

Généralités

- I. La protéomique
- II. Les protéines : synthèse, composition et structure .

Différentes étapes de l'analyse protéomique

- I. Extraction des protéines
- I. Purification des protéines
- II. Dosage des protéines
- III. Identification des protéines

I. La protéomique

La protéomique désigne la science qui étudie les protéomes.

Un protéome :

L'ensemble des protéines exprimées par le génome dans un système biologique déterminé

Wilkins et al., *Biotechnol. Gene.Eng.Rev.* (1995) 13, 19-5

Le protéome est exprimé dans :

- une **partie d'une cellule** (membranes, organites)
- une **cellule**
- un **groupe de cellules** (organe, organisme, groupe d'organismes)
- ou un **organisme vivant entier...**

dans des conditions données et à un moment donné.

La protéomique permet notamment :

- la recherche et l'identification systématique de l'ensemble des protéines constituant un organisme, un tissu...
- l'identification des protéines constituant un complexe protéique (interactions protéines-protéines)
- la recherche et l'identification de protéines impliquées dans des voies de signalisation par exemple par une analyse différentielle (sauvage/mutant).

le suffixe "-omique" est de nos jours appliqué à toutes les causes pour désigner l'étude de systèmes à grande échelle. Ainsi, l'étude du génome entier est connu sous le nom de **génomique**, celles d'un grand nombre de protéines est devenu la **protéomique**, ou encore **l'interactomique** (étude des interactions), ou à la **transcriptomique** (étude de l'ARNm).

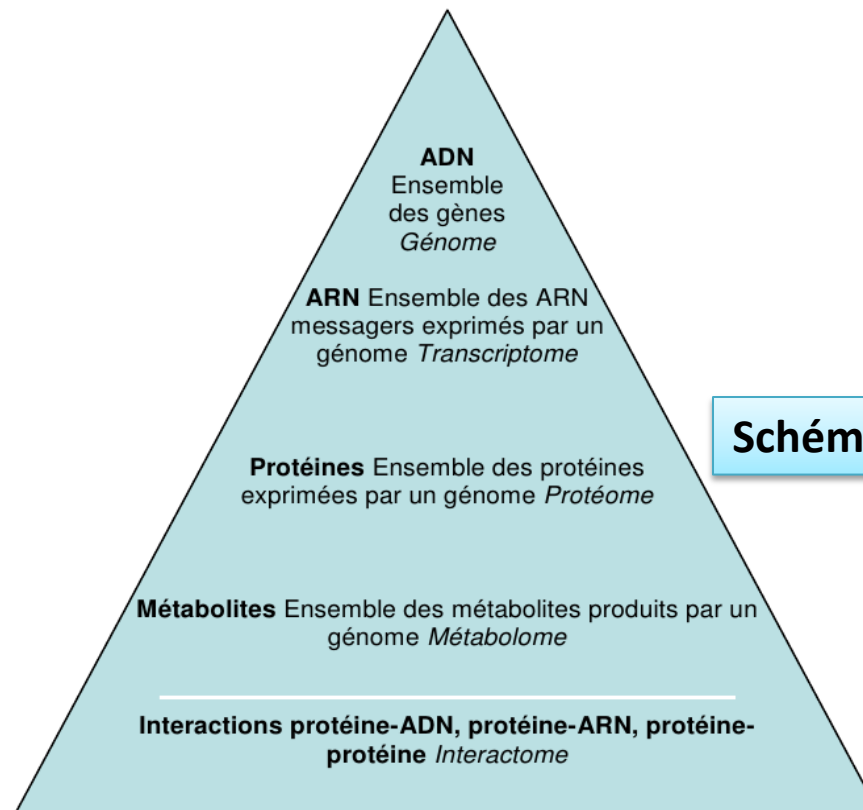


Schéma des sciences omiques

Génomique et Protéomique

Le **protéome** est l'ensemble des protéines codées par le **génome**

Les approches
génomiques



Déterminent :

- les séquences d'ADN
- les séquences et l'abondance des ARNm.

Les approches
protéomiques

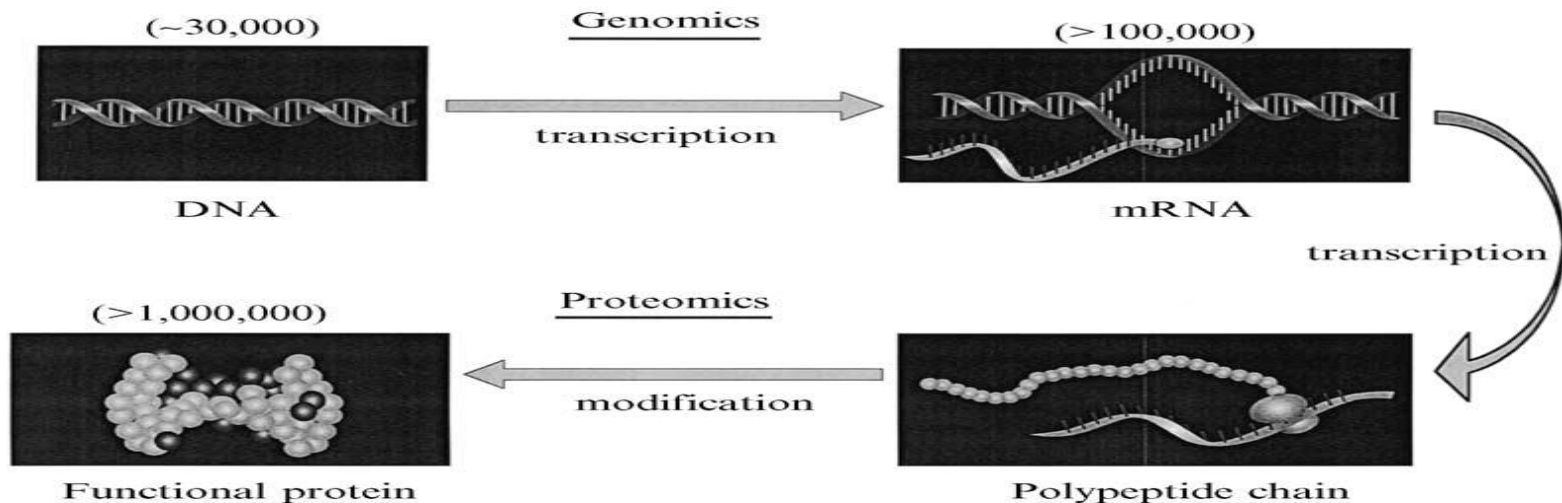


Déterminent :

- l'abondance des protéines,
- les modifications,
- les localisation et les interactions.

