

**Inserm**



**Institut national de la santé et  
de la recherche médicale**



**Site Pitié-Salpêtrière**



# **8es JN1 Dijon, Juin 2007**

**Protéomique clinique et marqueurs diagnostiques  
des maladies infectieuses**

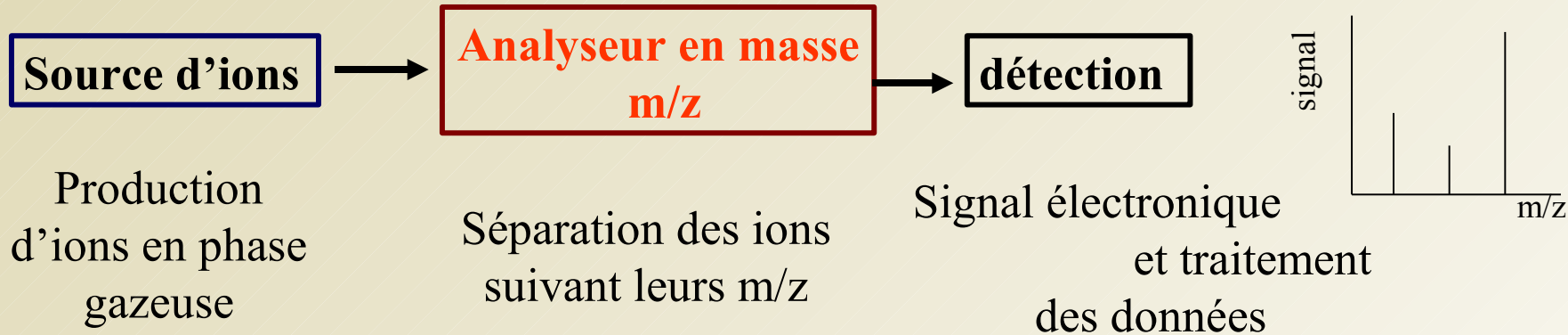
**Dominique Mazier**

**Assistance  
Publique**

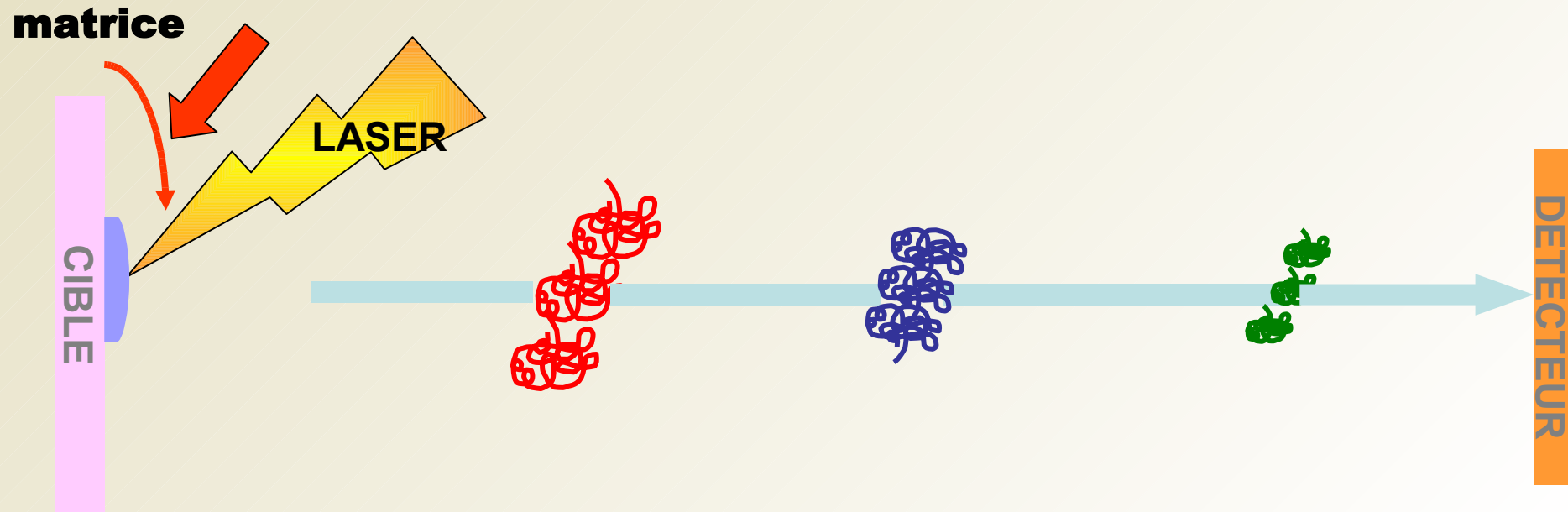


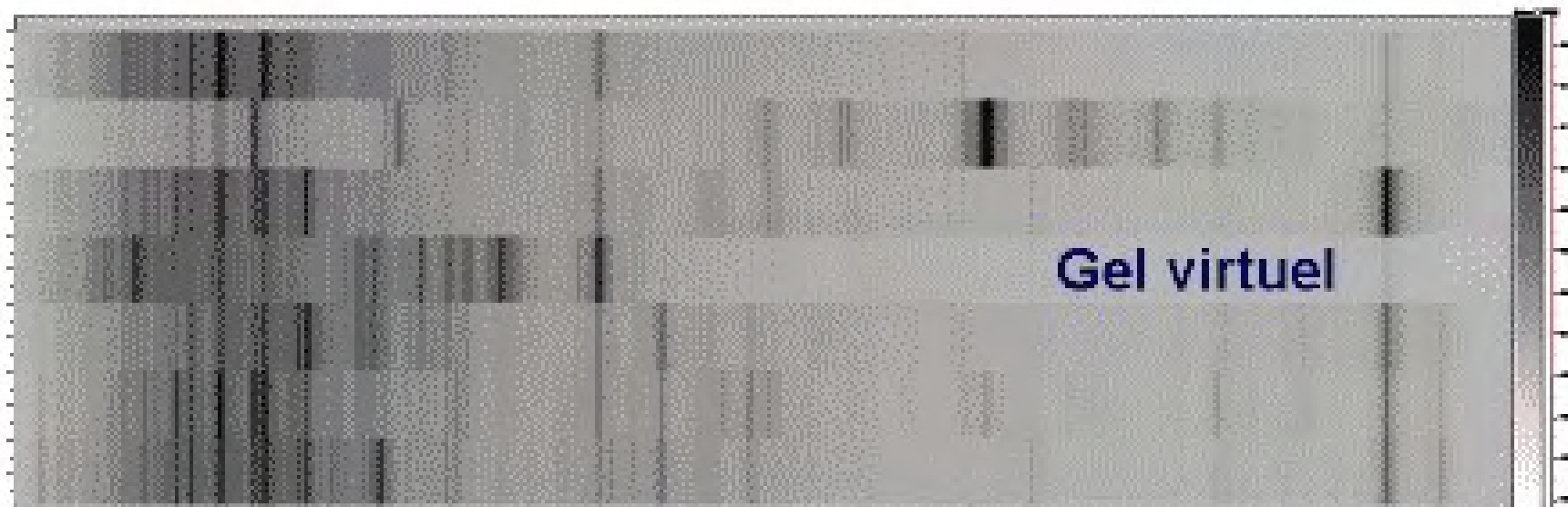
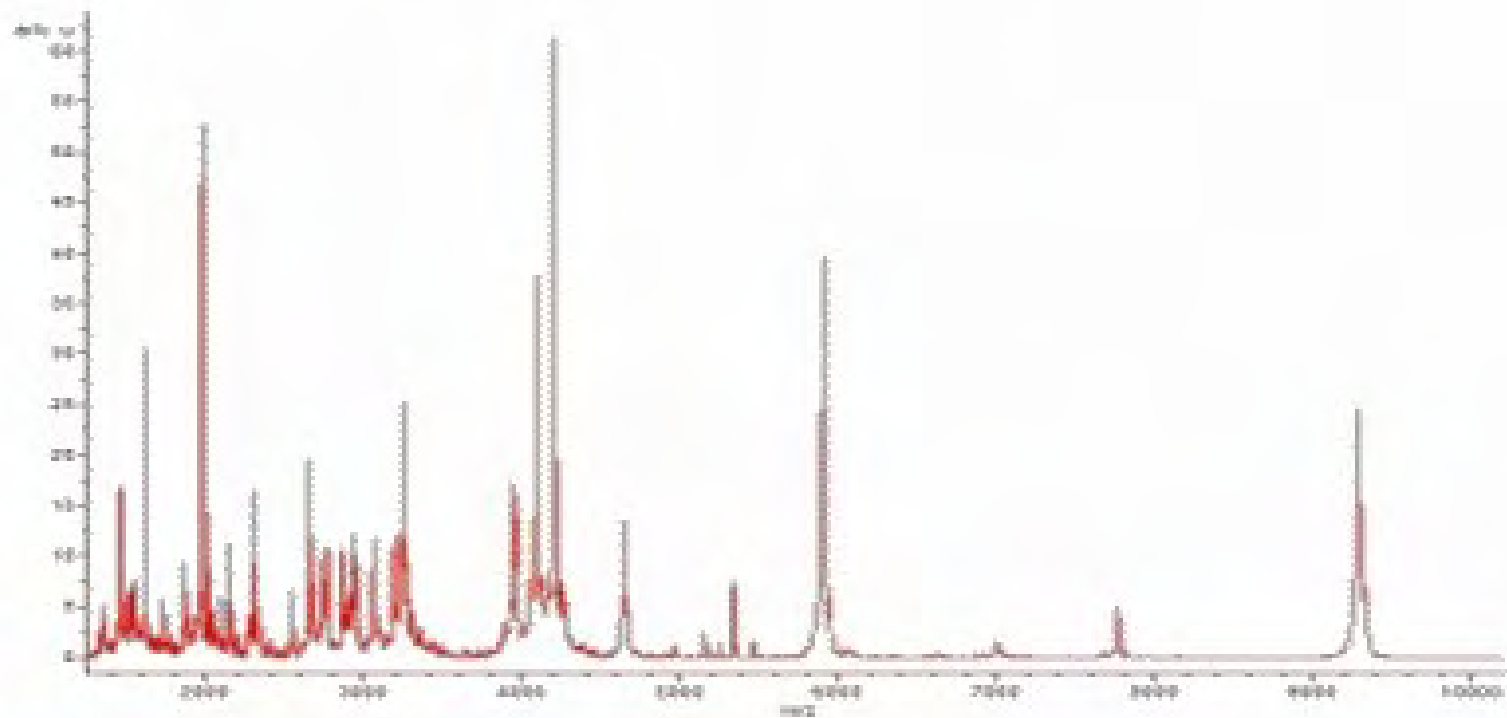
**Hôpitaux  
de Paris**

# Spectrométrie de masse



## ■ MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight





4000

5000

6000

7000

9000

# Protéomique clinique

## 1. Recherche et identification de biomarqueurs dans les fluides biologiques

### **Biomarqueur:**

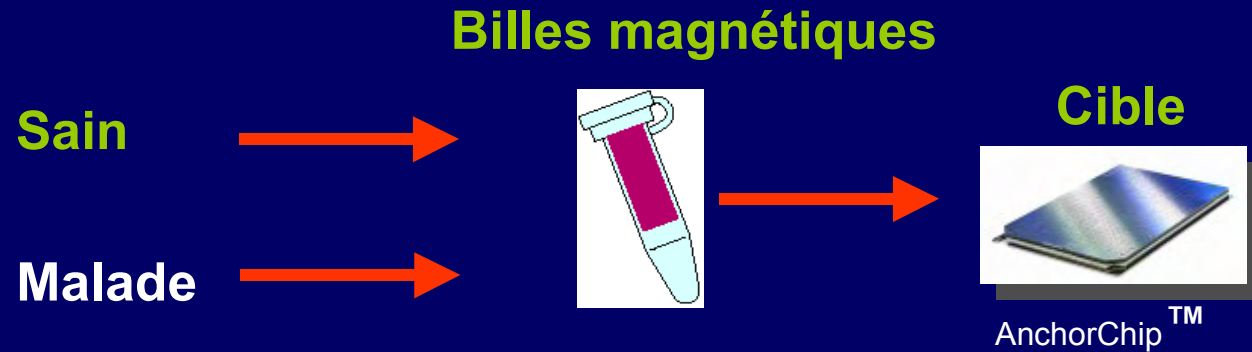
paramètre phénotypique mesurable permettant de différencier « état malade » et « état sain » d'un individu (*Clin. Pharmacol. Ther.* 2001).

