |
| | 454.1867 | | | | 3112.8 | 3112.8 | | |

3- Création du rapport de quantification

Liste globale et non redondante de l'ensemble des protéines identifiées dans l'expérience avec leur ratio moyen normalisé, exportable au format Excel.

Etude de THAP3: marquage ICAT et SILAC sur protéines nucléaires



Perspectives

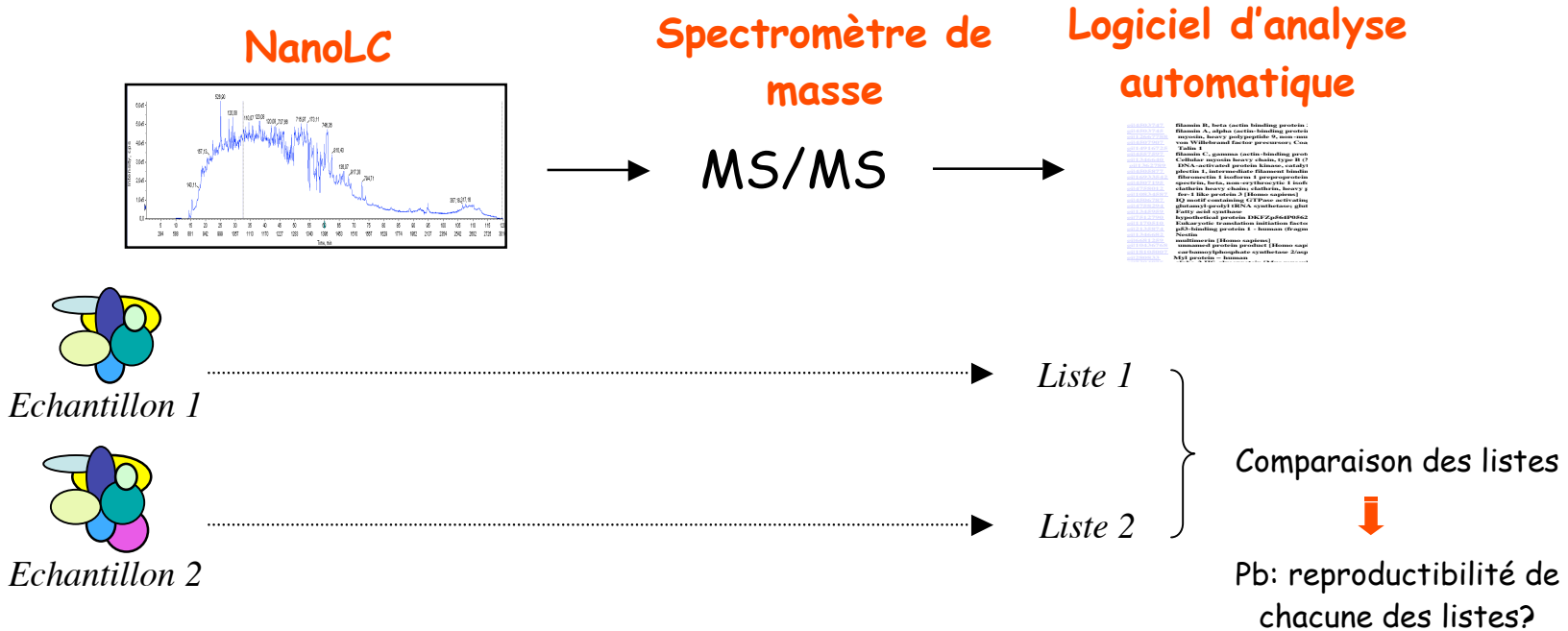
- Extension du module de quantification à d'autres types de marquages
 - ◇ Actuellement : ICAT SILAC
 - ◇ Perspectives : marquage métabolique N15, marquage enzymatique O18, marquage chimique iTRAQ

- Compatibilité avec d'autres types d'instruments
 - ◇ Actuellement : QSTAR (Applied Biosystems)
 - ◇ Perspectives : format unifié en protéomique de type mzXML