La **protéomique** apporte des informations sur les fonctions du génome. Elle s'inscrit ainsi dans le prolongement de la génomique.

Le génome : relativement constant (Le génome humain : 30.000 gènes)



- **Le protéome** ; taille et complexité plus importante (Chez l'Homme, le protéome total : entre 0,4 et 1,2 10^6 protéines différentes).
- **Monde dynamique** : varie temporellement et spatialement, selon
 - les étapes du cycle cellulaire,
 - de la différenciation
 - et selon les réponses de l'organismes à son environnement ou à différents signaux biologiques

III. Les protéines : synthèse, composition et structure.

Matériel génétique = Σ gènes appelé **génome**

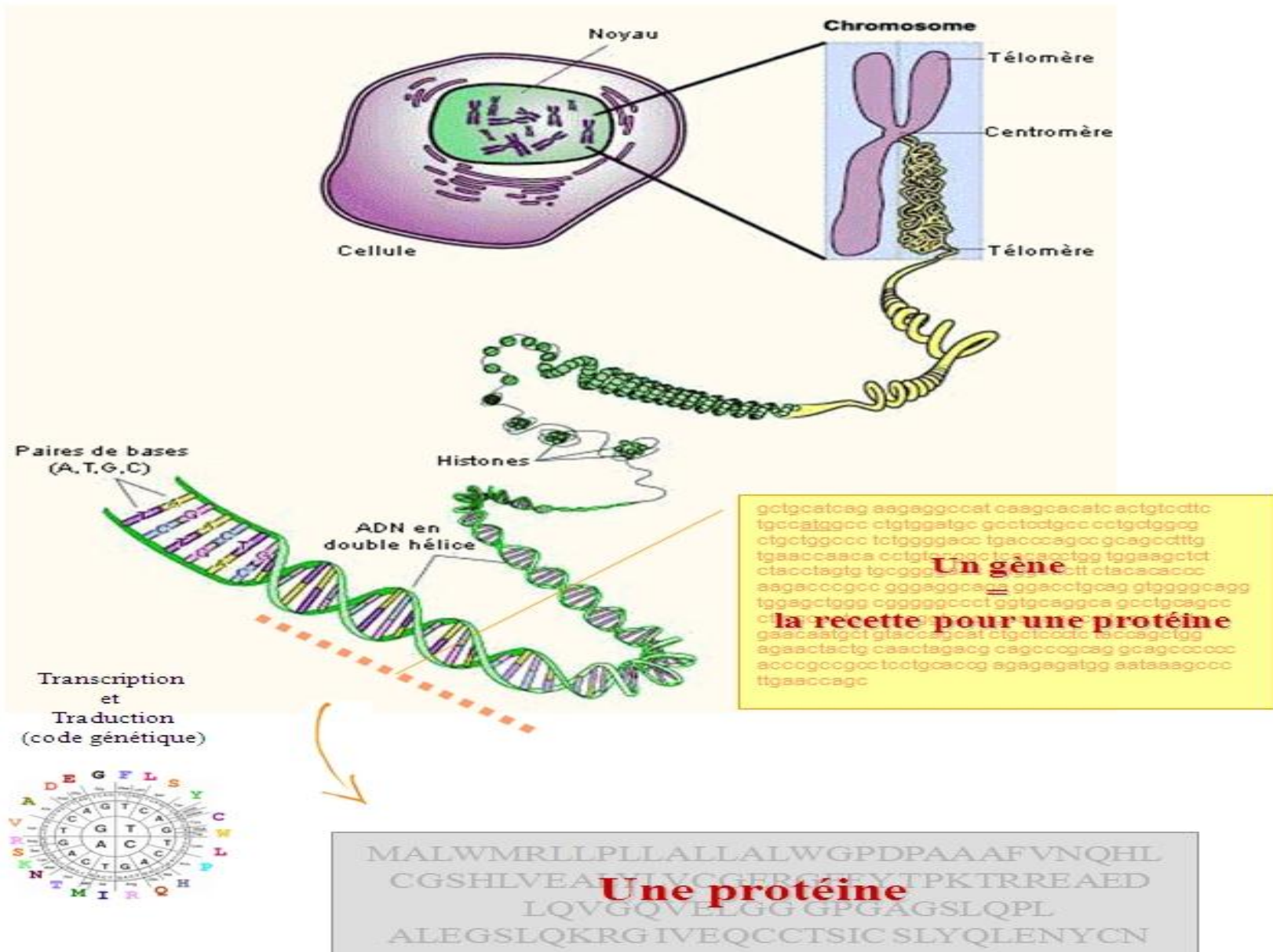


Commande et programme la structure et le fonctionnement de la cellule.

L'expression des **gènes** correspond à un transfert de l'information génétique de **l'ADN** aux **ARN**, puis des ARN aux **protéines** :

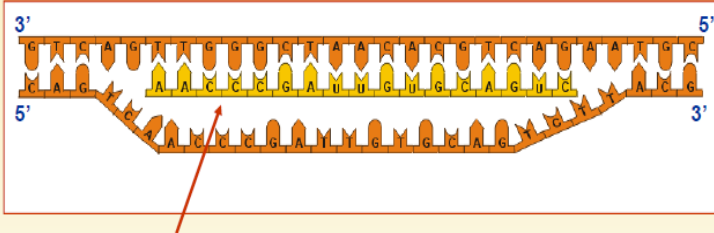
Les protéines : macromolécules biologiques qui interviennent dans la grande majorité des processus qui régissent le fonctionnement de tout être vivant.

La protéine est composée par l'enchaînement de molécules plus simples : **les acides aminés**.

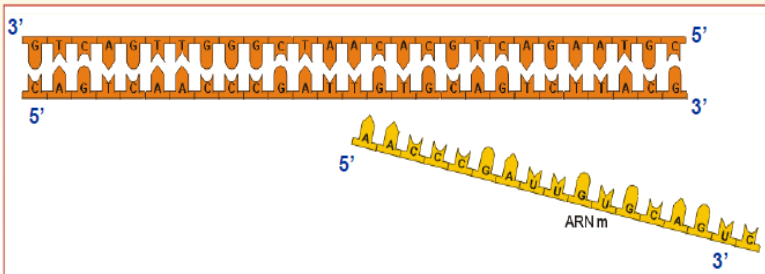


Synthèse des protéines

- **Transcription** de la séquence d'ADN codant le **gène** associé à la protéine en ARNm.
- Les nucléotides de l'ARNm sont lus **par triplets**, un triplet appelé **codon** va être traduit en **un acide amine** ou en une instruction.