### **Protéomique clinique:**

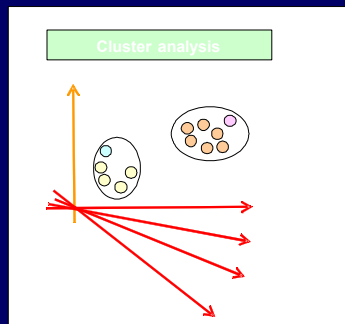
étude de profils protéiques spécifiques d'une pathologie, de l'état d'avancement de celle-ci, de sa sévérité ou bien de l'efficacité d'un traitement.

## 2. Identification directe de micro-organismes

# Protéomique clinique : ClinProt<sup>TM</sup> System

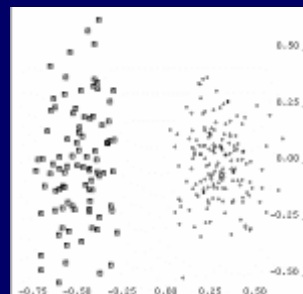


## Comparaison et classification



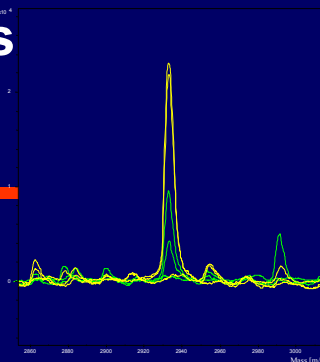
ClinProTools

## Analyse des données



ClinProTools

## Profils protéiques



auto flex

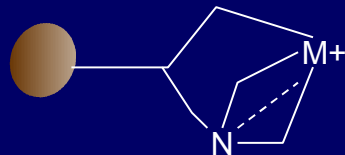
**MALDI  
TOF**

# Protéomique clinique

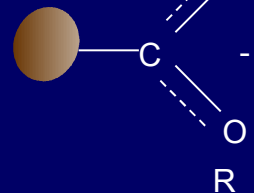
## Surfaces fonctionnalisées



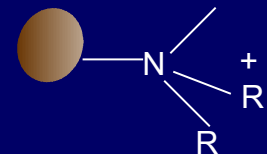
**Phase Reverse HIC3 8 18**  
**Interactions hydrophobes**



**Affinité Ion Métal IMAC**  
**Affinité de la protéine pour l'ion métallique chélaté**



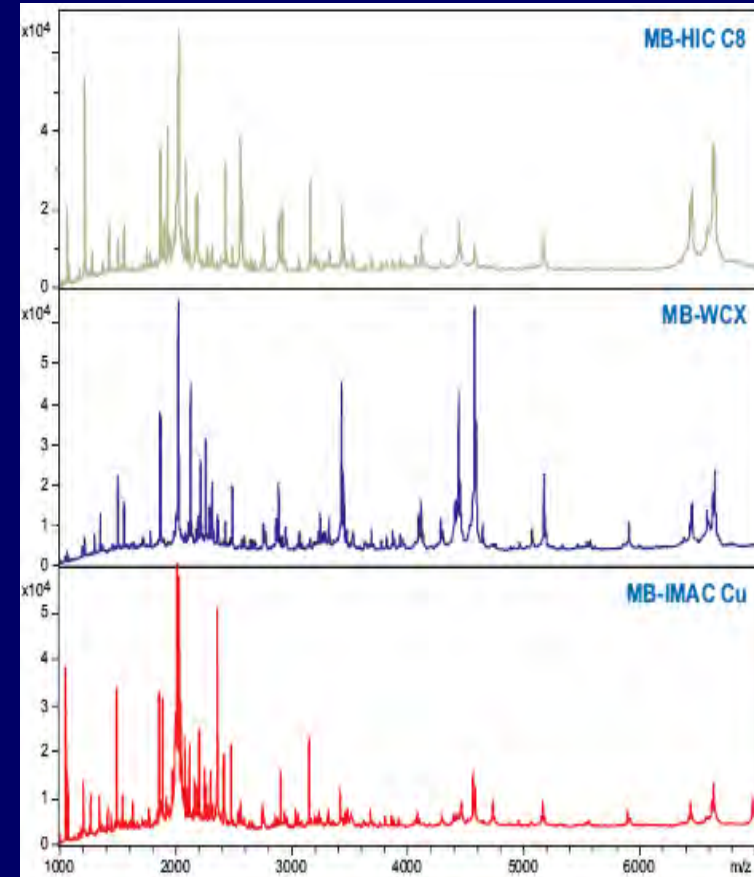
**Echange de Cations WCX**  
**Interactions électrostatiques (résidus +)**



**Echange d'Anions SAX**  
**Interactions électrostatiques (résidus -)**



**Protéine G couplage anticorps**



# Objectifs

Rechercher un profil protéique spécifique d'une infection parasitaire

## Biomarqueurs du parasite :

protéines parasitaires, protéines sécrétées

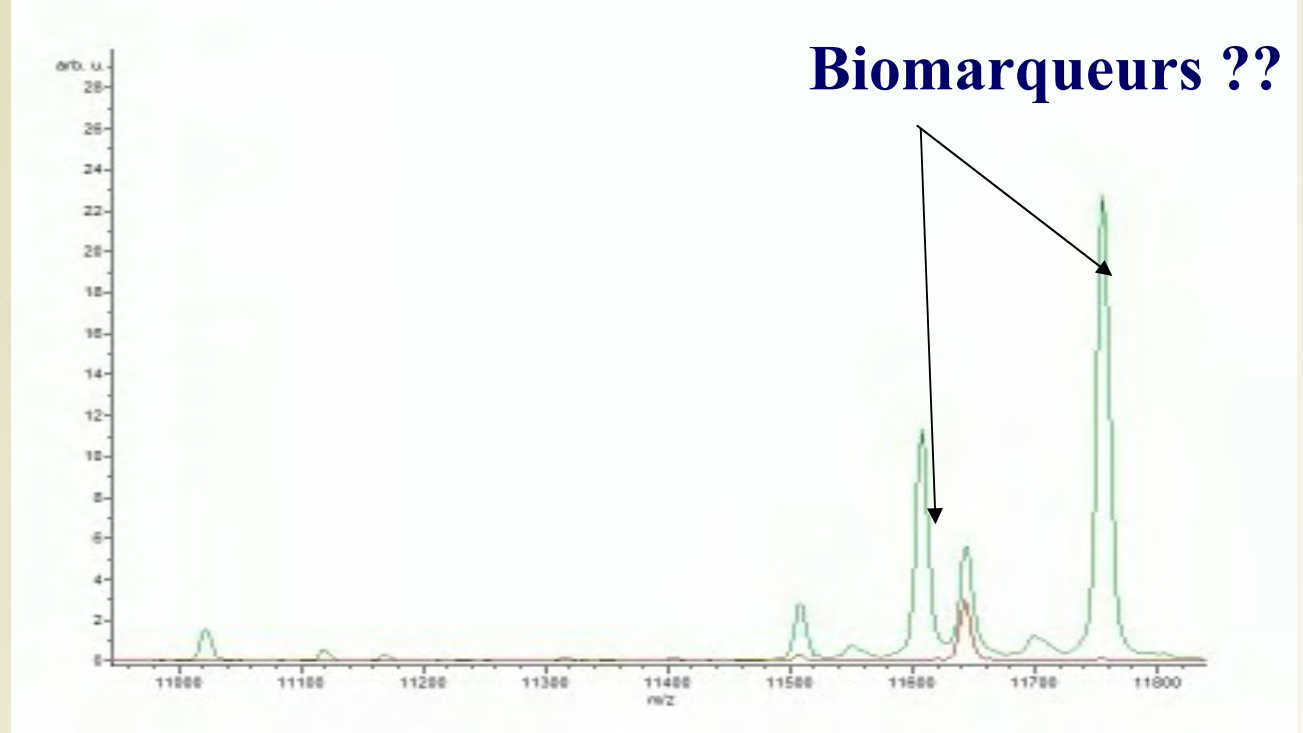
## Biomarqueurs de l'hôte :

