



Swiss Centre for Applied Human Toxicology  
Schweizerisches Zentrum für Angewandte Humantoxikologie  
Centre Suisse de Toxicologie Humaine Appliquée  
Centro Svizzero di Tossicologia Umana Applicata



## Importance de l'Orbitrap pour l'analyse protéomique

**Laurent Geiser**

14<sup>ème</sup> journées scientifiques du ccCTA

Les Diablerets, 16 septembre 2010

*MS<sup>n</sup> et masse exacte: l'outil incontournable du XXI<sup>ème</sup> siècle?*

## Structure de la présentation

### 1. Protéomique par shotgun

- ✓ Buts de l'analyse protéomique
- ✓ Intérêts et principes de la protéomique par shotgun

### 2. Masse exacte et résolution en protéomique

- ✓ Spectres MS issus de l'analyse d'un sérum
- ✓ Interprétation des données

### 3. L'Orbitrap comme analyseur MS

- ✓ Intérêts et principes de l'Orbitrap
- ✓ Orbitrap: le meilleur analyseur MS actuellement?



[www.scaht.org](http://www.scaht.org)

# Structure de la présentation

## 1. Protéomique par shotgun

- ✓ Buts de l'analyse protéomique
- ✓ Intérêts et principes de la protéomique par shotgun

## 2. Masse exacte et résolution en protéomique

- ✓ Spectres MS issus de l'analyse d'un sérum
- ✓ Interprétation des données

## 3. L'Orbitrap comme analyseur MS

- ✓ Intérêts et principes de l'Orbitrap
- ✓ Orbitrap: le meilleur analyseur MS actuellement?



# Découverte de biomarqueurs potentiels

Population référence



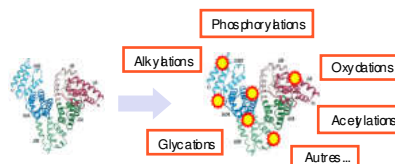
Comparaison des populations

Population soumise à un toxique



Effets du toxique au niveau protéomique

- ✓ Apparition ou disparition de protéines
- ✓ Apparition ou disparition de modifications post-traductionnelles (PTM) sur les protéines
- ✓ Augmentation ou diminution de protéines

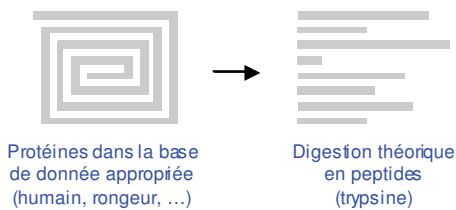


## Analyse protéomique par shotgun (*bottom up*)

### MS & MS/MS expérimentaux



### MS & MS/MS théorique (*in silico*)



Identification automatique des peptides & protéines

## Principaux intérêts & défis du shotgun

### Intérêts: vitesse & universalité

- ✓ 1 analyse => identification de centaines de protéines
- ✓ Les peptides sont plus adaptés que les protéines pour la LC-ESI-MS/MS (ionisation par ESI & fragmentation après la MS<sup>1</sup>)

### Défis: complexité des matrices réelles

- ✓ Quantité de protéines, et donc de spectres MS/MS expérimentaux & *in silico*
- ✓ Domaine de concentrations des protéines ( $\sim 10^{10}$  -  $10^{14}$ )

## Structure de la présentation

### 1. Protéomique par shotgun

- ✓ Buts de l'analyse protéomique
- ✓ Intérêts et principes de la protéomique par shotgun

### 2. Masse exacte et résolution en protéomique

- ✓ Spectres MS issus de l'analyse d'un sérum
- ✓ Interprétation des données

### 3. L'Orbitrap comme analyseur MS

- ✓ Intérêts et principes de l'Orbitrap
- ✓ Orbitrap: le meilleur analyseur MS actuellement?



www.sca.ht.org



## Cas modèle: sérum



✓ **Sérum**: liquide sanguin débarrassé de ses cellules et protéines de coagulation; surnageant obtenu après coagulation et centrifugation du sang dans un tube.