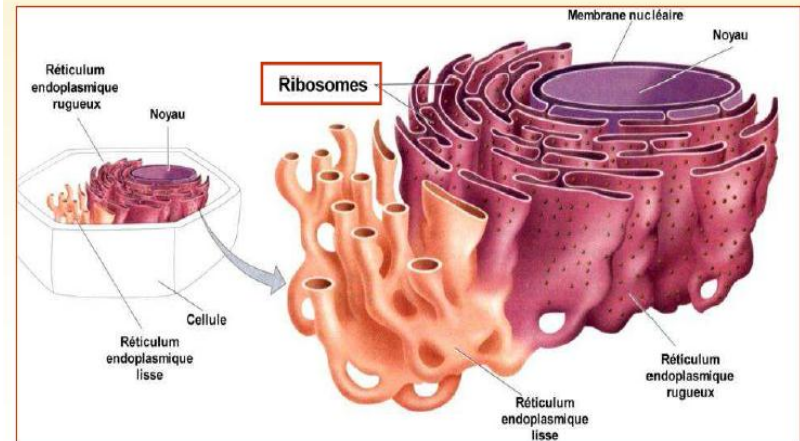


Copie du gène en ARN = ARNm (ARN messenger)

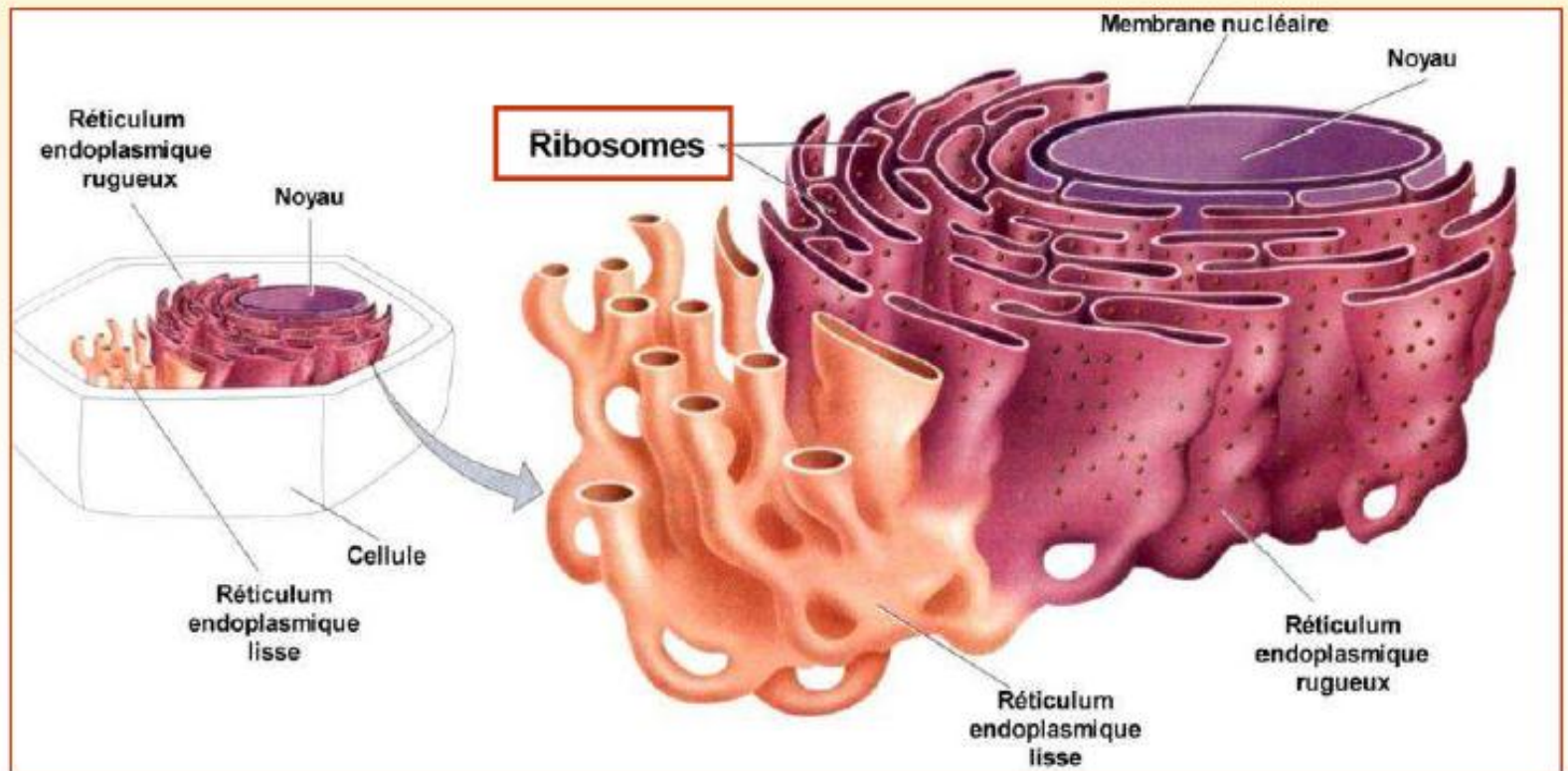


L'ARNm se détache et la molécule d'ADN se referme

La synthèse de la protéine (assemblage des acides aminés) se fait au niveau des **ribosomes**



La synthèse de la protéine (assemblage des acides aminés) se fait au niveau des **ribosomes**



Composition et structure des protéines

Acides aminés : description physico-chimique.

20 AA communs à l'ensemble des espèces, tous différenciables par leur chaîne latérale. Ce radical leur confère des propriétés physico-chimiques particulières. Ces propriétés peuvent être déclinées en 5 catégories :

Acide - **Basique** - **Neutre** - **Polaire** (ou hydrophile) - **Apolaire** (ou hydrophobe).