modifications spécifiques de l'expression de protéines de l'hôte

# Spectres moyens

Contrôles

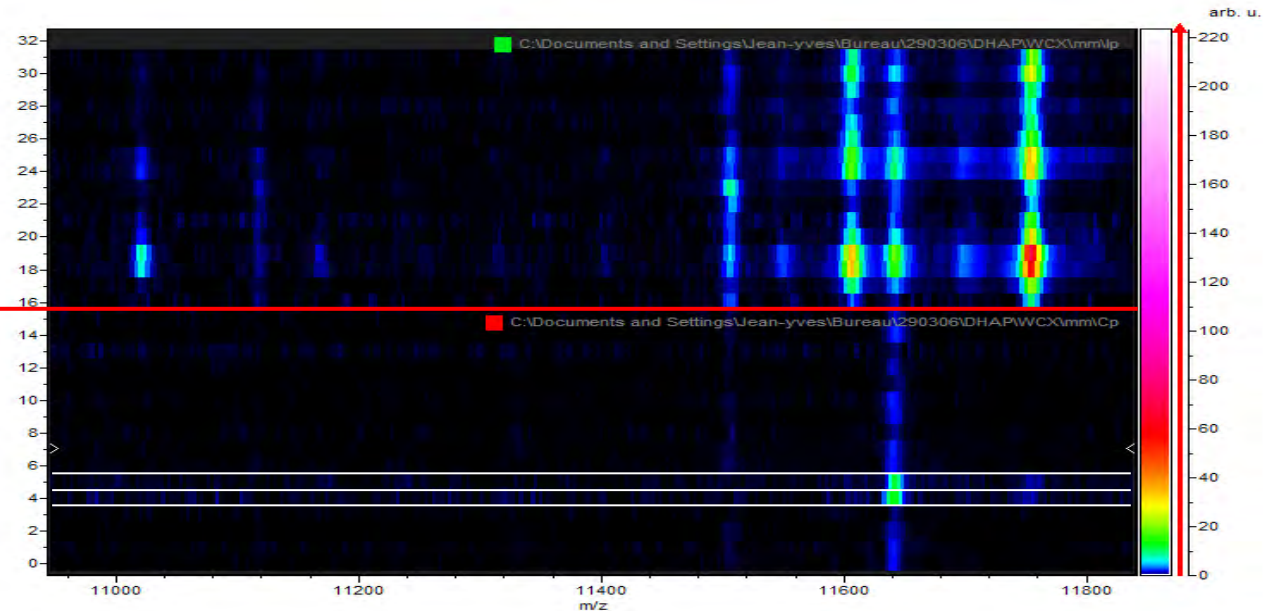
Infectés

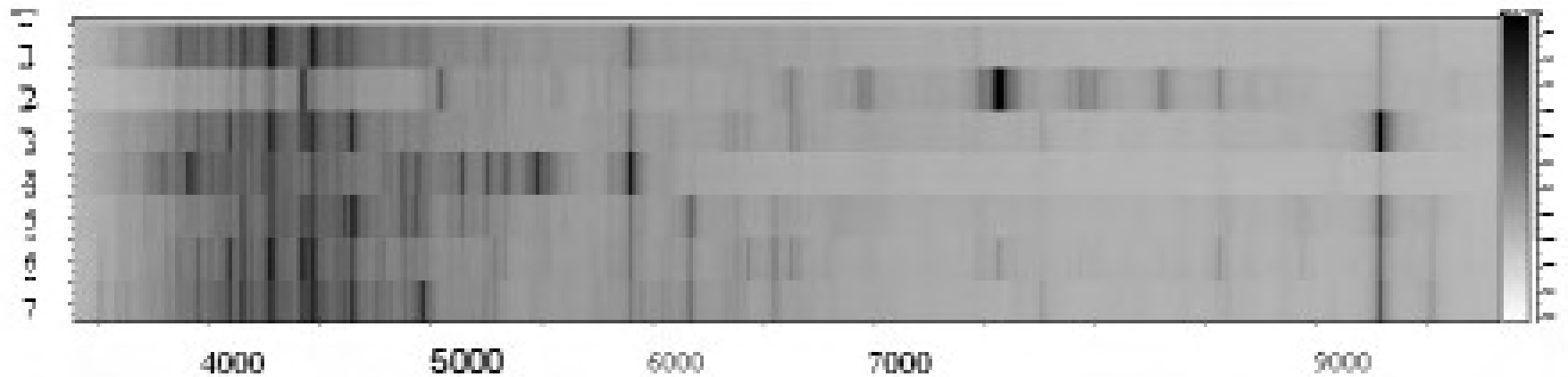


# Gel virtuel

Infectées

Contrôles



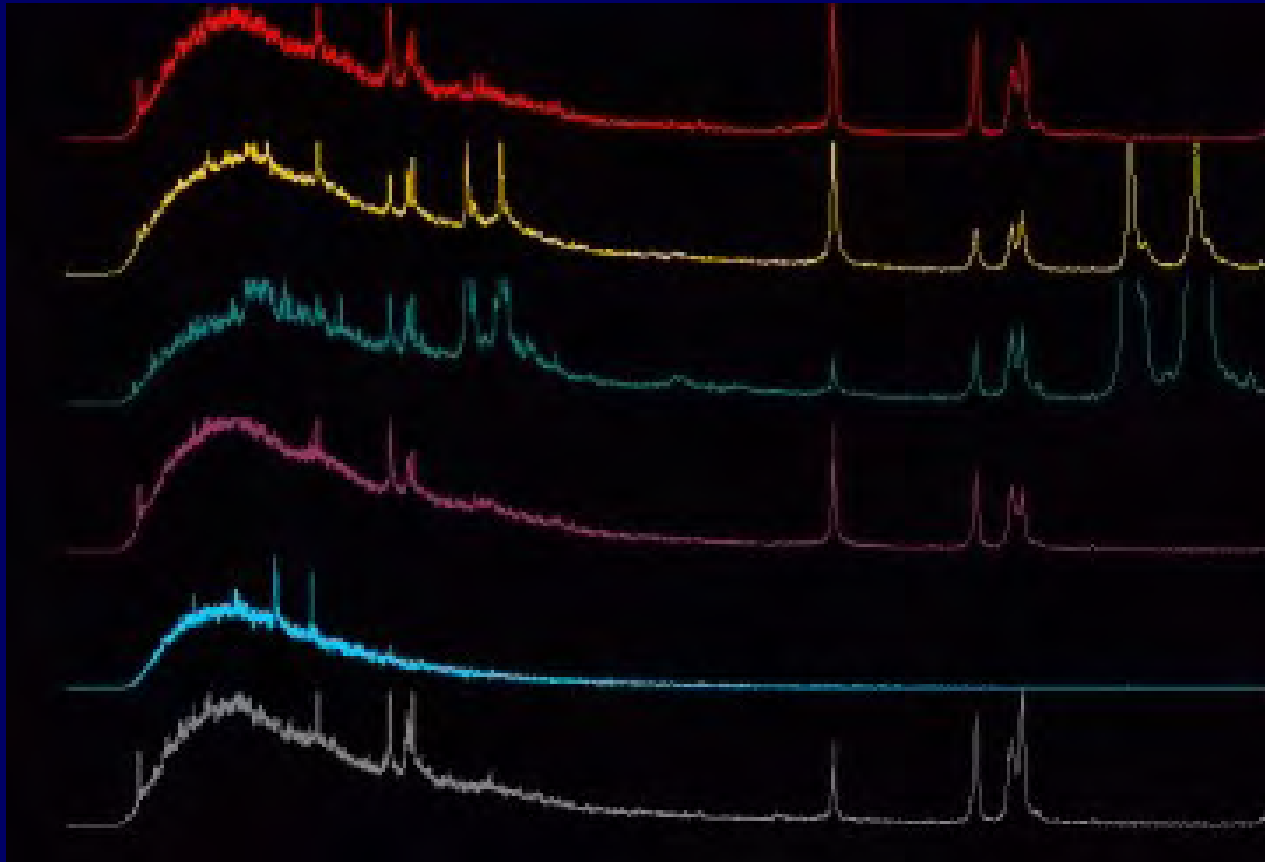


**Protocole correct**

# Recherche de biomarqueurs signant une toxoplasmose oculaire



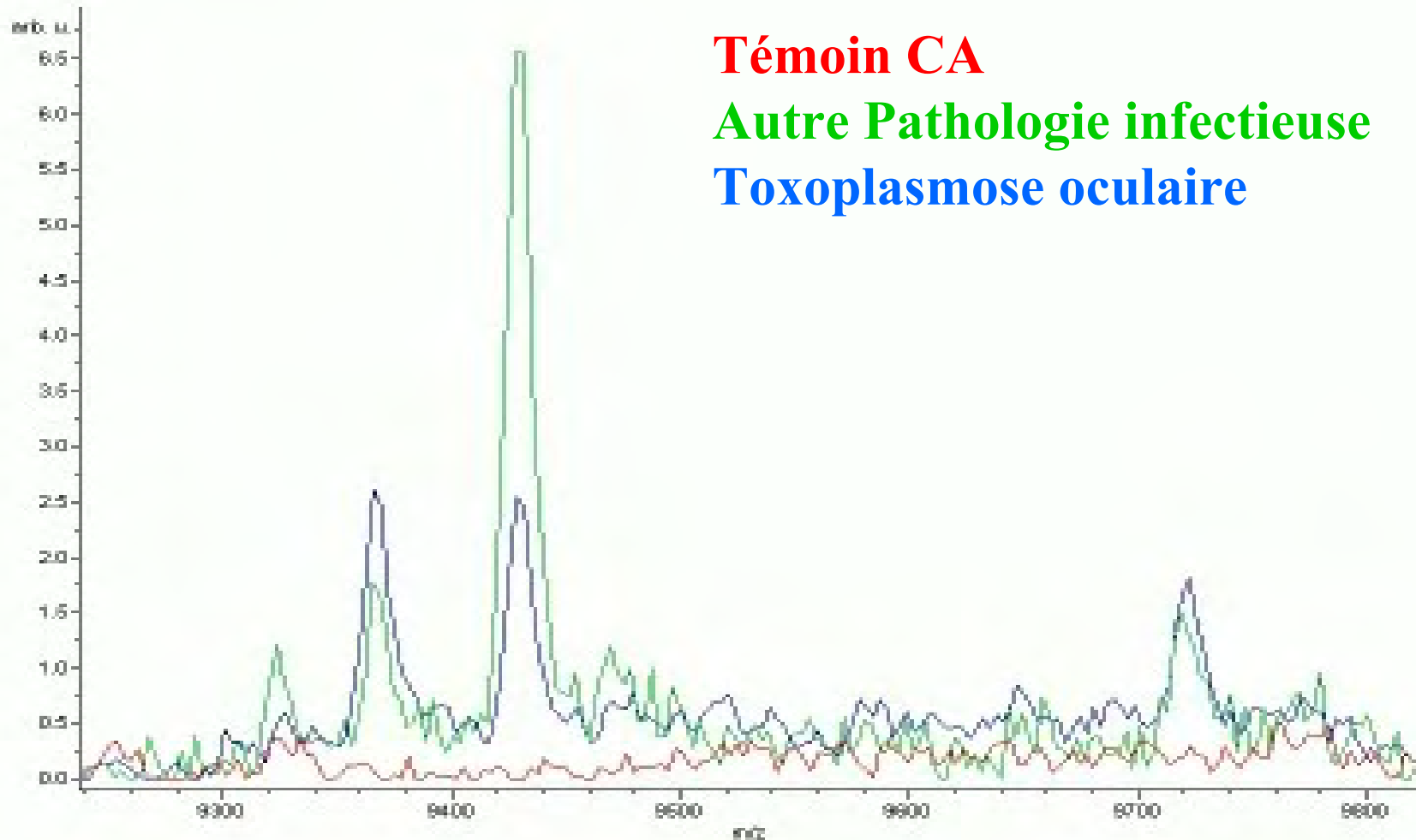
# Banque d'humeur aqueuse (cataracte)



Traitement des échantillons à partir du bloc jusqu'à la congélation (4°C) permet une exploitation des profils protéiques

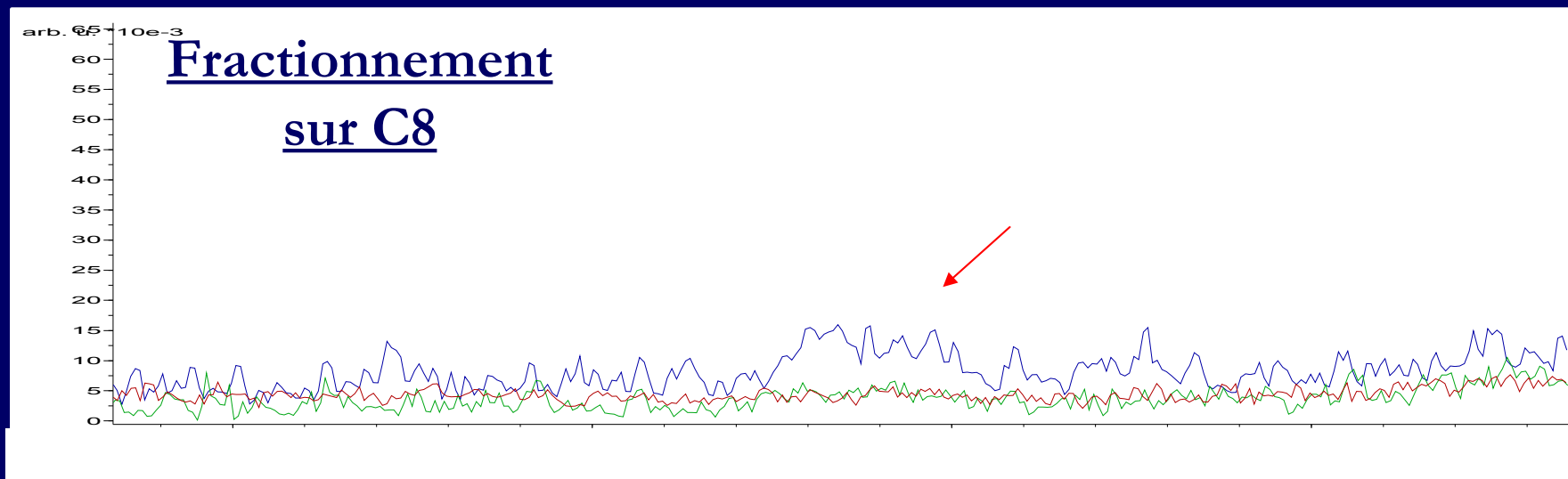
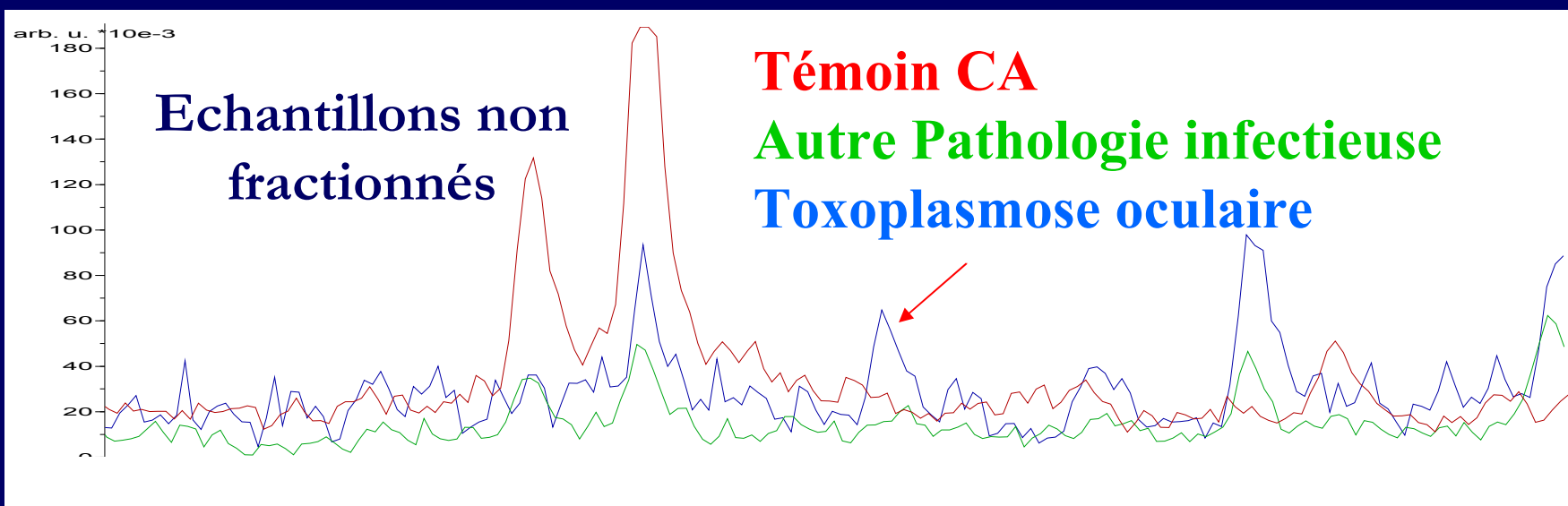
→ Reproductibilité de la banque « Pitié » sur le robot : fractionnement HIC 8