✓ **Composition du sérum**: 90% d'eau, **protéines**, glucose, ions minéraux, ...

✓ **Protéines dans le sérum**: ~ 60 - 80 g/L de protéines totales, dont ~ 60% d'albumine

✓ **Echantillon pour la protéomique**: dilution à ~ 1 g/L de protéines totales, utilisation de 10 µL, soit ~ 10 µg.

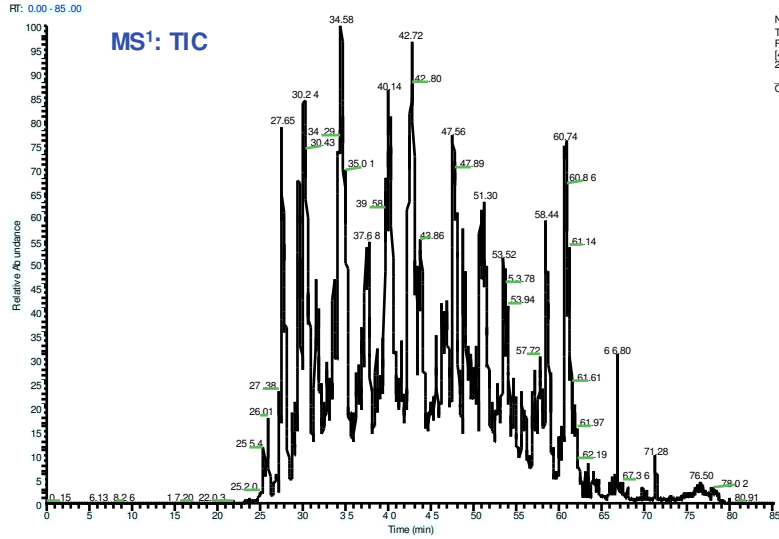
✓ **Digestion sur ~ 10 µg**; injection en LC-ESI-MS/MS: ~ 0.1 – 1 µg



www.sca.ht.org



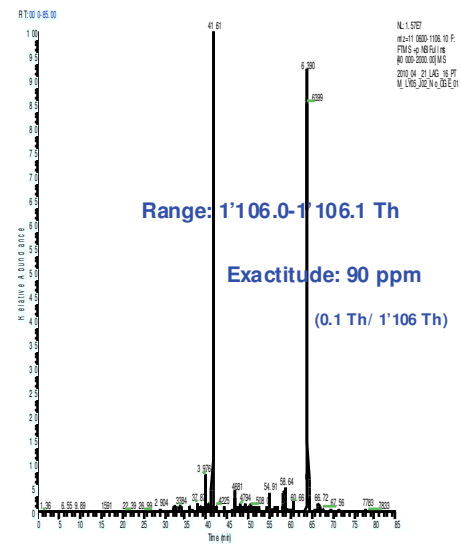
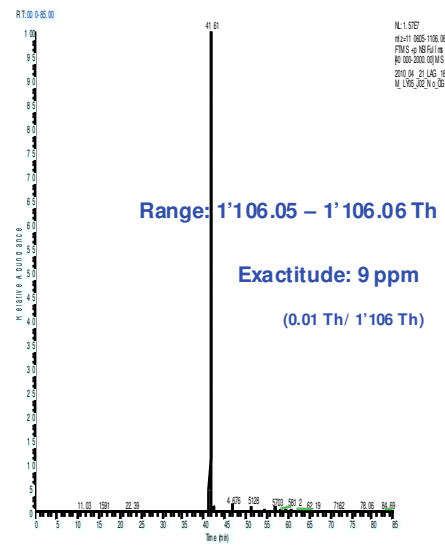
# 1. LC-ESI-MS: Total Ion Current



NL: 5.26E9  
 TIC F: FTMS+p NS1  
 Full ms  
 1400.0-2000.0 01 MS  
 2010\_04\_21\_LAG\_16  
 P:TM\_LY05\_J02\_No\_  
 OGE\_01