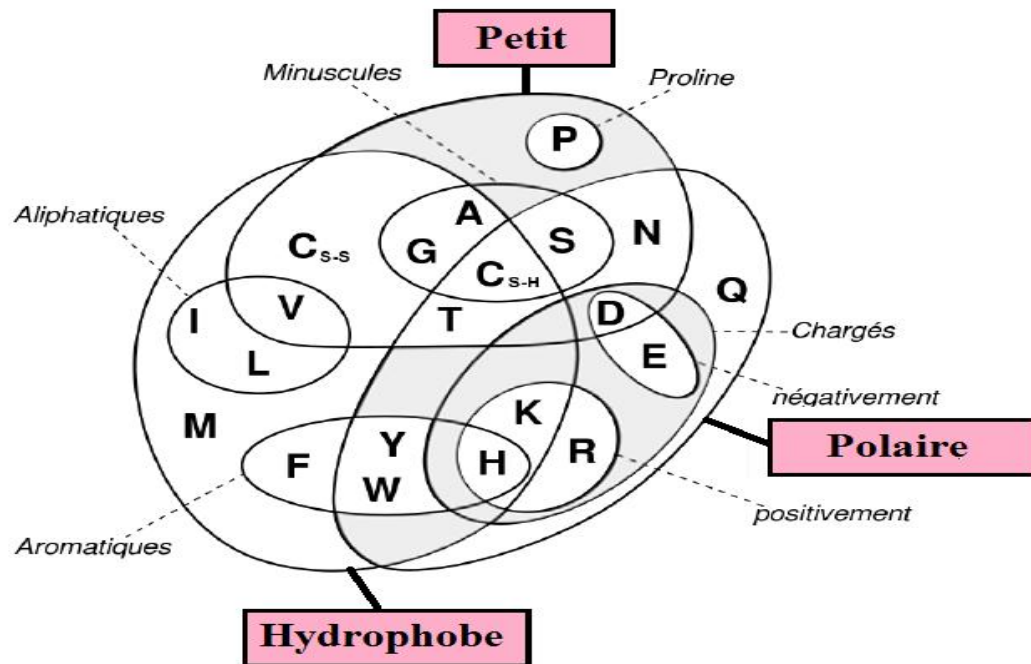
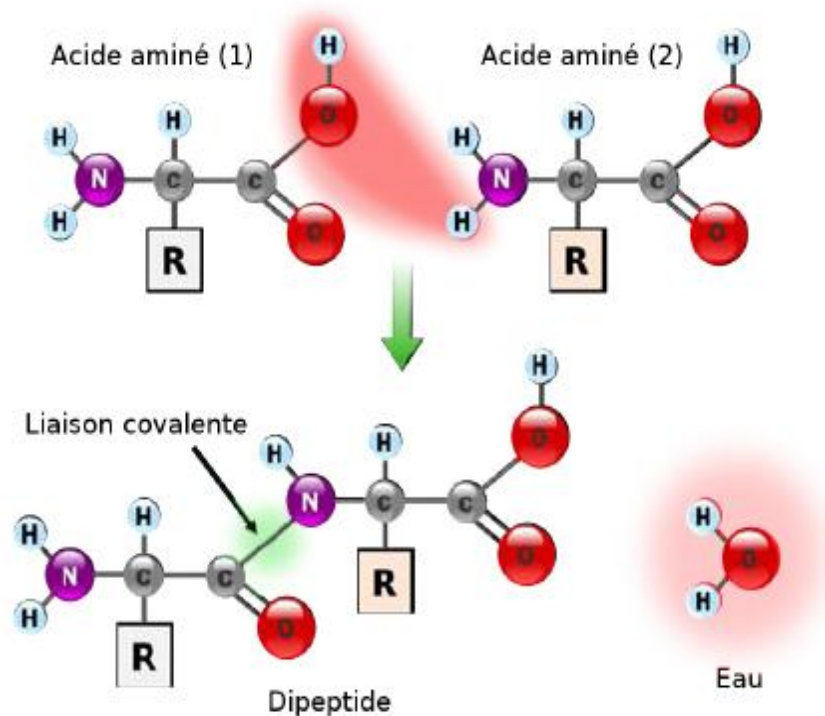
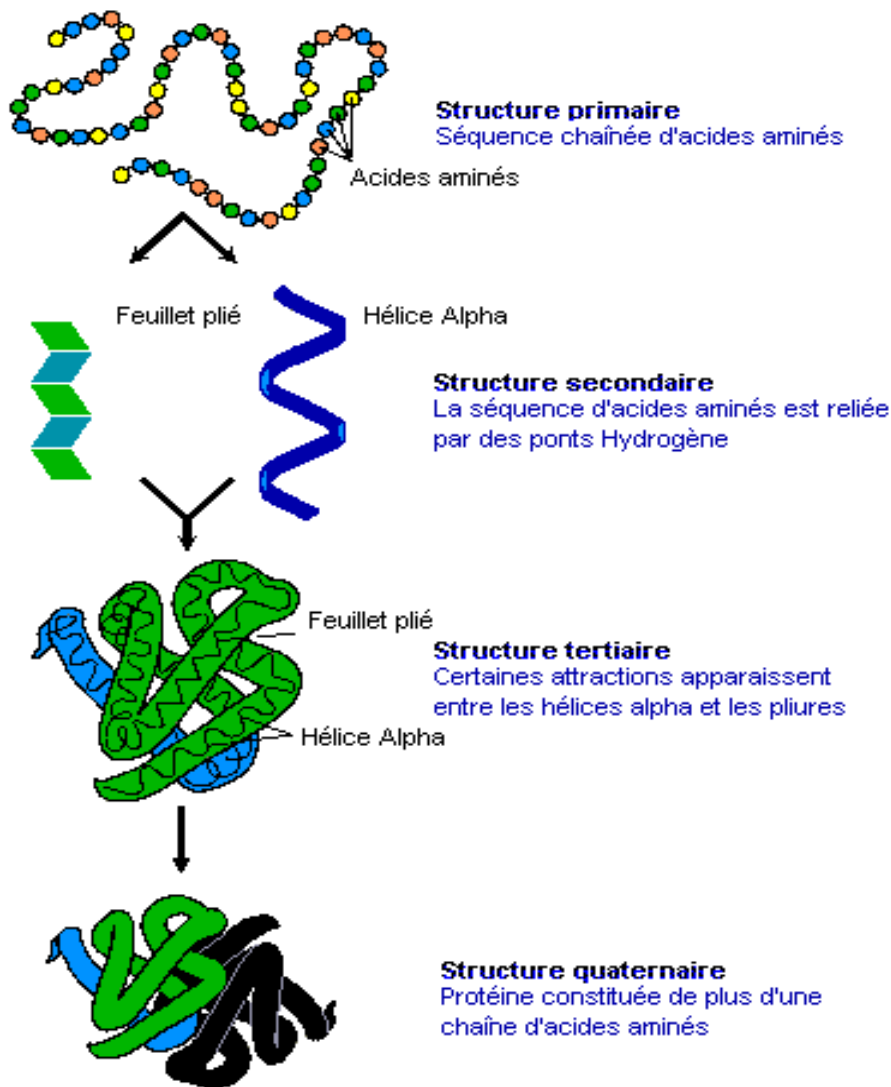