# Résultats : Analyse de la banque au MALDI-TOF



**Protéines inflammatoires**

# Résultats : analyse de la banque au MALDI-TOF



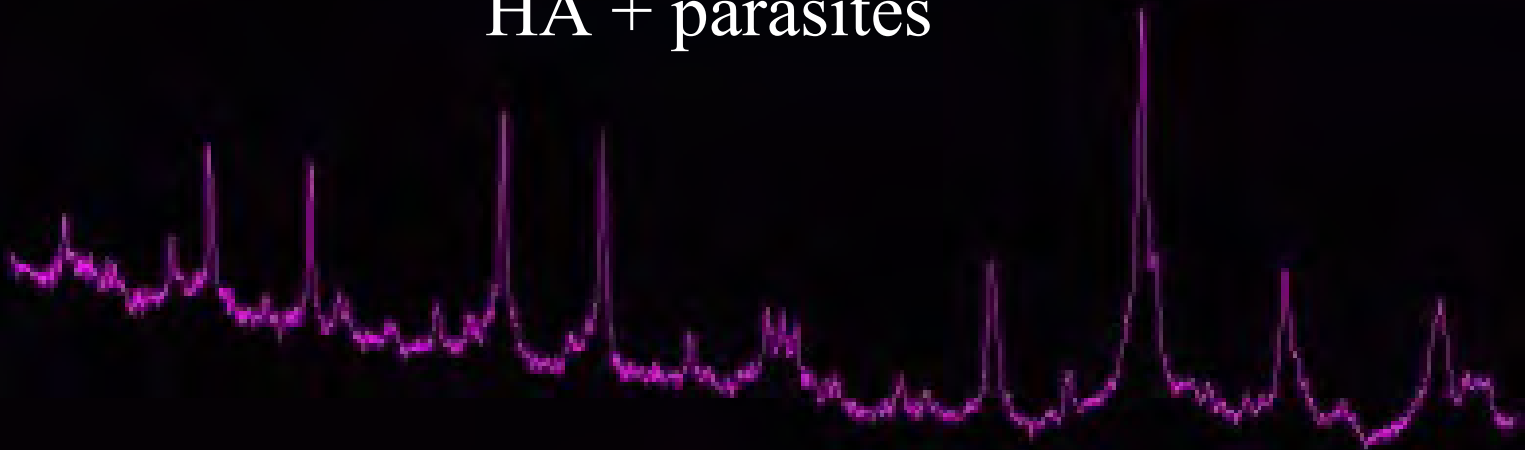
→ Protéines spécifiques de la toxoplasmose oculaire ?

# Analyse des profils protéiques d'humeur aqueuse incubée avec *T. gondii*

HA + surnageant cellules non infectées



HA + parasites



# Recherche et identification de biomarqueurs d'infection invasive à *Aspergillus fumigatus*

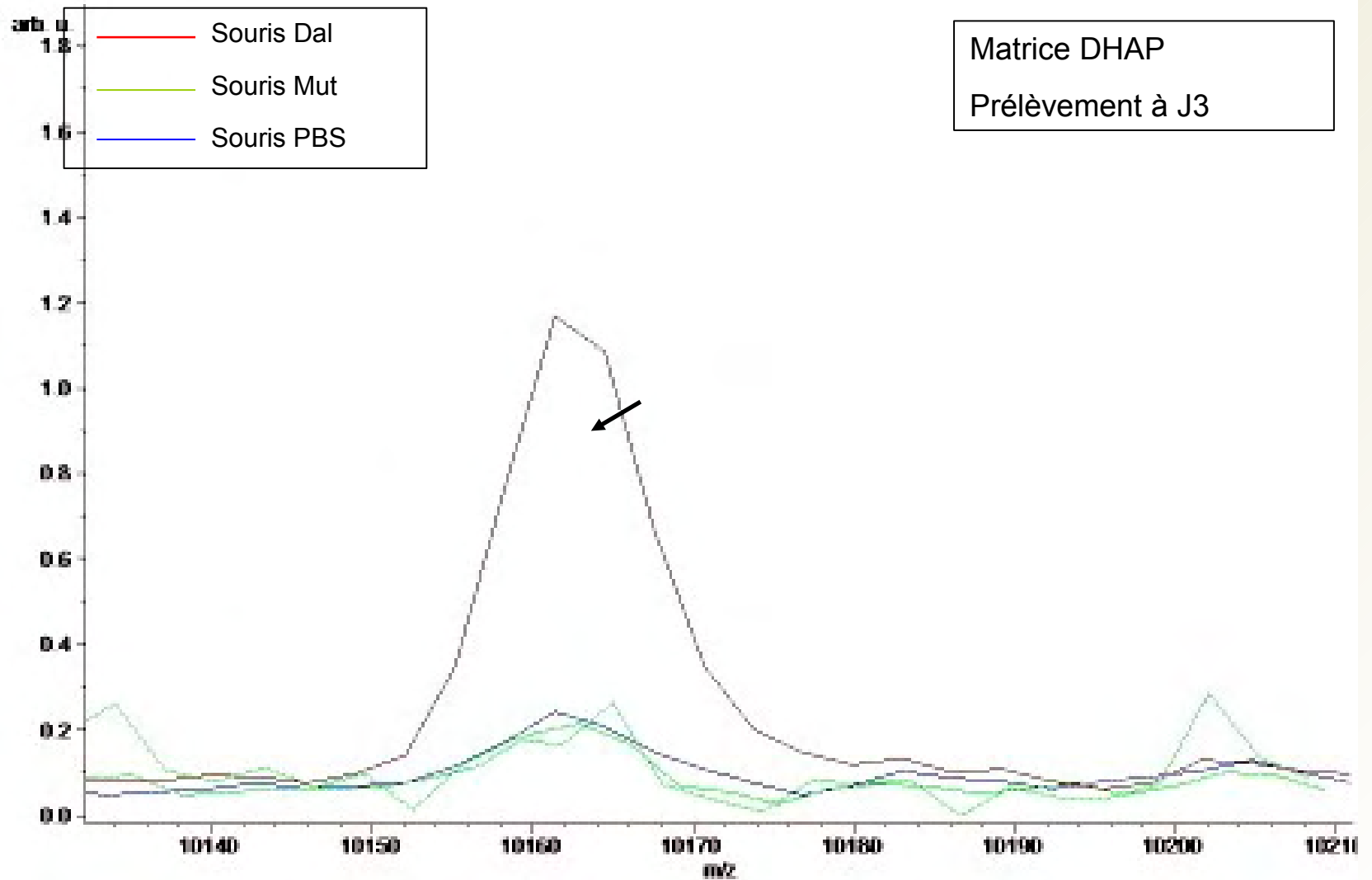


# Recherche et identification de biomarqueurs d'infection invasive à *Aspergillus fumigatus*

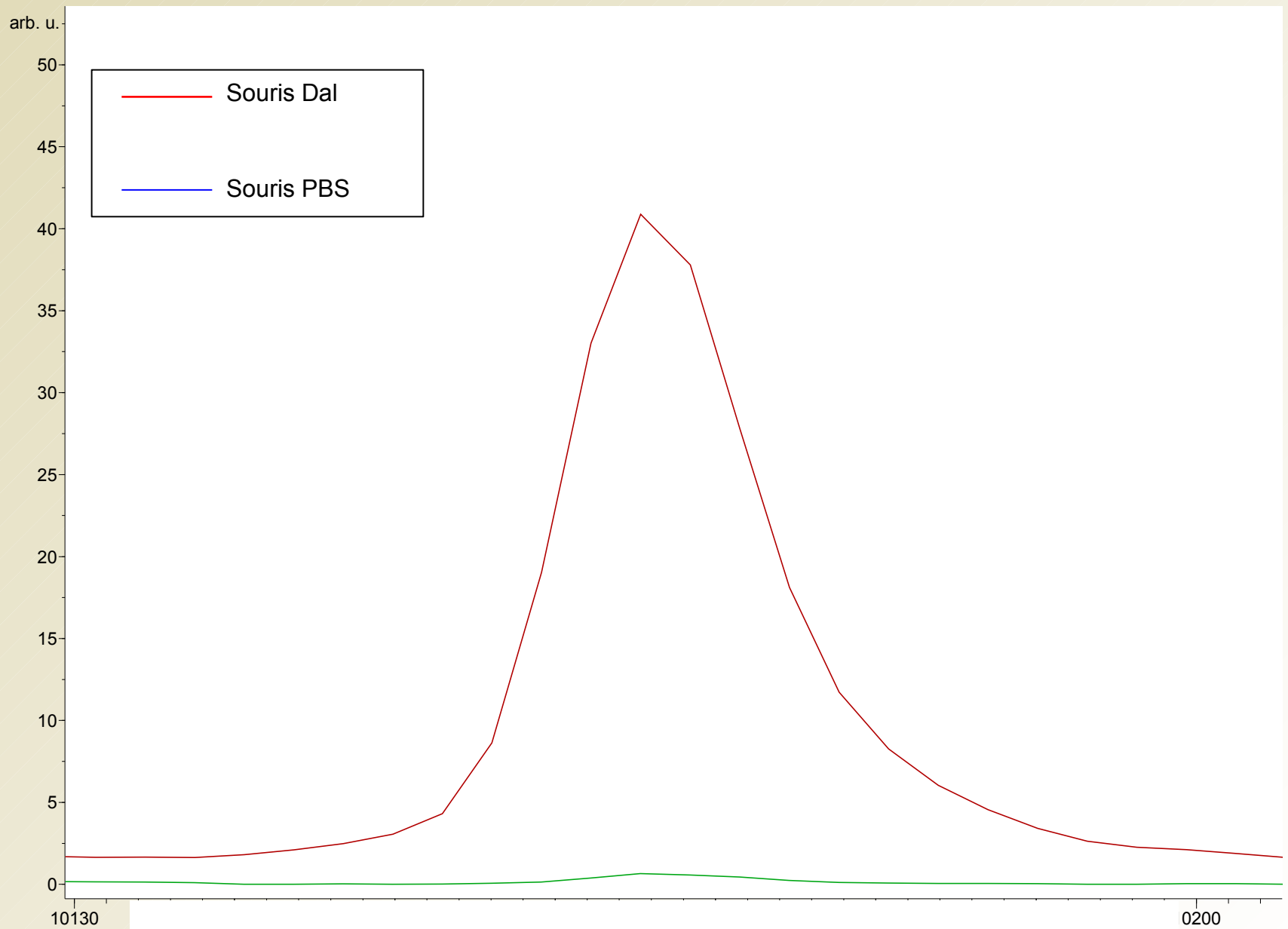


- Homme: LBA, sérums
- Modèles animaux: LBA, sérums
  - Dinde
  - Poussins
  - Souris
  - Rats