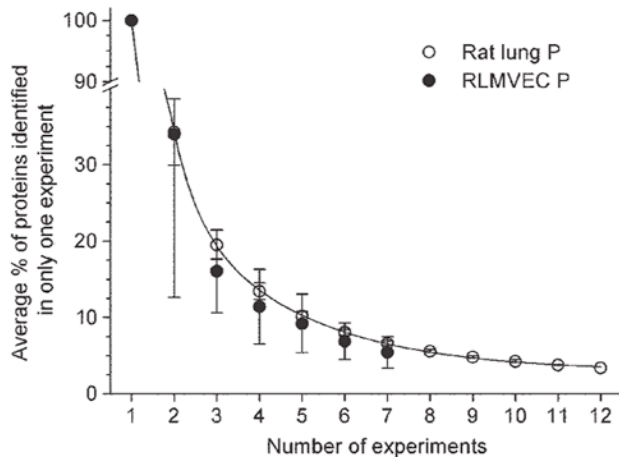
- Interprétation des résultats
 - ◇ Termes GO
 - ◇ Annotations SwissProt

- Autres stratégies de protéomique différentielle
 - ◇ Spectral counting
 - ◇ Intensité du signal MS

Analyse différentielle par comparaison de listes de protéines



► répéter la manip jusqu'à couverture analytique complète de l'échantillon



Ex: analyse de membrane plasmique de cellules endothéliales (Durr E et al, Nat Biotechnol. 2004)

- Run 1: 260 protéines identifiées
- Run 2: 34% de nouvelles protéines
- Run 3: 20% de nouvelles protéines
- ...
- Run10: 4.2% de nouvelles protéines

450 protéines avec une couverture analytique de 95%

Module d'Analyse différentielle

TEQAP 3.0.1 - Tri Et Quantification d'Analyses Protéomiques

Accueil Profils Mascot File Parseur Quantification Analyse différentielle

Profil actif : Anne

Ouverture d'une liste de protéines

Listes de protéines créées

| Cluster n° | Nom | Description | Date de création |
|--------------------|--|--|--------------------------------|
| 14 | expérience Gel GB 11/07/2005 | Liste des protéines de l'expérience expérience Gel GB 11/07/2005 | Le lundi 22 mai 2006 à 11H17 |
| 13 | expérience gel THAP3 14-4-2006 piste THAP dans l'ordre | Liste des protéines de l'expérience expérience gel THAP3 14-4-2006 piste THAP dans l'ordre | Le jeudi 27 avril 2006 à 16H08 |
| 12 | expérience gel THAP3 14-4-2006 piste contrôle dans l'ordre | Liste des protéines de l'expérience expérience gel THAP3 14-4-2006 piste contrôle dans l'ordre | Le jeudi 27 avril 2006 à 16H08 |

TEQAP 3.0.1 - Tri Et Quantification d'Analyses Protéomiques

Accueil Profils Mascot File Parseur Quantification Analyse différentielle

Profil actif : Anne

Ouverture d'une liste de protéines

Listes de protéines créées

| Cluster n° | Nom | Description | Date de création |
|-----------------------|--|-------------|------------------------------|
| 12-13 | Protéines spécifiques de 12 par rapport à 13 | - | Le mardi 30 mai 2006 à 11H31 |
| 13-12 | Protéines spécifiques de 13 par rapport à 12 | - | Le mardi 30 mai 2006 à 11H31 |
| 13+12 | Protéines communes entre 13 et 12 | - | Le mardi 30 mai 2006 à 11H31 |