Diagramme de Venn des propriétés des acides aminés

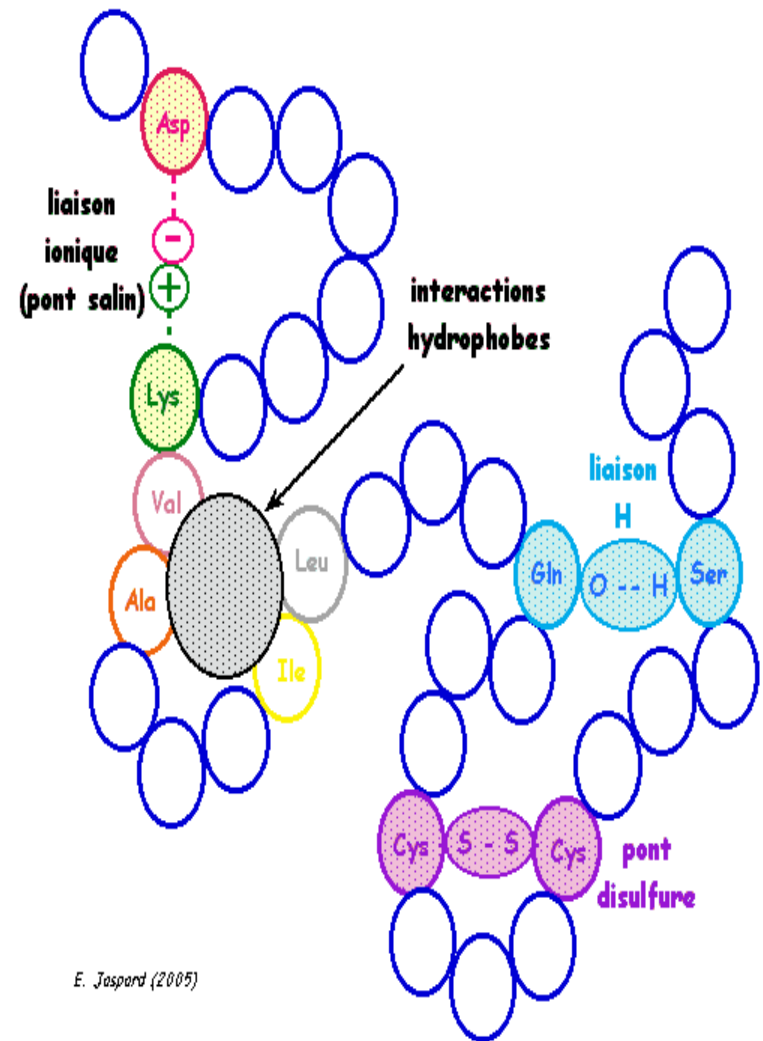
Acide aminé	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre	Poids (en g/mol)
alanine	Ala	A	89,1
arginine	Arg	R	174,2
asparagine	Asn	N	132,1
aspartate	Asp	D	133,1
cystéine	Cys	C	121,2
glutamate	Glu	E	147,1
glutamine	Gln	Q	146,2
glycine	Gly	G	75,1
histidine	His	H	155,2
isoleucine	Ile	I	131,2
leucine	Leu	L	131,2
lysine	Lys	K	146,2
méthionine	Met	M	149,2
phénylalanine	Phe	F	165,2
proline	Pro	P	115,1
sérine	Ser	S	105,1
thréonine	Thr	T	119,1
tryptophane	Trp	W	204,2
tyrosine	Tyr	Y	181,2
valine	Val	V	117,1

Pour former une protéine, les acides aminés se lient entre eux par une liaison covalent : **la liaison peptidique**





Les quatre niveaux de structure d'une protéine



Interactions entre AA, à l'origine des structures protéiques

Différentes étapes de l'analyse protéomique

Pour l'étude d'une protéine, il faut:

➤ Isoler la protéine d'intérêt;

fractionnement cellulaire, ultracentrifugation, **purification**, caractérisation, dosage...

➤ Analyser la composition chimique de la protéine ;

composition globale, séquençage, spectrométrie de masse...

➤ Découvrir la structure spatiale de la protéine ;

dichroïsme circulaire, diffraction des rayons X, RMN...

➤ Corréler la structure à la fonction de la protéine

I. Extraction des protéines

Lyse cellulaire

Les principales approches de lyse des cellules font appel aux techniques suivantes :

- ❑ **choc osmotique** : peut suffire à briser la membrane cellulaire de cellules fragiles).
- ❑ **Action mécanique** : un homogénéisateur à piston permet de briser la plupart des cellules de mammifères.
- ❑ **Emploi d'enzymes (exp.lyticase)** : pour les cellules de plantes, de levures ou les bactéries (présence d'une paroi cellulaire très résistante).
- ❑ **Le traitement aux ultrasons** : sonication
- ❑ **Emploi de billes de verre** sont envisageables.

II. Purification des protéines

Pourquoi purifier ?

- ✓ Etudier les propriétés d'une protéine
- ✓ Déterminer sa séquence en acides aminés
- ✓ Déterminer sa structure tridimensionnelle

Stratégie générale de la purification des protéines

Etapes de la purification	objectif
Etape (1) Capture et concentration Centrifugation, précipitation saline, d'ultrafiltration..	concentration et le fractionnement
Etape (2) : Purification étapes chromatographiques successives Electrophorèse.....	élimination des contaminants pour atteindre la pureté désirée et la concentration du produit d'avantage
Etape (3) : Finition Méthodes de conservations : Milieu tamponné ; Congélation en présence d'agents cryoprotecteurs....	stabilisation de la protéine d'intérêt

Stratégie générale de la purification des protéines

Les différences de propriétés physico-chimiques et biochimique des protéines (formes, masses moléculaires, charges ioniques, hydrophobicité et solubilité....) sont mises à profit pour les **séparer**, l' **isoler** et les **purifier**.