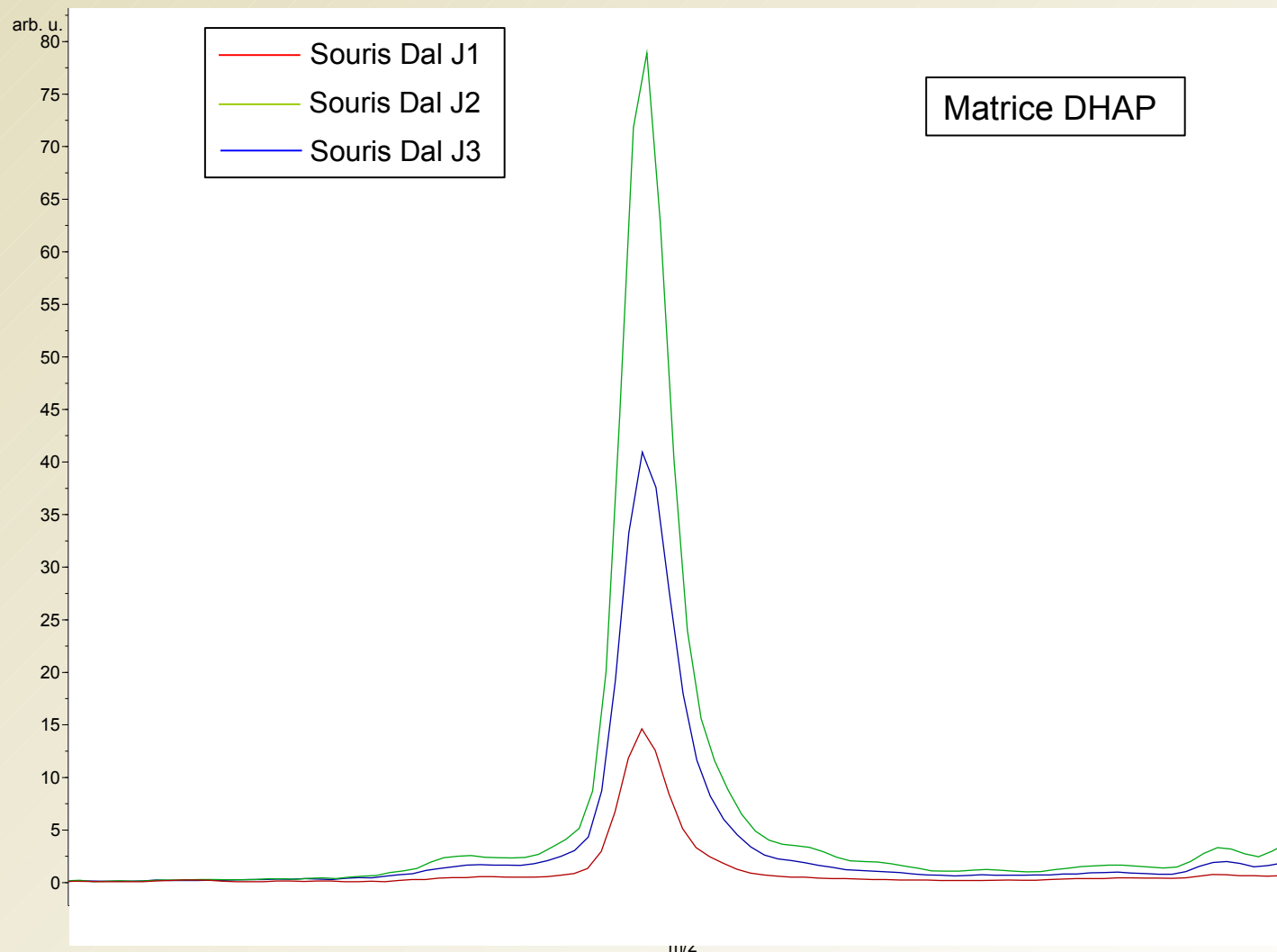
# Sérum



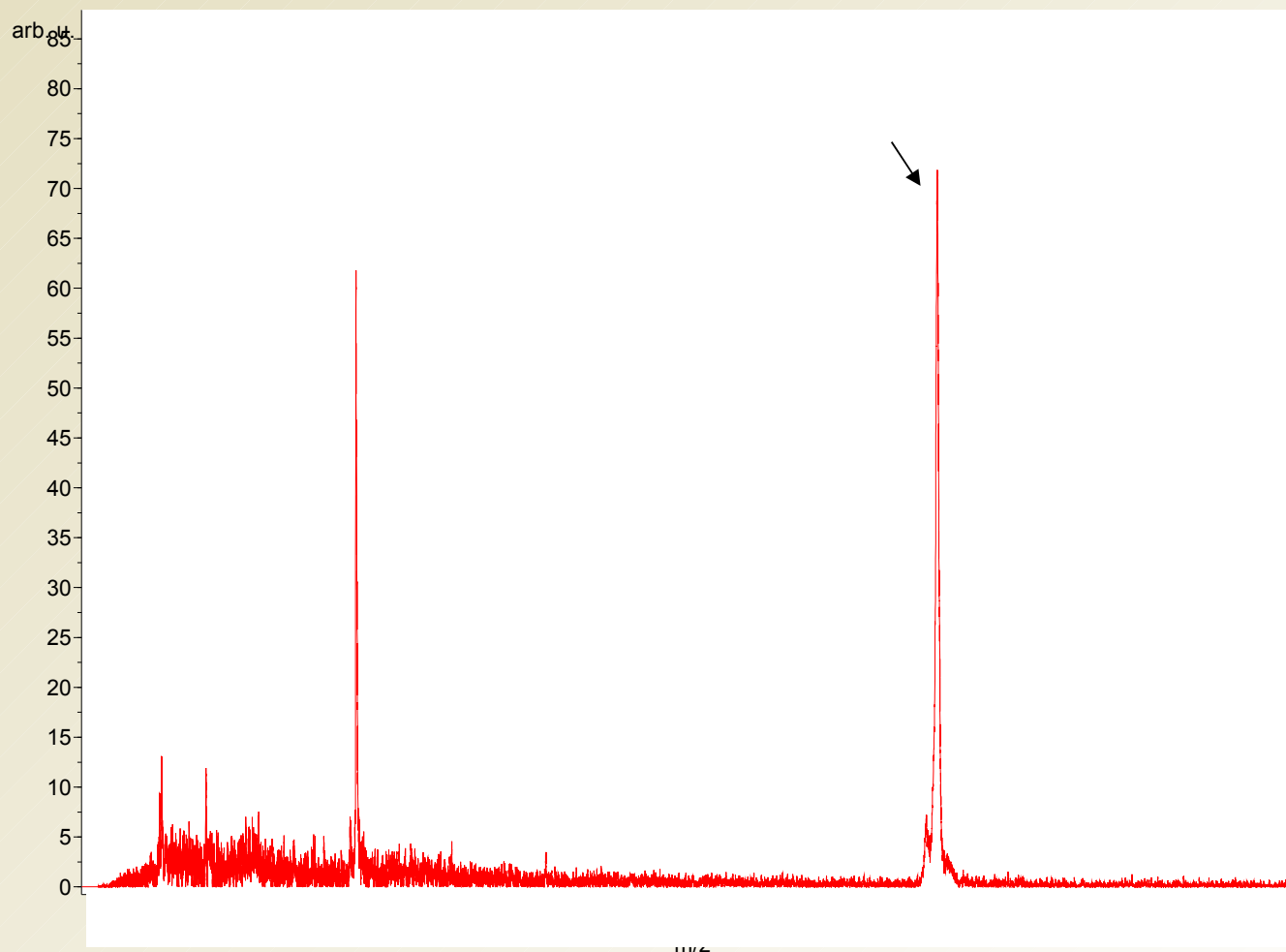
# LBA



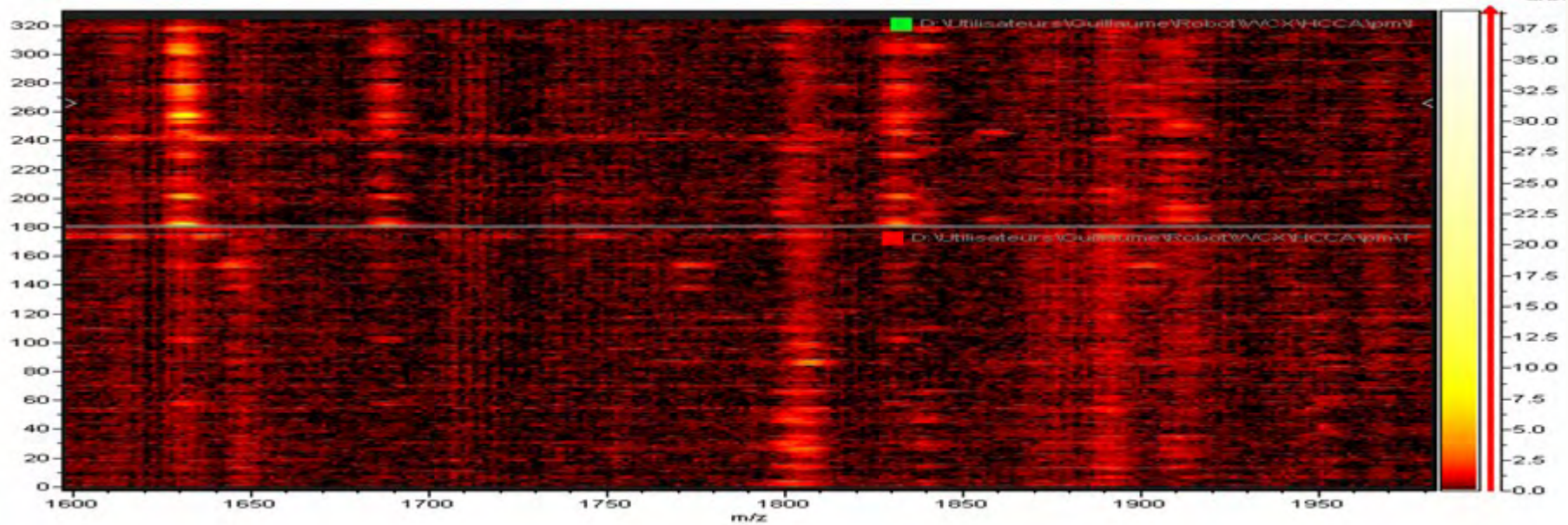
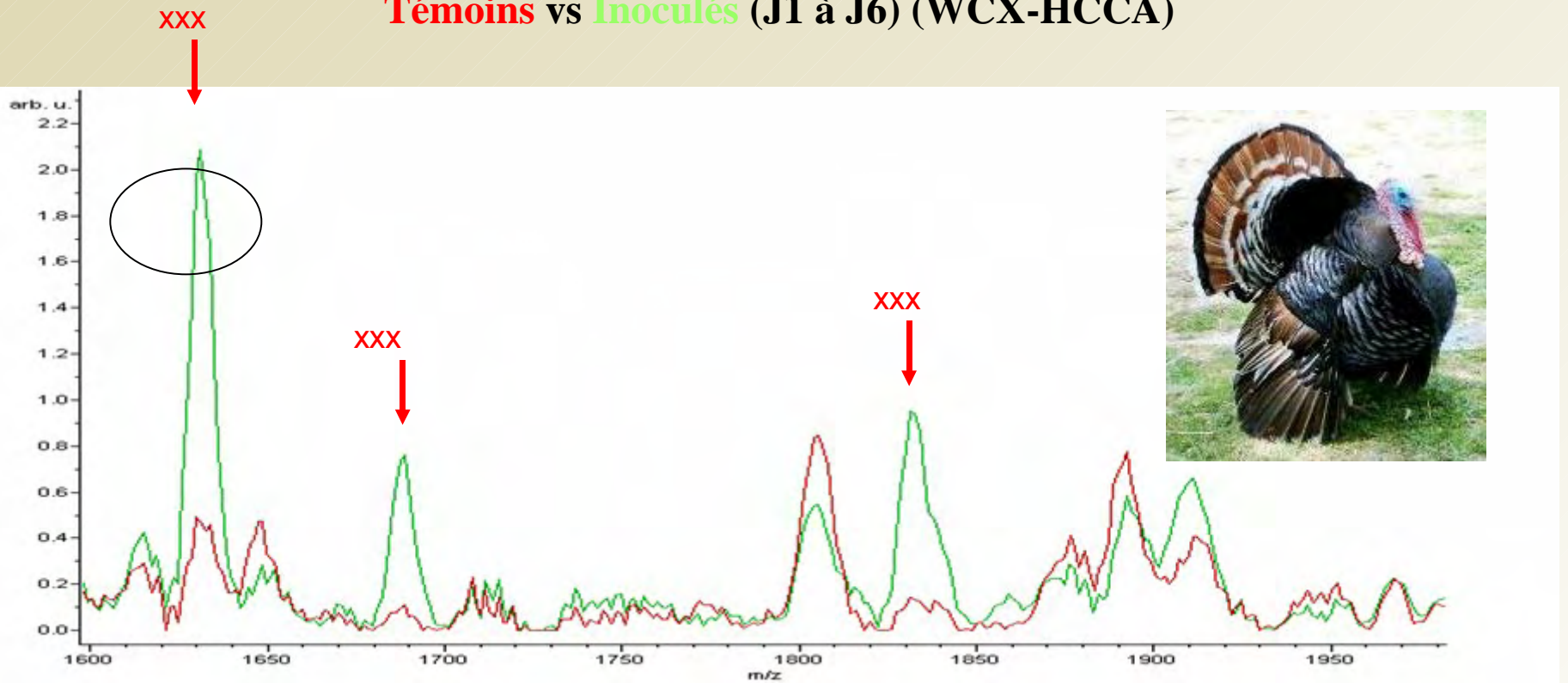
# évolution entre J1 et J3 dans le LBA des souris Dal