# 2. Apport de l'exactitude: sélectivité



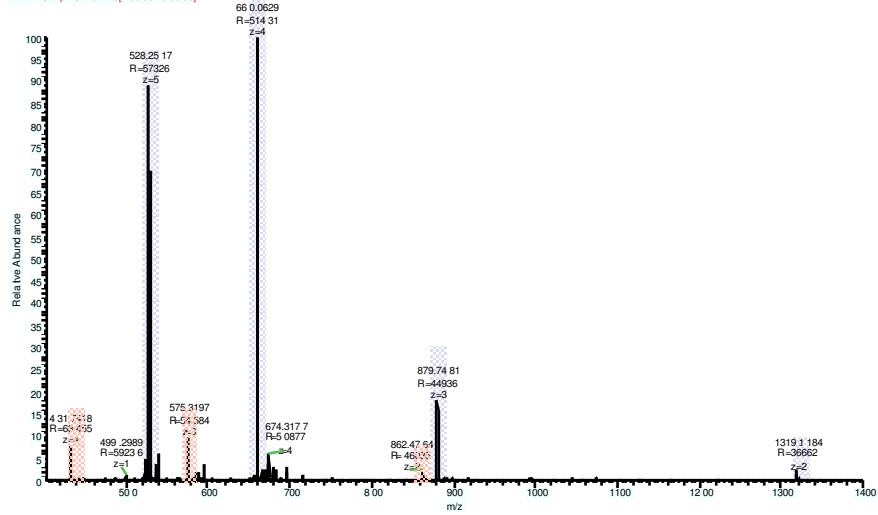
NL: 1.57E7  
 int=11 0005-1106.06 F  
 FTMS-p NS1 Full ms  
 1400.0-2000.0 01 MS  
 2010\_04\_21\_LAG\_16 PT  
 M: LY05\_J02\_No\_01 OGE\_01

NL: 1.57E7  
 int=11 0005-1106.10 F  
 FTMS-p NS1 Full ms  
 1400.0-2000.0 01 MS  
 2010\_04\_21\_LAG\_16 PT  
 M: LY05\_J02\_No\_01 OGE\_01



### 3. Apport de la résolution

2010\_04\_21\_LAG\_16\_PTM\_LY05\_J02\_Nb\_OCE\_01 # 2077:2.083 RT: 27.6 2:27.65 AV: 2 NL: 3.59 EB  
F: F TMS + p NS1 Fullm s(4 00.00-20 00.00)

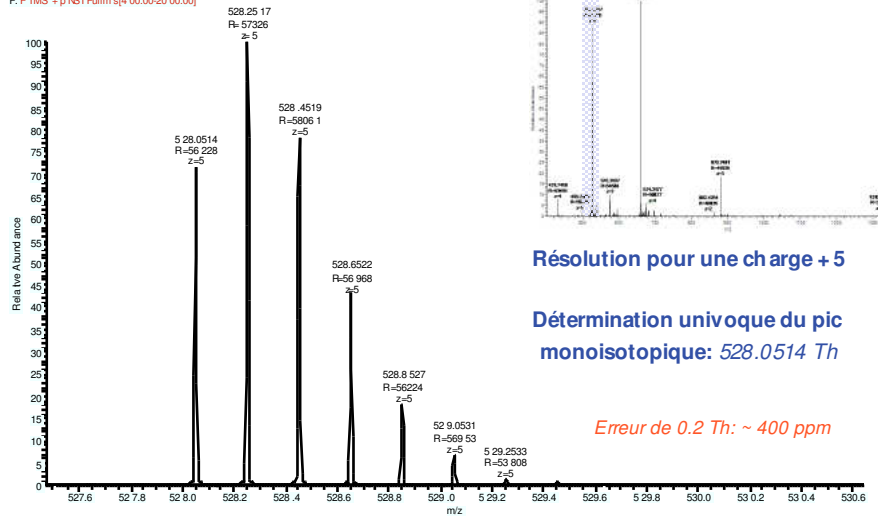


www.sca ht.org



### 3. Apport de la résolution

2010\_04\_21\_LAG\_16\_PTM\_LY05\_J02\_Nb\_OCE\_01 # 2077:2.083 RT: 27.6 2:27.65 AV: 2 NL: 3.20 EB  
F: F TMS + p NS1 Fullm s(4 00.00-20 00.00)