Analyse semi-quantitative par comparaison du nombre de MS/MS par protéine

Protéine Q8WTV1 identifiée
dans l'échantillon 1

1. [THAP3_HUMAN](#) Mass: 27384 Score: 819 Queries matched: 21
(Q8WTV1) THAP domain-containing protein 3
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

| Query | Observed | Mr(expt) | Mr(calc) | Delta | Miss | Score | Expect | Rank | Peptide |
|---|----------|----------|----------|-------|------|-------|----------|------|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> 17 | 367.72 | 733.44 | 733.47 | -0.04 | 0 | 35 | 0.058 | 1 | K.LFLTLK.E |
| <input checked="" type="checkbox"/> 22 | 384.72 | 767.43 | 767.43 | -0.00 | 0 | (36) | 0.056 | 1 | R.PTGPAGLR.R |
| <input checked="" type="checkbox"/> 23 | 384.73 | 767.44 | 767.43 | 0.01 | 0 | 55 | 0.0006 | 1 | R.PTGPAGLR.R |
| <input checked="" type="checkbox"/> 27 | 401.23 | 800.44 | 800.43 | 0.01 | 0 | 35 | 0.066 | 1 | K.QLTFHR.F |
| <input checked="" type="checkbox"/> 52 | 431.78 | 861.55 | 861.57 | -0.02 | 1 | 53 | 0.00094 | 1 | K.KLFLTLK.E |
| <input checked="" type="checkbox"/> 56 | 433.73 | 865.45 | 865.45 | 0.00 | 0 | 33 | 0.078 | 1 | K.GHQGLQAR.L |
| <input checked="" type="checkbox"/> 89 | 493.75 | 985.48 | 985.53 | -0.05 | 0 | 39 | 0.02 | 1 | K.EWVLNIGR.G |
| <input checked="" type="checkbox"/> 99 | 509.73 | 1017.44 | 1017.44 | 0.01 | 0 | (40) | 0.017 | 1 | R.ENTDPASER.G |
| <input checked="" type="checkbox"/> 100 | 509.73 | 1017.45 | 1017.44 | 0.01 | 0 | 53 | 0.00094 | 1 | R.ENTDPASER.G |
| <input checked="" type="checkbox"/> 120 | 542.80 | 1083.58 | 1083.58 | 0.00 | 1 | 51 | 0.0013 | 1 | R.RPQATEAVGR.P |
| <input checked="" type="checkbox"/> 150 | 411.90 | 1232.69 | 1232.69 | -0.00 | 1 | 24 | 0.63 | 1 | R.FPFSRPELLK.E |
| <input checked="" type="checkbox"/> 164 | 677.79 | 1353.57 | 1353.65 | -0.08 | 0 | 89 | 1.6e-007 | 1 | K.VLPEAGAGEDSPGR.N |
| <input checked="" type="checkbox"/> 211 | 601.29 | 1800.84 | 1800.89 | -0.05 | 0 | 50 | 0.00096 | 1 | K.QPSDHSYALLDLDLTK.K |
| <input checked="" type="checkbox"/> 219 | 643.99 | 1928.95 | 1928.98 | -0.03 | 1 | 71 | 6.3e-006 | 1 | K.QPSDHSYALLDLDLTK.K |
| <input checked="" type="checkbox"/> 226 | 685.68 | 2054.03 | 2054.03 | -0.01 | 0 | 75 | 2.7e-006 | 1 | K.HNAVPTVFAPQDPTQQVR.E |
| <input checked="" type="checkbox"/> 227 | 685.69 | 2054.06 | 2054.03 | 0.02 | 0 | (36) | 0.022 | 1 | K.HNAVPTVFAPQDPTQQVR.E |
| <input checked="" type="checkbox"/> 240 | 736.04 | 2205.11 | 2205.07 | 0.03 | 0 | (22) | 0.5 | 1 | R.MDPTALEELQLPPNAEGHVK.Q |
| <input checked="" type="checkbox"/> 246 | 741.37 | 2221.10 | 2221.07 | 0.03 | 0 | 56 | 0.00017 | 1 | R.MDPTALEELQLPPNAEGHVK.Q + Oxidation (M) |
| <input checked="" type="checkbox"/> 247 | 741.38 | 2221.13 | 2221.07 | 0.06 | 0 | (38) | 0.011 | 1 | R.MDPTALEELQLPPNAEGHVK.Q + Oxidation (M) |
| <input checked="" type="checkbox"/> 257 | 748.06 | 2241.14 | 2241.13 | 0.02 | 1 | 70 | 7.1e-006 | 1 | R.YPNKQPSDHSYALLDLDLTK.K |
| <input checked="" type="checkbox"/> 288 | 645.54 | 2578.14 | 2578.16 | -0.02 | 1 | 30 | 0.053 | 1 | K.QHTVICSEHFRPECFSAFGHR.K |