Caractéristiques

Techniques

•Solubilité

1. Solubilisation/précipitation saline

•Charge ionique

1. Chromatographie par échange d'ions
2. Electrophorèse
3. Focalisation isoélectrique

•Caractère polaire

1. Chromatographie d'adsorption
2. Chromatographie en phase inverse
3. Chromatographie par interactions hydrophobes

•Taille moléculaire

1. Dialyse et ultrafiltration
2. Electrophorèse en gel
3. Chromatographie par filtration sur gel

•Spécificité de liaison

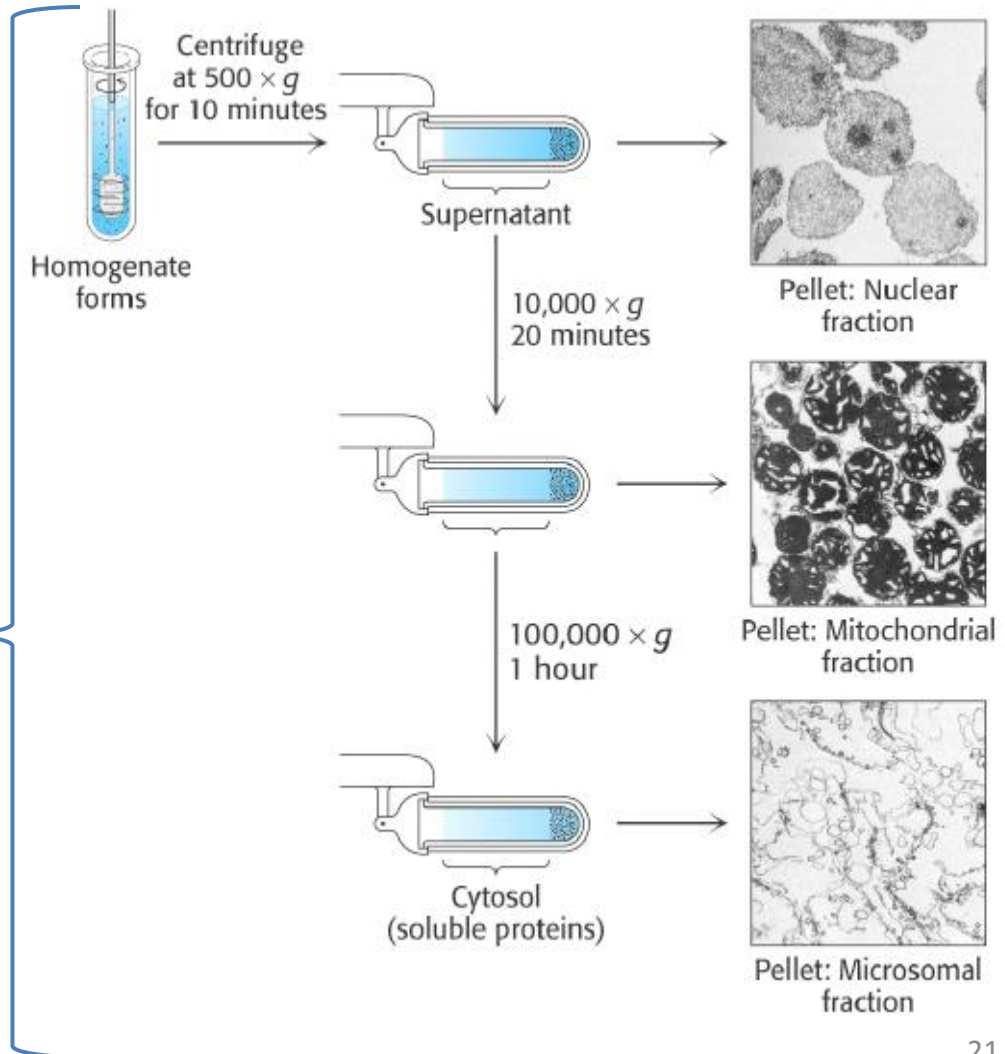
1. Chromatographie d'affinité

Etapes initiales : centrifugation, précipitation aux sels, dialyse et ultrafiltration

Centrifugation

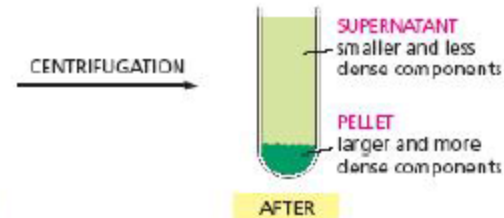
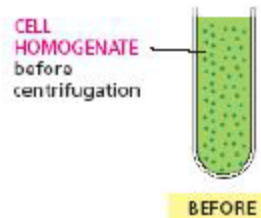
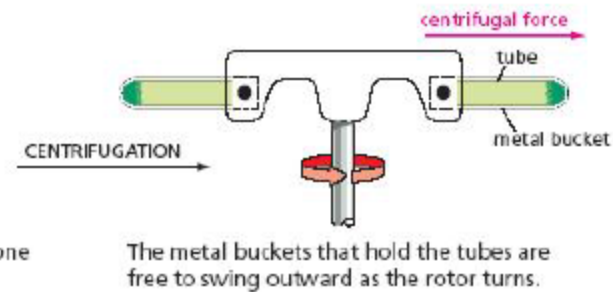
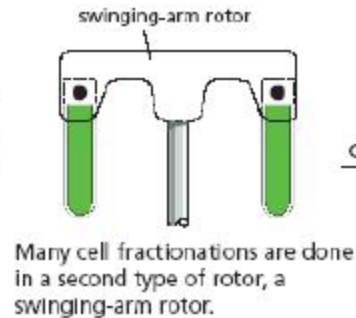
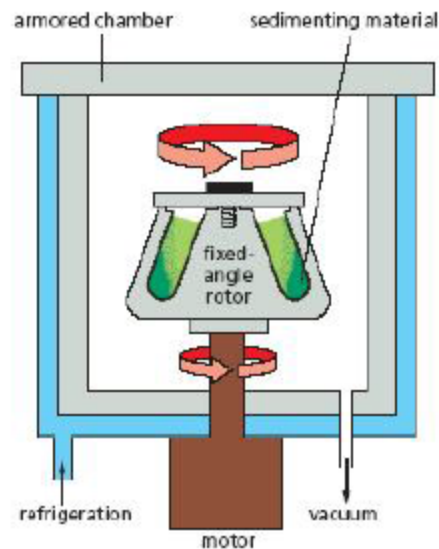
Principe : séparation des composés d'un mélange en fonction de leur **densité** en les soumettant à une **force centrifuge**.

Exemple d'éléments séparés en fonction de la force centrifuge appliquée

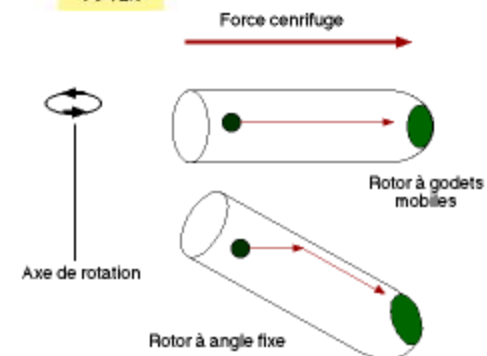


Différents types de centrifugeuse selon les besoins expérimentaux

THE CENTRIFUGE



Et rotors verticaux ou à angle fixe ou à godets mobiles.



Étapes initiales : centrifugation, précipitation aux sels, dialyse et ultrafiltration

Précipitation aux sels

La solubilité d'une protéine en solution aqueuse est fonction de la concentration en sels dissous.