Résolution pour une charge + 5

Détermination univoque du pic  
monoisotopique: 528.0514 Th

Ereur de 0.2 Th: ~ 400 ppm



www.sca ht.org



## 4. Apport de l'exactitude et de la résolution

$$MM_{\text{peptide}} = \text{Charge} \cdot (\text{Pic}_{\text{monoisotopique}} - \text{Masse proton})$$

Masse proton: 1.007

| Charge | Pic monoisotopique | Masse moléculaire du peptide |
|--------|--------------------|------------------------------|
| 5+     | 528.051 Th         | 2635.220 Da                  |
| 4+     | 659.812 Th         | 2635.222 Da                  |
| 3+     | 879.414 Th         | 2635.221 Da                  |
| 2+     | 1318.617 Th        | 2635.220 Da                  |

Exactitude sur la masse moléculaire de 2635.221: < 1 ppm (0.002 Th/ 2'000 Th)



www.sca.ht.org

## Identification automatique des protéines

Protein Explorer (p.p. Search Entry (SCA HT) 1 (2012) (1000000))

Protein Filter  
 MS/MS (m/z):  Min Unique Peptide Count:  Filter

48 protéines, 3568 peptides, 418 unique peptides

Altérer

| Accession     | Accession | SD           | Description   | Score   | Coverage | Align | Align |
|---------------|-----------|--------------|---|---------|----------|-------|-------|
| P02781_CHAD_3 | 1         | unprot_gprot | Serum albumin (CHAD) (E)                                | 1728.12 | 63.89    | 838   | 82    |
| P02781_CHAD_3 | 2         | unprot_gprot | Serum albumin (CHAD) (E)                                | 1432.00 | 57.83    | 86    | 86    |
| P02781_CHAD_3 | 3         | unprot_gprot | Complement C3c alpha chain (Fragment) (CHAD) (E)        | 1374.49 | 44.28    | 111   | 54    |
| P02781_CHAD_3 | 4         | unprot_gprot | Alpha-2-macroglobulin alpha-1 subunit (CHAD) (E)        | 1254.03 | 72.38    | 128   | 46    |
| P02781_CHAD_3 | 5         | unprot_gprot | Serum transthyretin (CHAD) (E)                          | 1003.04 | 37.28    | 86    | 24    |
| P02781_CHAD_3 | 6         | unprot_gprot | Short isoform of AAT (SHAD) (CHAD) (E)                  | 745.1   | 74.79    | 465   | 24    |
| P02781_CHAD_3 | 7         | unprot_gprot | Apolipoprotein A-II (CHAD) (E)                          | 528.10  | 35.40    | 41    | 20    |
| P02781_CHAD_3 | 8         | unprot_gprot | Complement C4 gamma chain                               | 471     | 21.73    | 33    | 28    |
| P02781_CHAD_3 | 9         | unprot_gprot | Haptoglobin beta chain (CHAD) (E)                       | 460.08  | 67.27    | 65    | 18    |
| P02781_CHAD_3 | 10        | unprot_gprot | Ig gamma-1 heavy chain C region                         | 429.96  | 60.83    | 82    | 161   |
| P02781_CHAD_3 | 11        | unprot_gprot | Ig kappa chain C region                                 | 411.28  | 46.82    | 54    | 14    |
| P02781_CHAD_3 | 12        | unprot_gprot | Hemostasin (CHAD) (E)                                   | 402.04  | 56.25    | 38    | 18    |
| P02781_CHAD_3 | 13        | unprot_gprot | Alpha-2-macroglobulin alpha-2 subunit (CHAD) (E)        | 392.12  | 45.75    | 36    | 15    |
| P02781_CHAD_3 | 14        | unprot_gprot | Ig mu heavy chain domain protein                        | 371.10  | 45.85    | 86    | 12    |
| P02781_CHAD_3 | 15        | unprot_gprot | Ig gamma-2 chain C region                               | 354.49  | 42.18    | 34    | 12    |