Protéine Q8WTV1 identifiée
dans l'échantillon 2

72. [THAP3_HUMAN](#) Mass: 27042 Score: 46 Queries matched: 3
(Q8WTV1) THAP domain protein 3
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

| Query | Observed | Mr(expt) | Mr(calc) | Delta | Miss | Score | Expect | Rank | Peptide | |
|----------------------|----------|-----------|-----------|---------|------|-------|--------|------|---------|--------------------|
| 327 | 431.6906 | 861.3667 | 861.5687 | -0.2020 | 1 | 24 | | 1 | 4 | KLFLTLK |
| 504 | 493.7222 | 985.4298 | 985.5345 | -0.1046 | 0 | 29 | 0.35 | 1 | 1 | EWVLNIGR |
| 1515 | 459.2260 | 1832.8749 | 1832.9968 | -0.1219 | 0 | 43 | 0.011 | 1 | 1 | RPQATEAVGRPTGPAGLR |

« Spectral counting »

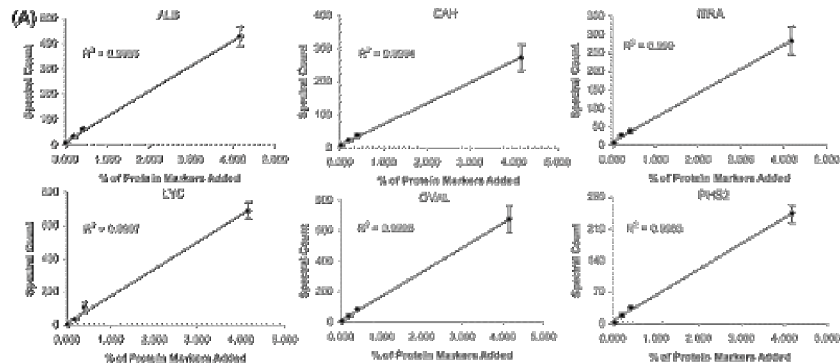
- Liu, H.; Sadygov, R. G.; Yates, J. R., 3rd. *Anal. Chem.* **2004**. A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics
- Zybailov B, Coleman M.K., Florens L, Washburn M, *Anal. Chem.* **2005**. Correlation of Relative Abundance Ratios Derived from Peptide Ion Chromatograms and Spectrum Counting for Quantitative Proteomic Analysis Using Stable Isotope Labeling
- Colinge J, Chiappe D, Lagache S, Moniatte M, Bougueleret L., *Anal Chem.* **2005**. Differential Proteomics via probabilistic peptide identification scores.

Analyse semi-quantitative par comparaison du nombre de MS/MS par protéine (« spectral counts »)

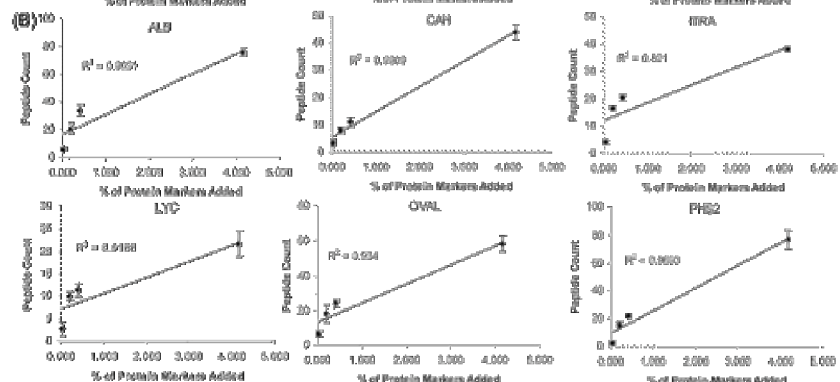
Liu H, Sadygov RG, Yates JR 3rd, Anal Chem. 2004

A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics.