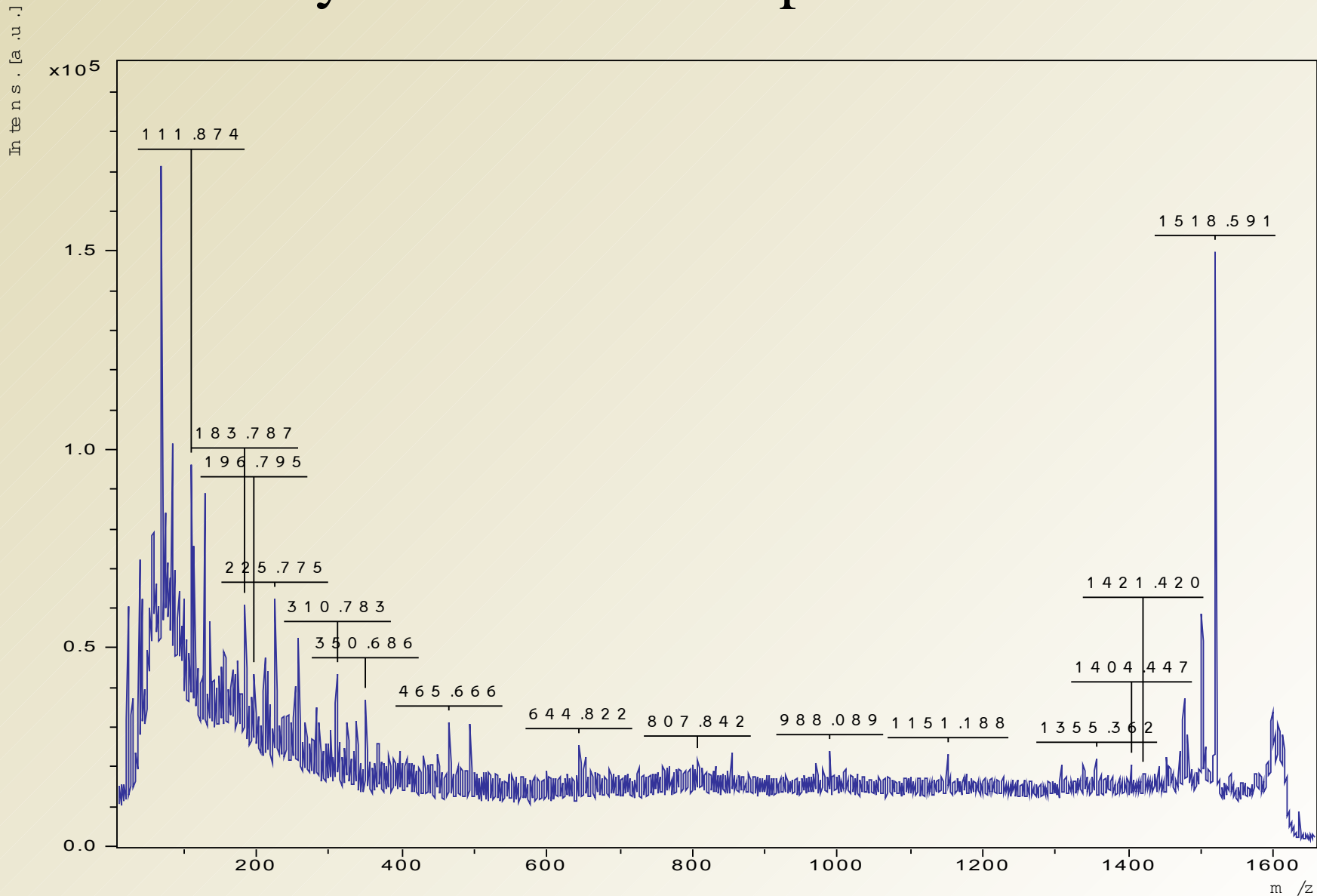
# Fraction d'intérêt n°2 : après micro-LC



# Témoins vs Inoculés (J1 à J6) (WCX-HCCA)



# Analyse TOF-TOF du pic à XXXDa



### DeNovo Result Analysis

Common tags in resulting sequences:

Tag	Score
<input checked="" type="checkbox"/> RYLDDND	100
<input checked="" type="checkbox"/> RYLDDNDHSR	96
<input checked="" type="checkbox"/> PRYLDDMD	63
<input checked="" type="checkbox"/> TPRYLDDND	51
<input checked="" type="checkbox"/> RYLDDNDSHR	43
<input type="checkbox"/> PTRYLDDND	23

Select all | Deselect all | Local Homology

Generated sequences sorted according to BioTools score

15 Sequences | Hint: No internal hit

Sequence	Hint	No internal hit
<input type="checkbox"/> DNP <del>RYLDDND</del> HSR	(82)	
<input type="checkbox"/> T <del>TPRYLDDND</del> HSR	(81)	
<input type="checkbox"/> T <del>TPRYLDDND</del> SHR	(79)	
<input type="checkbox"/> GAT <del>PRYLDDMD</del> HSR	(52)	
<input type="checkbox"/> GAT <del>PRYLDDMD</del> SHR	(50)	
<input type="checkbox"/> AGT <del>PRYLDDMD</del> HSR	(49)	
<input type="checkbox"/> AGT <del>PRYLDDMD</del> SHR	(47)	
<input type="checkbox"/> Y <del>RYLDDND</del> HSR	(47)	
<input type="checkbox"/> Y <del>RYLDDND</del> SHR	(45)	
<input type="checkbox"/> GAT <del>PRYLDDMD</del> HSR	(29)	
<input type="checkbox"/> TP <del>RYLDDND</del> HSR	(28)	
<input type="checkbox"/> GAT <del>PRYLDDMD</del> SHR	(27)	

CopyMS Blast | Select tagged | Deselect all | Define internal hit

OpenMS Blast | New analysis | Accept | Cancel

MS/MS fragments | MS/MS Analysis

DDNDHSR (160s)

MH (mon) 1633.702 | MH (avg) 1634.710 | NS/MS Tol 0.500 | Peaks 93 | Above Threshold 93

Notes:  Monoisotopic  Average | Calculate: Masses | Threshold: 0.000 | Assigned: 35 | Not Assigned: 58

	D	N	P	R	Y	L	D	D	M	D	H	S	R	Asp	Asn	Pro	Arg	Tyr	Leu	Asp	Asp	Met	Asp	
seq	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
a	D	N	P	R	Y	L	D	D	M	D	H	S	R	88.839	202.882	299.135	455.236	618.289	731.383	846.418	961.437	1092.478	1207.585	11
a-17	D	N	P	R	Y	L	D	D	M	D	H	S	R	71.813	185.956	282.186	438.216	601.273	714.357	829.384	944.411	1075.451	1190.478	11
a-18	D	N	P	R	Y	L	D	D	M	D	H	S	R	70.829	184.972	281.124	437.226	600.289	713.373	828.408	943.427	1074.467	1189.494	11
b	D	N	P	R	Y	L	D	D	M	D	H	S	R	116.834	230.877	327.138	483.231	646.284	759.378	874.405	989.432	1120.473	1235.588	11
b-17	D	N	P	R	Y	L	D	D	M	D	H	S	R	99.888	213.951	310.183	466.284	629.268	742.352	857.379	972.406	1103.446	1218.473	11
b-18	D	N	P	R	Y	L	D	D	M	D	H	S	R	98.824	212.967	309.119	465.225	628.284	741.368	856.395	971.422	1102.462	1217.489	11
b-18	D	N	P	R	Y	L	D	D	M	D	H	S	R	134.845	248.888	345.148	501.242	664.285	777.389	892.416	1007.443	1138.483	1253.518	11
c	D	N	P	R	Y	L	D	D	M	D	H	S	R	133.861	247.184	344.156	500.258	663.321	776.405	891.432	1006.459	1137.499	1252.526	11
x	D	N	P	R	Y	L	D	D	M	D	H	S	R	201.898	288.138	425.189	540.216	671.257	786.284	901.318	1014.395	1177.458	1333.559	14
y	D	N	P	R	Y	L	D	D	M	D	H	S	R	175.119	262.151	399.218	514.237	645.277	760.304	875.331	988.415	1151.479	1307.588	14
z	D	N	P	R	Y	L	D	D	M	D	H	S	R	158.892	245.124	382.183	497.218	628.251	743.275	858.305	971.389	1134.452	1290.553	11
i	D	N	P	R	Y	L	D	D	M	D	H	S	R	88.839	87.855	70.845	129.113	136.875	86.896	88.839	88.839	104.852	88.839	11
	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Arg	Ser	His	Asp	Met	Asp	Asp	Leu	Tyr	Arg	1

# Blast de la séquence

Expasy BLAST2 Interface - Microsoft Internet Explorer

Adresse: <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>

Send selected sequences to: Clustal W (multiple alignment) [Soumettre la requête] [Select up to...]

Include query sequence

Id	AC	Description	Score	E-value
<input type="checkbox"/>	sp P32567	SMP2_YEAST Protein SMP2 [SMP2] [Saccharomyces cerevisiae...]	28.6	1.8
<input type="checkbox"/>	tr Q4NEJ7	_ASPFU Ubiquitin C-terminal hydrolase [SAUSP], putative...	27	4.4
<input type="checkbox"/>	tr Q4NQV0	_ASPFU C2H2 finger domain protein, putative [Afu04g14400...	27	5.0
<input type="checkbox"/>	tr Q8SE92	_MEDCR Hypothetical protein 45812.030 [45812.030] [Neur...	27	7.0
<input type="checkbox"/>	tr Q75557	_MEDCR Hypothetical protein NC005620.1 [NC005620.1] [Me...	27	7.0

Graphical overview of the alignments

[Click here](#) to re-submit your query after masking regions matching PROSITE profiles or Pfam HMMs  
([Help](#)) (use ScanProsite for more details about PROSITE matches)

**Profile hits**

**Pfam hits**

**Matches on query sequence**

**Matches on hit sequences (log2 scale)**

Submission: SMP2\_YEAST, Q4NEJ7\_ASFPF, Q4NQV0\_ASFPF, Q8SE92\_MEDCR, Q75557\_MEDCR

Identity: 0 25 50 75 100%

**Alignments**

```
sp P32567 Protein SMP2 [SMP2] [Saccharomyces cerevisiae (Baker's yeast)] 562 AA
SMP2_YEAST align
Score = 28.6 bits (60), Expect = 1.8
Identities = 7/7 (100%), Positives = 7/7 (100%)

Query: 4 RYLEDND 10
RYLEDND
Sbjct: 752 RYLEDND 758
```