| P02781_CHAD_3 | 16        | unprot_gprot | Ig gamma-2 chain C region                               | 323.87  | 59.86    | 36    | 10    |
| P02781_CHAD_3 | 17        | unprot_gprot | Vimentin binding protein (SHAD) (CHAD) (E)              | 319.63  | 77.84    | 38    | 12    |
| P02781_CHAD_3 | 18        | unprot_gprot | Basic 2-glycoprotein 2 (SHAD) (E)                       | 291.17  | 47.83    | 14    | 18    |
| P02781_CHAD_3 | 19        | unprot_gprot | Alpha-2B-glycoprotein (CHAD) (E)                        | 244.79  | 43.88    | 17    | 12    |
| P02781_CHAD_3 | 20        | unprot_gprot | Ig alpha-1 chain C region                               | 232.02  | 47.20    | 21    | 8     |
| P02781_CHAD_3 | 21        | unprot_gprot | Apolipoprotein A-II alpha 2 (CHAD) (E)                  | 227.1   | 4.58     | 11    | 11    |
| P02781_CHAD_3 | 22        | unprot_gprot | Haptoglobin-alkalobacterin                              | 210.42  | 25.29    | 38    | 8     |
| P02781_CHAD_3 | 23        | unprot_gprot | Ig kappa chain C region                                 | 209.11  | 62.88    | 42    | 7     |
| P02781_CHAD_3 | 24        | unprot_gprot | Complement factor B (Fragment) (CHAD) (E)               | 196.4   | 19.38    | 11    | 8     |
| P02781_CHAD_3 | 25        | unprot_gprot | Ig gamma-4 chain C region                               | 201.17  | 16.8     | 16    | 7     |
| P02781_CHAD_3 | 26        | unprot_gprot | Complement factor H (CHAD) (E)                          | 184.86  | 12.79    | 8     | 8     |
| P02781_CHAD_3 | 27        | unprot_gprot | Stromelysin 1 (CHAD) (E)                                | 182.58  | 22.44    | 11    | 7     |
| P02781_CHAD_3 | 28        | unprot_gprot | 25 kDa inter-alpha-inhibitor heavy chain (I) (SHAD) (E) | 178.95  | 13.82    | 8     | 8     |
| P02781_CHAD_3 | 29        | unprot_gprot | Alpha-1 acid glycoprotein 1 (SHAD) (E)                  | 175.1   | 45.28    | 21    | 8     |
| P02781_CHAD_3 | 30        | unprot_gprot | Apolipoprotein A-II (alpha-2) (CHAD) (E)                | 173.48  | 39.44    | 30    | 9     |
| P02781_CHAD_3 | 31        | unprot_gprot | Inter-alpha-1(III)-inhibitor heavy chain (I) (SHAD) (E) | 167.41  | 17.38    | 7     | 7     |
| P02781_CHAD_3 | 32        | unprot_gprot | Ig alpha-2 chain C region                               | 154.05  | 49.24    | 18    | 7     |
| P02781_CHAD_3 | 33        | unprot_gprot | Angiotensin II (I) (CHAD) (E)                           | 151.15  | 19.41    | 7     | 5     |
| P02781_CHAD_3 | 34        | unprot_gprot | Apolipoprotein A-II (I) (CHAD) (E)                      | 148.59  | 78.82    | 34    | 8     |
| P02781_CHAD_3 | 35        | unprot_gprot | Complement component C3b (SHAD) (E)                     | 147.1   | 12.45    | 8     | 4     |

MS & MS/MS théorique

Spectres MS & MS/MS in silico des peptides

www.sca.ht.org

## Identification de PTMs avec la masse exacte?



Identification à partir de 20 acides aminés de masses connues

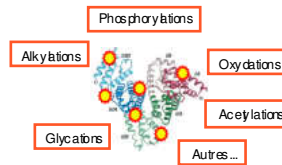
- ✓ EasyProt (Phenyx)
- ✓ Mascot



Identification: ~ 20 – 30%  
des spectres expérimentaux



PTMs: modifications de certains acides aminés → décalage en masses



Masses exactes + outils bioinformatiques adaptés



Identification des PTMs?