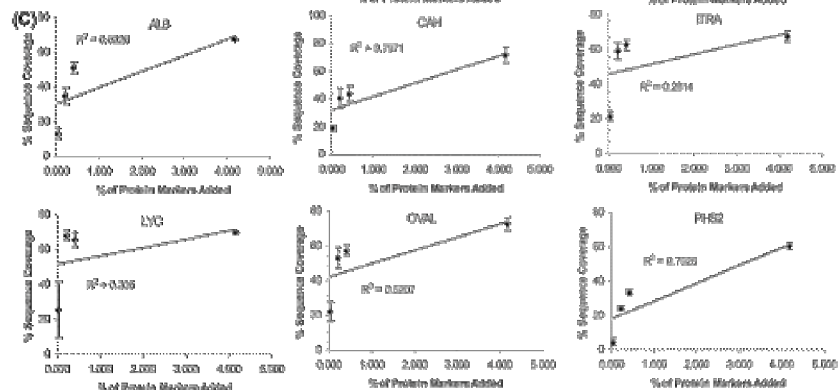
Nombre de MS/MS



Nombre de peptides



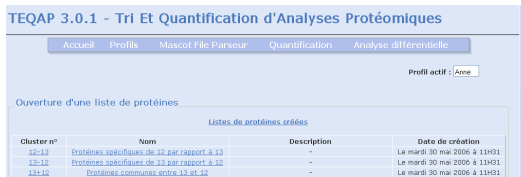
Couverture de séquence



Module d'Analyse différentielle

Liste des groupes de protéines

| Groupe n° | N° accession | Désignation | PM | PI | Description | | |
|------------|------------------------|---------------------------|-------|------------------------|---|----------|--|
| 1 | O14744 | SKB1_HUMAN | 73191 | 5.89 | Protein arginine N-methyltransferase 5 (EC 2.1.1.-) (Shk1 kinase-binding protein 1 homolog) | | |
| Expérience | Dat | Echantillon | Hit | Score | % couv. | Peptides | |
| 000013 | 002387 | gel THAP3 14-4-2006 / T11 | 5 | 188.61 | | 16 | |
| 000013 | 002377 | gel THAP3 14-4-2006 / T14 | 6 | 105.63 | | 5 | |
| 000013 | 002379 | gel THAP3 14-4-2006 / T18 | 6 | 99.79 | | 4 | |
| 000013 | 002389 | gel THAP3 14-4-2006 / T19 | 6 | 62.78 | | 7 | |
| 000012 | 002386 | gel THAP3 14-4-2006 / C11 | 4 | 74.26 | | 5 | |
| 000012 | 002376 | gel THAP3 14-4-2006 / C14 | 7 | 36.87 | | 1 | |