La concentration en sels est exprimé par la force ionique I :

$$I = 1/2 \sum c_i Z_i^2$$

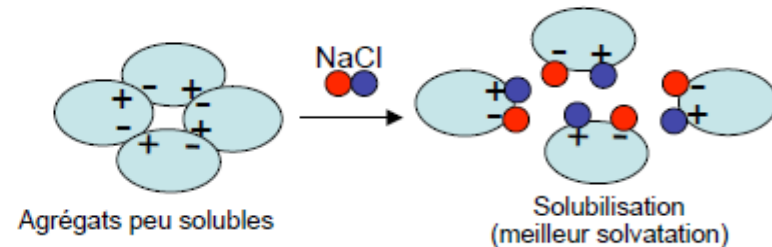
c_i = concentration molaire des espèces ioniques

Z_i = charge ionique

La solubilité d'une protéine à faible force ionique augmente avec la concentration en sels: **Salting in**

Protéines agrégées par les interactions ioniques;

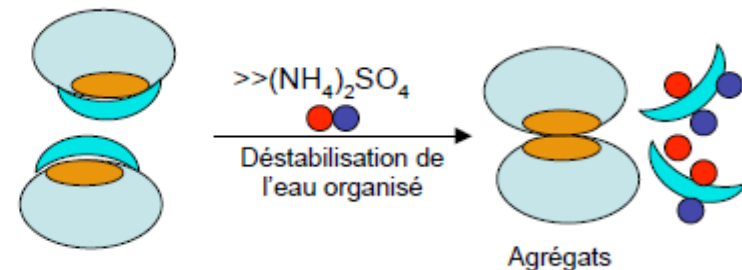
Contre-ions entourent les charge des protéines, augmentant leur solubilité.



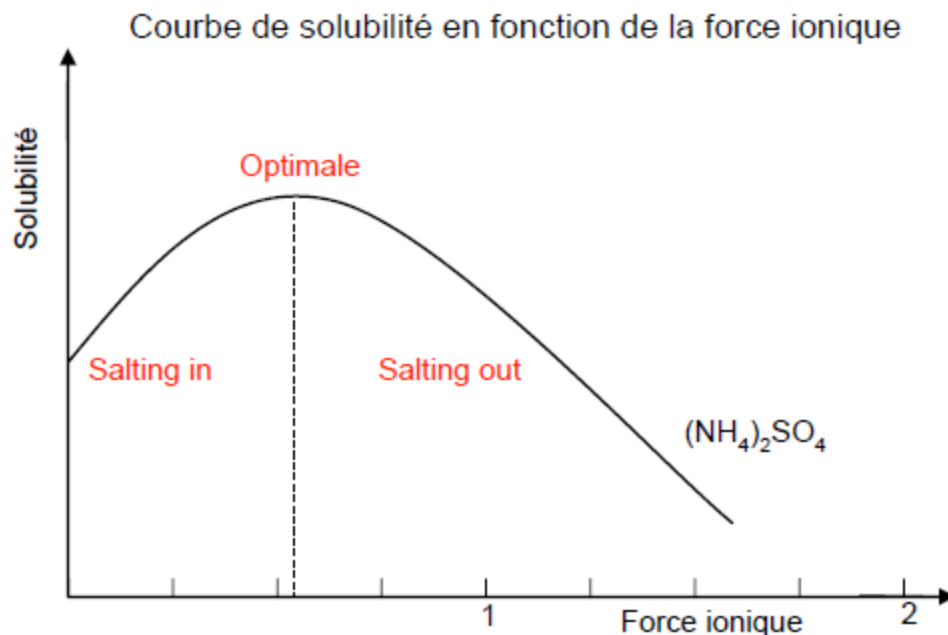
Pour des forces ioniques élevées, la solubilité des protéines diminue: **Salting out**

Protéines s'agrègent par interactions hydrophobes.

L'eau est insuffisante pour hydrater aussi les protéines, qui sortent donc de solution et précipitent.

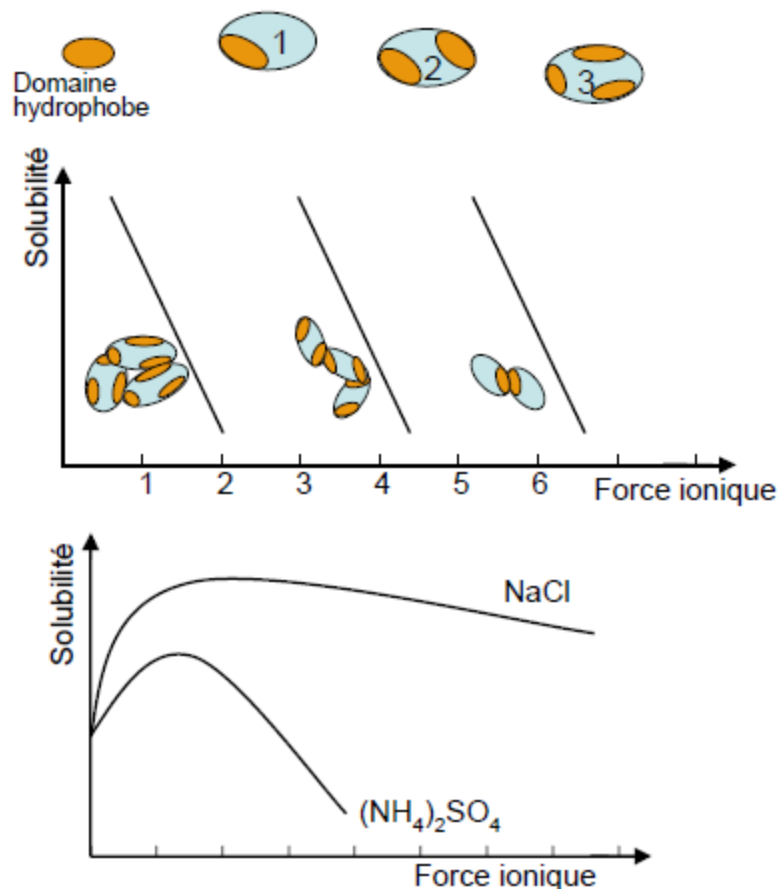


Effet des sels sur la solubilité des protéines



La série de Hofmeister ci-dessous décrit les effets relatifs de différents ions sur la précipitation des protéines ou la promotion de leurs interactions hydrophobiques.

précipitation	$\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^-$	chaotropique
(salting out)	$\text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$	(salting in)



La solubilité d'une protéine en solution aqueuse est fonction de la concentration en sels dissous.

La solubilité de différentes protéines à même force ionique dépend de l'hydrophobicité de chaque protéine.

Accroissement de la force ionique détermine un ordre de précipitation

Le salting out est à la base de la précipitation fractionnée des protéines. Etape grossière de purification qui peut éliminer jusqu'à 50-70% des contaminants. Le sulfate d'ammonium, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, est le sel le plus utilisé.