**Rechercher un profil protéique spécifique d'une infection parasitaire**

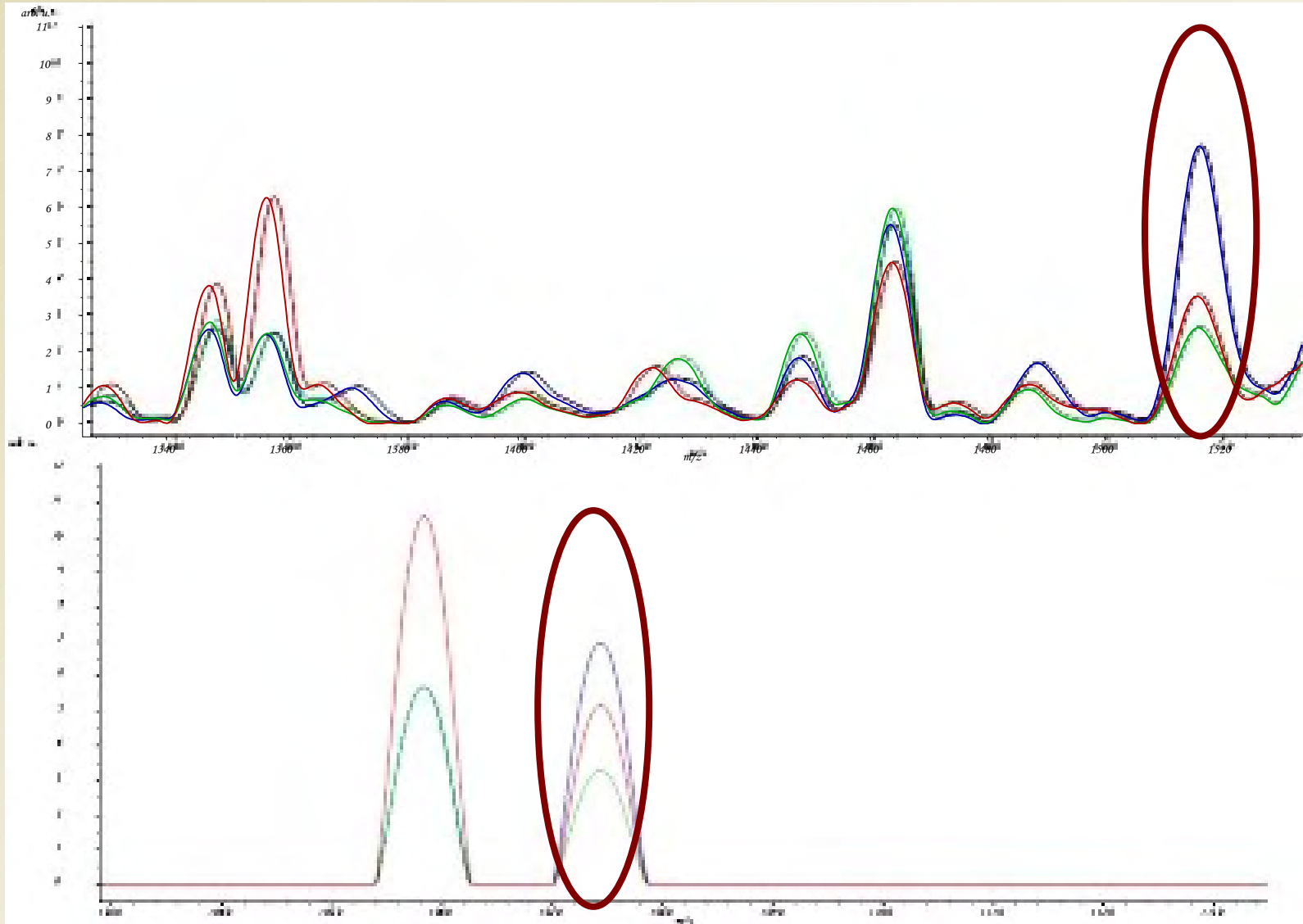
**Biomarqueurs du parasite :**

protéines parasitaires, protéines sécrétées

**Biomarqueurs de l'hôte :**

modifications spécifiques de l'expression de protéines de l'hôte

*Profil de sérums Impaludés (n=37) versus fébriles (n=31) versus sains (n=27)  
après chromatographie sur bille d'échange de cation*

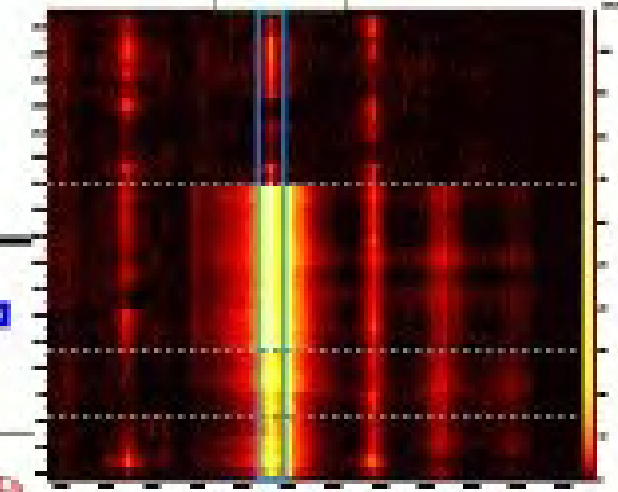
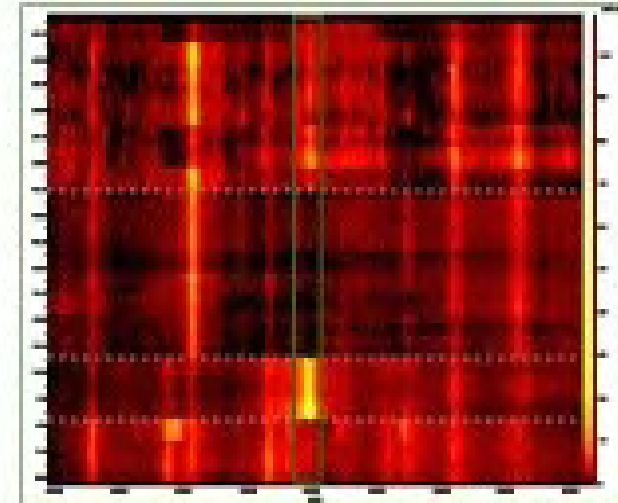
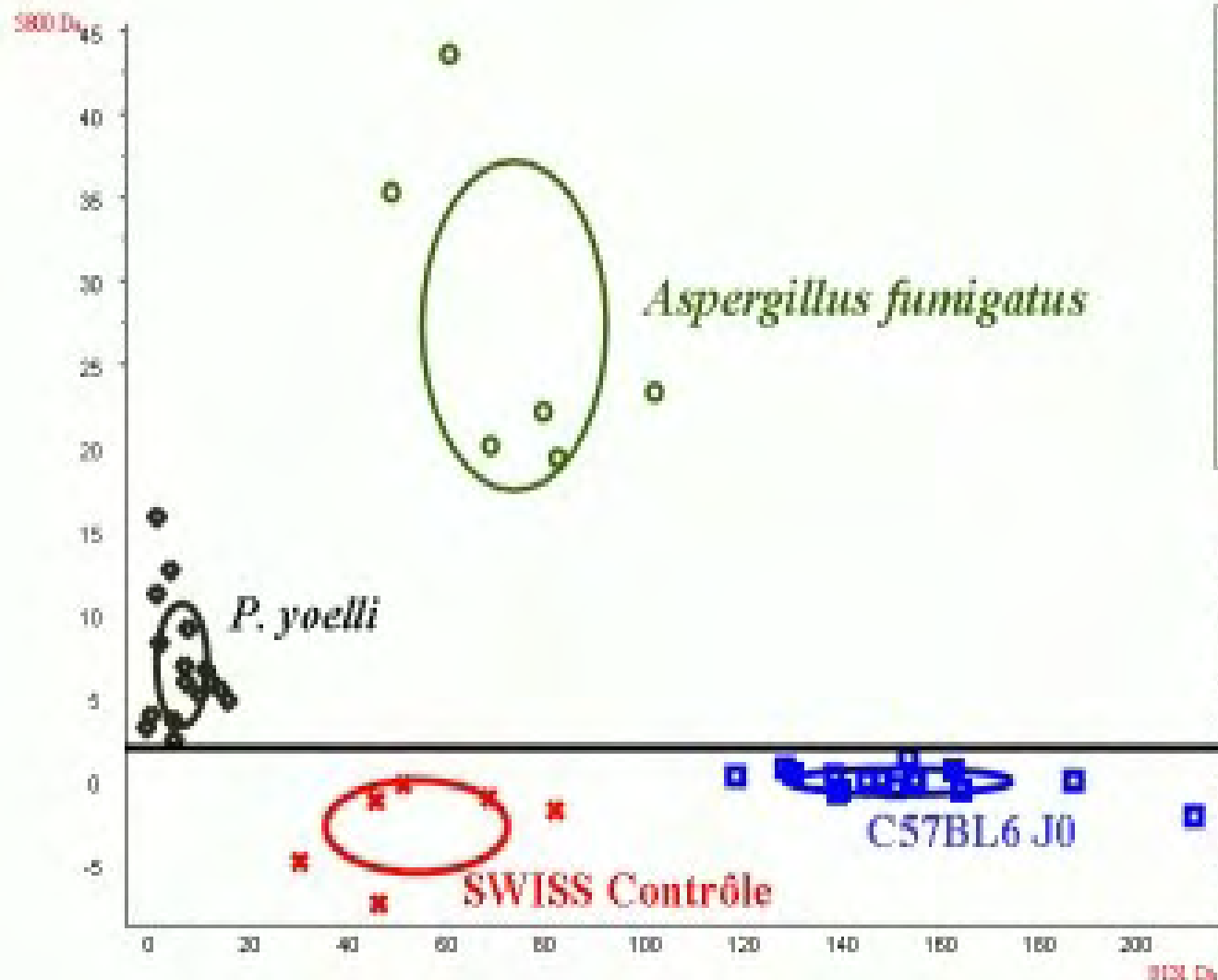


# Recherche d'un profil caractéristique (critères multiparamétriques)

Matériel: Sérum  
Chromatographie: Cationique

Matrice: HCCA  
Gamme de masse: 3000-20000 Da

C57BL6 J3 P yoelli  
C57BL6 J0 P yoelli  
SWISS J3 *Aspergillus fumigatus*  
SWISS J3 Contrôle



# Protéomique clinique

1. Recherche et identification de biomarqueurs dans les fluides biologiques
- 2. Identification directe de micro-organismes**

# Méthodologie



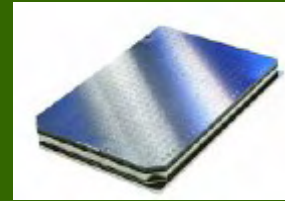
Culture  
Malt/72h/27°C



Acide TFA : 80%  
Eau  
Acétonitrile



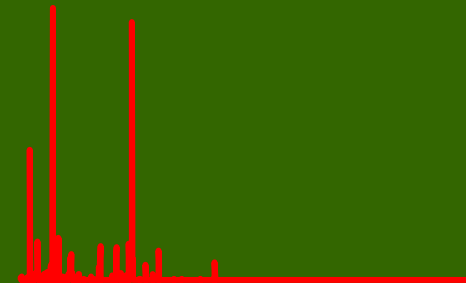
Matrice MALDI



Dépôt Duplicate  
Sur cible MALDI



Extraction des protéines

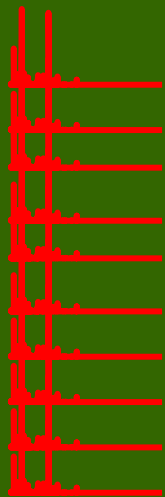


Profil protéique

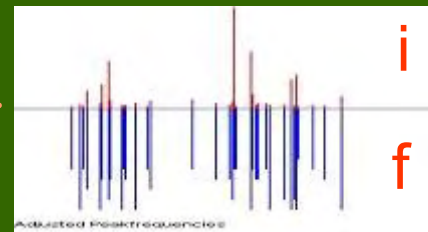
# Création de la banque : spectre principal

Arbre phylogénétique (BM) → 3 souches pour *oxysporum*, *solani*, et 1 pour les autres (*dimerum*, *proliferatum*, *verticilloides*)

Tests sur la reproductibilité et la répétabilité  
chaque souche de référence est analysée 5 fois (en duplicate)



→ m1,i1,m2,i2...  
→ ma1,ia1,ma2,ia2.  
→ ..  
→ .  
→ .  
→ .

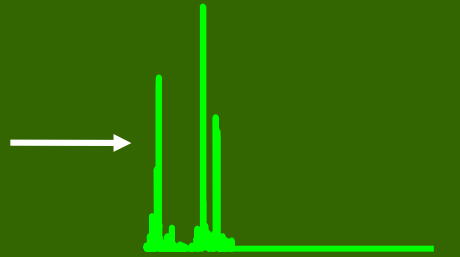


**Condition pour qu'1 pic soit retenu : fréquence >50%**

m1	f1	i1
m4	f4	i4
m10	f10	i10
...	...	...

**SPECTRE PRINCIPAL (SP)**

# Identification



Profil inconnu

m1	i1
m2	i2
...	...

SP1  
SP2  
SP3  
...