Protéines communes

⇒ Analyse quantitative

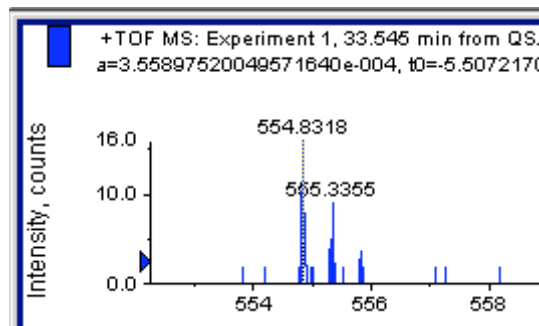
Spectral counting

Signal MS

Peptide commun

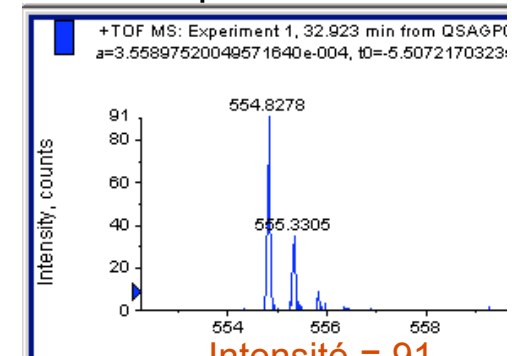
VPLVAPEDLR m/z= 554.8

Expérience 00012



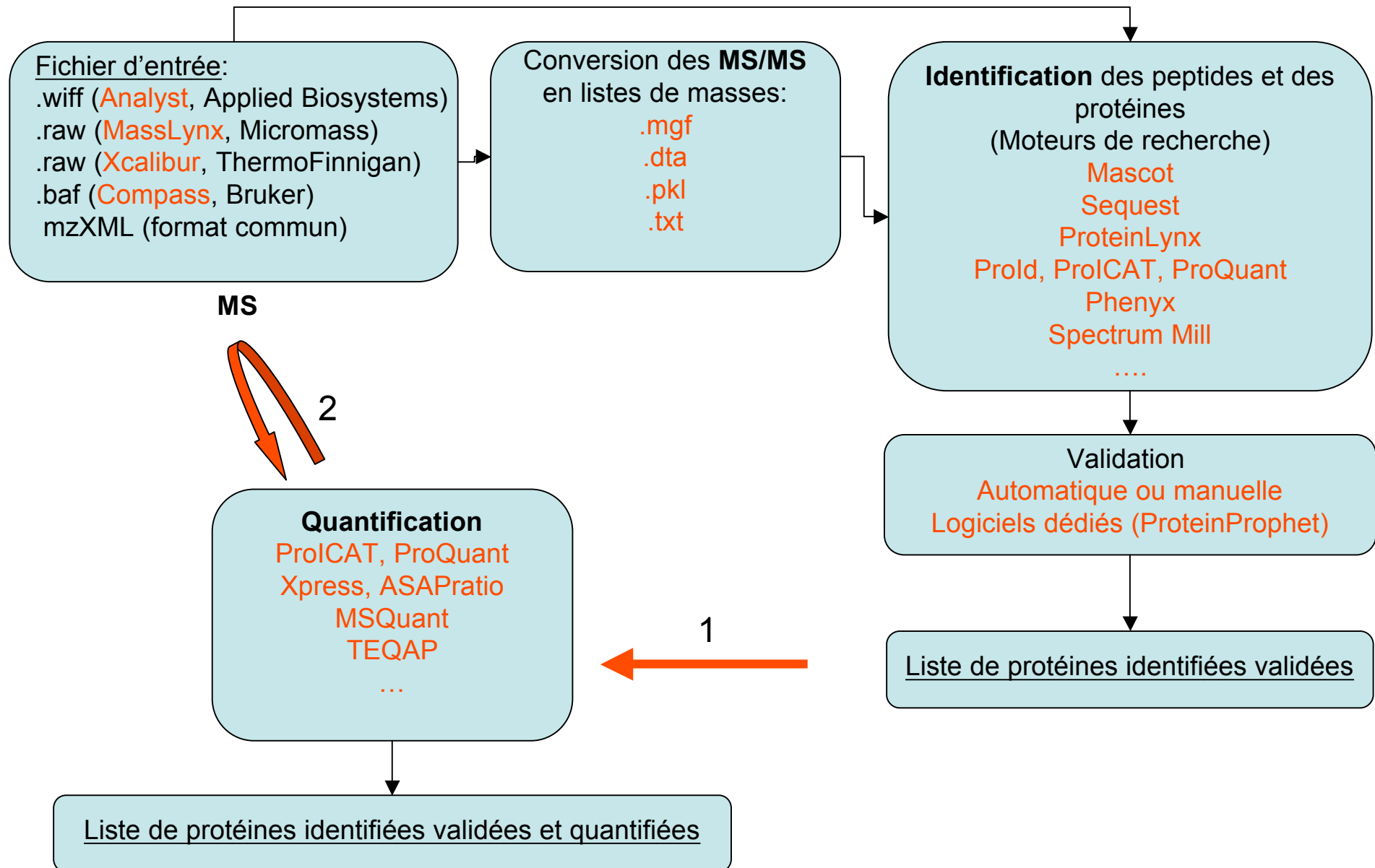
Intensité = 16

Expérience 00013



Intensité = 91

Identification et quantification par nanoLC-MS/MS



Profiling par nanoLC-MS et identification ciblée