www.sca.ht.org

## Structure de la présentation

### 1. Protéomique par shotgun

- ✓ Buts de l'analyse protéomique
- ✓ Intérêts et principes de la protéomique par shotgun

### 2. Masse exacte et résolution en protéomique

- ✓ Spectres MS issus de l'analyse d'un sérum
- ✓ Interprétation des données

### 3. L'Orbitrap comme analyseur MS

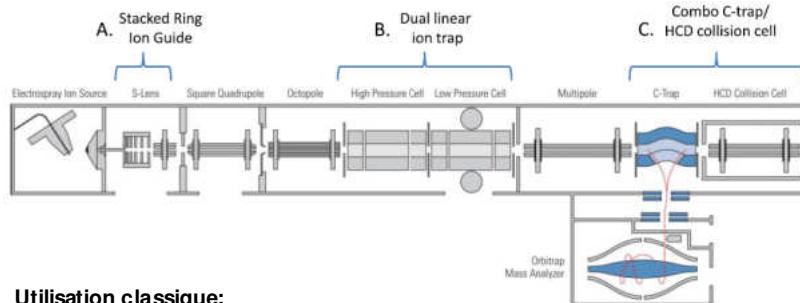
- ✓ Intérêts et principes de l'Orbitrap
- ✓ Orbitrap: le meilleur analyseur MS actuellement?



www.sca.ht.org



## LTQ-Orbitrap de Thermo Fisher Scientific



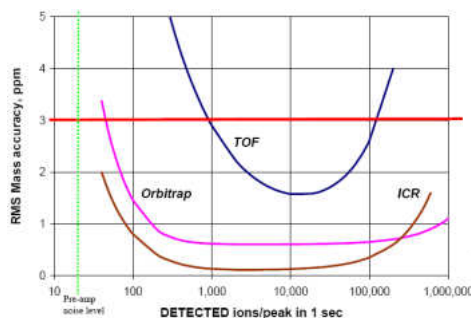
### Utilisation classique:

- ✓ MS<sup>1</sup> dans l'Orbitrap: excellentes exactitude (< 5ppm) et résolution (~ 50'000) sur la masse des ions parents (= sur le peptide).
- ✓ Fragmentation pour la MS<sup>2</sup> par «data dependent acquisition» des ions parents intéressants: charge, intensité, liste d'exclusion dynamique (peptides fragmentés préalablement), ...
- ✓ MS<sup>2</sup> dans le LTQ (acquisition rapide) ou dans l'Orbitrap (exactitude).



www.sca.ht.org

## LTQ-Orbitrap, TOF ou FT-ICR ?



✓ Orbitrap: exactitude sur > 10<sup>5</sup>

✓ FT-ICR: exactitude sur ~ 10<sup>5</sup>

✓ TOF: exactitude sur ~ 10<sup>2</sup>

Thermo Fisher Scientific

✓ LTQ-Orbitrap: exactitude sur les masses dans un domaine de linéarité inégalé par d'autres analyseurs (sauf FT-ICR).

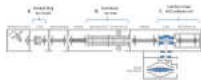
✓ LTQ-Orbitrap: instrumentation et maintenance similaires à des QqQ, TOF ou Ion Trap; sans comparaison avec les contraintes pour un FT-ICR.



www.sca.ht.org

# LTQ-Orbitrap pour toutes les analyses MS/MS ?

## LTQ-Orbitrap



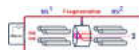
- 😊 Echantillons complexes avec une gamme dynamique étendue
- 😊 Exactitude & résolution sur les masses
- ☹ Acquisition non continue: inadapté aux analyses ultra-rapides

## Temps de vol (TOF)



- 😊 Flexibilité & acquisition en continu
- ☹ Peu adapté à de larges gammes dynamiques

## Triple quadrupole (QqQ)



- 😊 Validation quantitative: exactitude & précision en SRM
- ☹ Sensibilité, informations sur les masses en scan



www.sca.ht.org

# Remerciements



Fabienne Jeanneret

Denis Hochstrasser

Paola Antinori

Marc Fathi

Florent Gluck



www.sca.ht.org