2 Scores  
RS et RPN

**Comparaison de la liste  
de pics de la souche aux  
spectres principaux**

Identification du spectre  
RS>0.3  
RPN>0.05  
Identification du micro-  
organisme  
>75% en identification  
des spectres

RS : rend compte du nombre de pics attribuables au SP

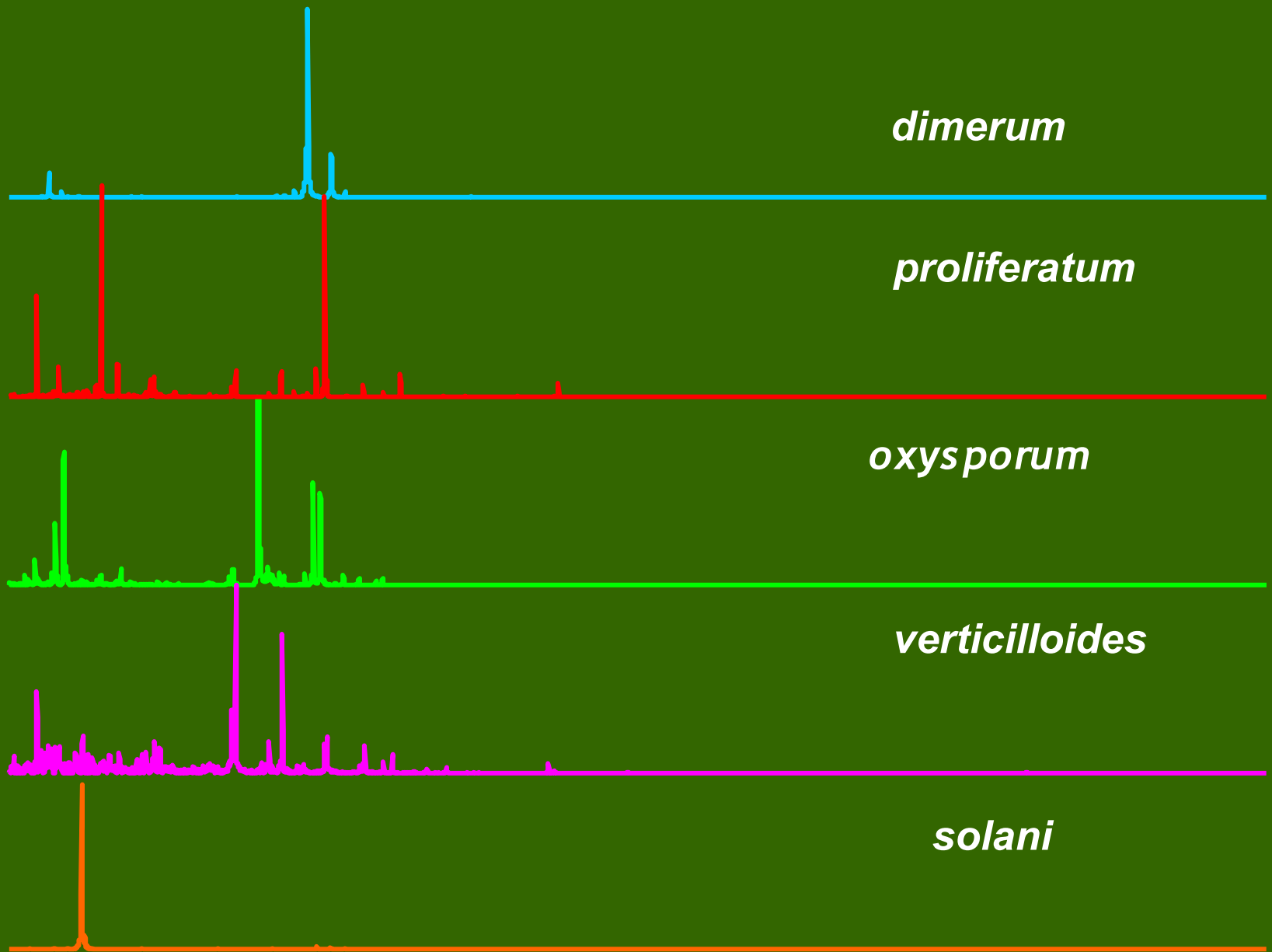
**solani** : peu de pics, dont certains sont communs  
aux autres espèces

RPN : représente la part des pics attribués/part des pics non attribués

# Liste des souches utilisées

Création de la banque		Souches testées pour la validation	
espèces	souches	espèces	Souches
<i>F. dimerum</i>	100006	<i>F. dimerum</i>	26
<i>F. verticilloides</i>	4197	<i>F. verticilloides</i>	4194, 9578, 9577
<i>F. proliferatum</i>	8	<i>F. proliferatum</i>	101, 47, 49, 5689, 3824
<i>F. oxysporum</i>	32, 44,53	<i>F. oxysporum</i>	102, 103, 20, 52,14, 4, 10, 11, 21, 30, 38
<i>F. solani</i>	15469, 23, 50	<i>F. solani</i>	22, 43, 46, 35, 36, 16, 2, 24, 3, 31, 33, 54, 6, 7, 17
		<i>F. clamidosporum</i>	10150
		<i>F. polyphyalodicum</i>	19748
		<i>C lichenicola</i>	14820
		<i>F. equisiti</i>	19306

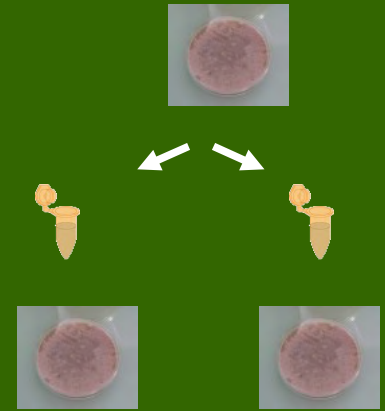
# Spectre de masse des différentes espèces



# Reproductibilité, répétabilité, stabilité

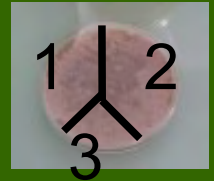
2 expériences à un mois d'intervalle en duplicate

Souches de références :  $RS > 0.7$  et  $RPN > 0.6$

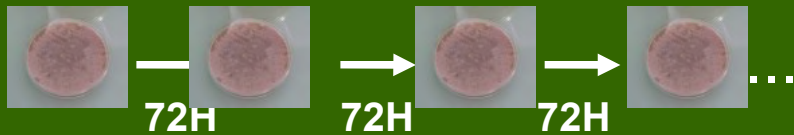


Trois prélèvements d'une même boîte de culture

Souches de références :  $RS > 0.7$  et  $RPN > 0.4$



Stabilité des souches de référence sur plus de 10 repiquages



$RS > 0.35$  et  $RPN > 0.3$

Profils différents après plusieurs repiquages  
mais identification correcte

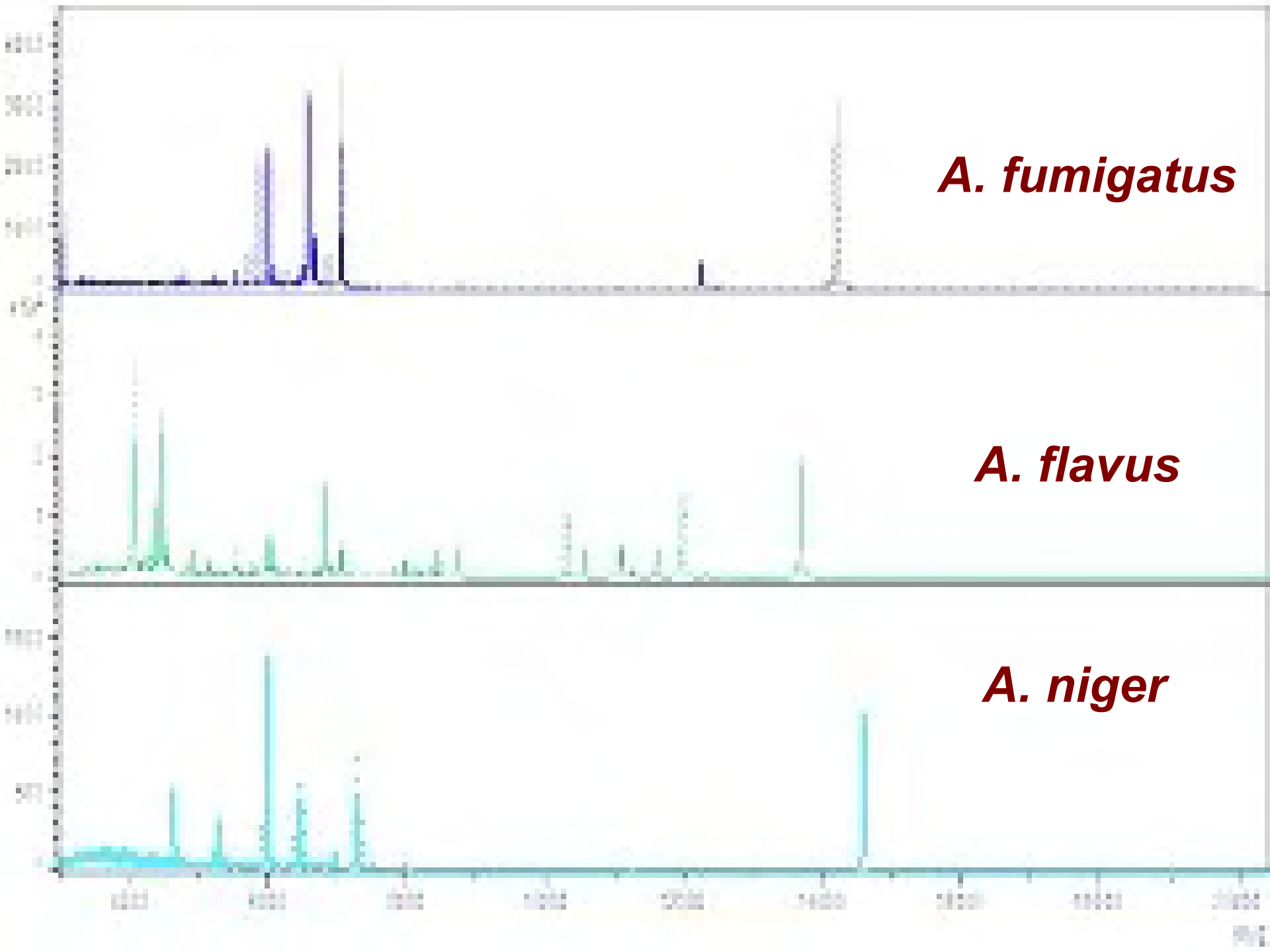
# Test de la banque : 49 souches de 5 espèces différentes analyse : 2 expériences différentes en duplicate

espèce	souche	Moyenne RS	Ecart type RS	Moyenne RPN	Ecart type RPN	résultat
<i>dimerum</i>	26	0,55	0,20	0,86	0,04	<i>dimerum</i>
<i>oxysporum</i>	10	0,39	0,14	0,72	0,11	<i>oxysporum</i>
	102	0,50	0	0,41	0,01	<i>oxysporum</i>
	11	0,52	0,15	0,55	0,07	<i>oxysporum</i>
	14	0,44	0,02	0,31	0,022	<i>oxysporum</i>
	20	0,54	0,05	0,41	0,03	<i>oxysporum</i>
	21	0,49	0,055	0,37	0,05	<i>oxysporum</i>
	30	0,58	0,24	0,45	0,15	<i>oxysporum</i>
	38	0,55	0,15	0,55	0,14	<i>oxysporum</i>
	4	0,36	0,16	0,27	0,13	<i>oxysporum</i>
	52	0,27	0,15	0,50	0,13	<i>unknown</i>
<i>proliferatum</i>	101	0,6	0,03	0,37	0,02	<i>proliferatum</i>
	3824	0,393	0,06	0,27	0,03	<i>proliferatum</i>
	47	0,44	0,13	0,28	0,08	<i>proliferatum</i>
<i>verticilloides</i>	49	0,33	0,05	0,25	0,07	<i>proliferatum</i>
	5689	0,48	0,03	0,29	0,01	<i>proliferatum</i>
<i>verticilloides</i>	4194	0,57	0,09	0,39	0,06	<i>verticilloides</i>
<i>proliferatum</i>	9577	0,46	0,05	0,31	0,04	<i>verticilloides</i>
<i>proliferatum</i>	9578	0,44	0,08	0,30	0,04	<i>verticilloides</i>

- même résultat d'identification en biologie moléculaire en en spectrométrie de masse

# conclusions

- Validation de la banque par 49 souches
- Stabilité, Reproductibilité, Répétabilité
- Standardisation possible et nécessaire
- Cohérence avec la BM
- Rapidité, Sensibilité
- Prix (sans la machine !)



***A. fumigatus***

***A. flavus***

***A. niger***

**Laboratoire de  
parasitologie mycologie  
Pitié-Salpêtrière**

Martin Danis

Annick Datry

Alexandra Faussart

Gabriel Lecso

Sophie Brun

**INSERM UMR S 511**

**Carine Marinach**

Patricia Escoffier

Arnaud Fekkar

Iona Urtizverea

Aurélie Marly

Jean-Yves Brossas

**Laboratoire de parasitologie-  
mycologie Tenon**

Christophe Hennequin

Patricia Roux

Adela Angoulvant

**Carbonnelle et al,**

**Rapid identification of *Staphylococci* isolated in clinical microbiology laboratories by Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS).**

**JCM, in press**