Première étape
Purifier et concentrer l'échantillon
Pas dénaturante

En effet, les ions qui diminuent la solubilité des protéines stabilisent leur structure native.

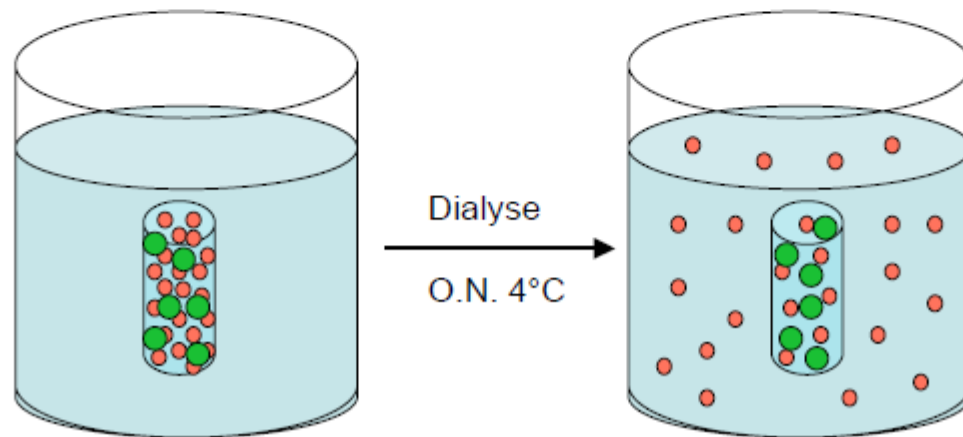
Étapes initiales : centrifugation, précipitation aux sels, dialyse et ultrafiltration

Dialyse

La dialyse permet de séparer les molécules selon leur taille, en utilisant des membranes semi-perméables dont les pores ont une taille bien définie, inférieure aux poids moléculaire des macromolécules que on veut garder. Ce poids est le poids moléculaire d'exclusion (molecular weight cut off - MWCO).

Cette technique est utilisée pour:

- dessaler un échantillon,
- changer le tampon de l'échantillon
- ou pour concentrer une solution macromoléculaire (polyéthylène glycol)

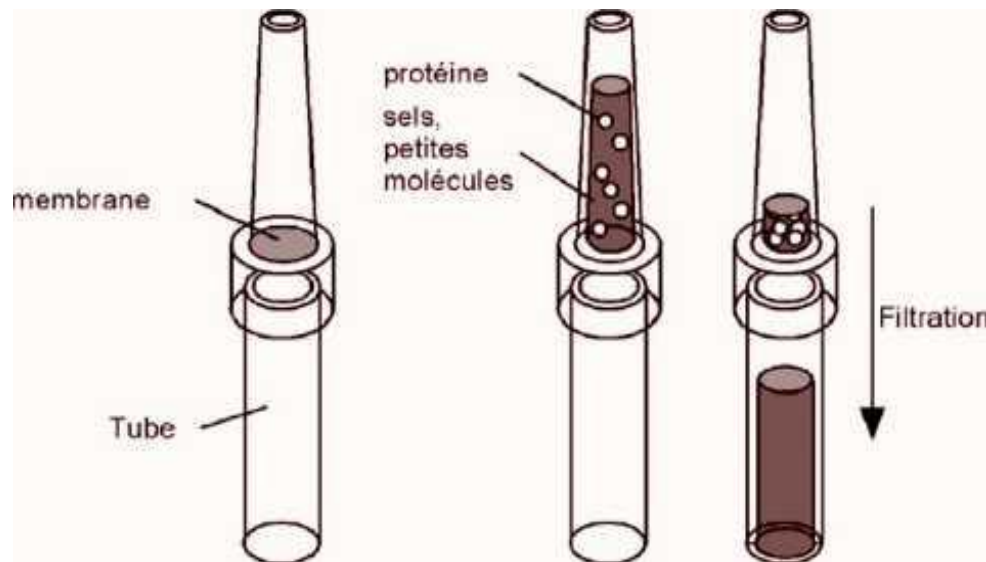


Étapes initiales : centrifugation, précipitation aux sels, dialyse et ultrafiltration

Procèdes membranaires : l'ultrafiltration

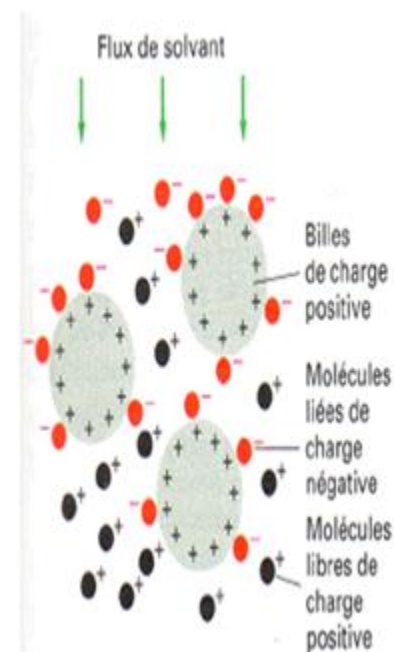
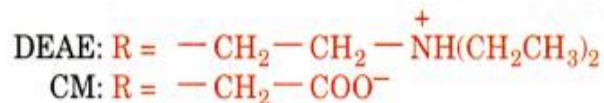
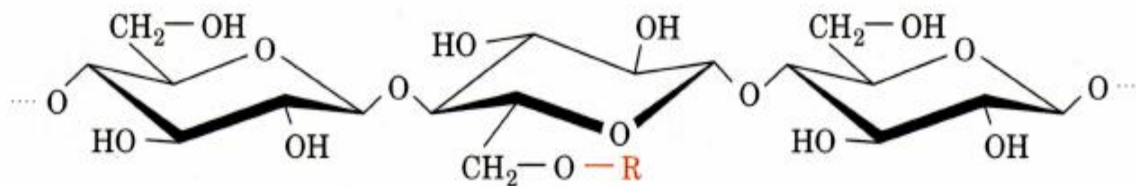
L'ultrafiltration (UF) est un procédé de séparation soluté /solvant.

La taille des molécules ou des groupes de molécules retenus par membrane d'UF va de 0,002 à 0,1 μm . Les constituants arrêtés peuvent être des bactéries, des macromolécules synthétiques ou naturelles, des agrégats moléculaires..



Chromatographie par échange d'ions

Dans le processus d'échange d'ions, les ions liés électrostatiquement à un support insoluble et chimiquement inerte sont remplacés de manière réversible par des ions en solution:



Echangeur d'anions = gel porteur de charges fixes positives

Echangeur de cations = gel porteur de charges fixes négatives

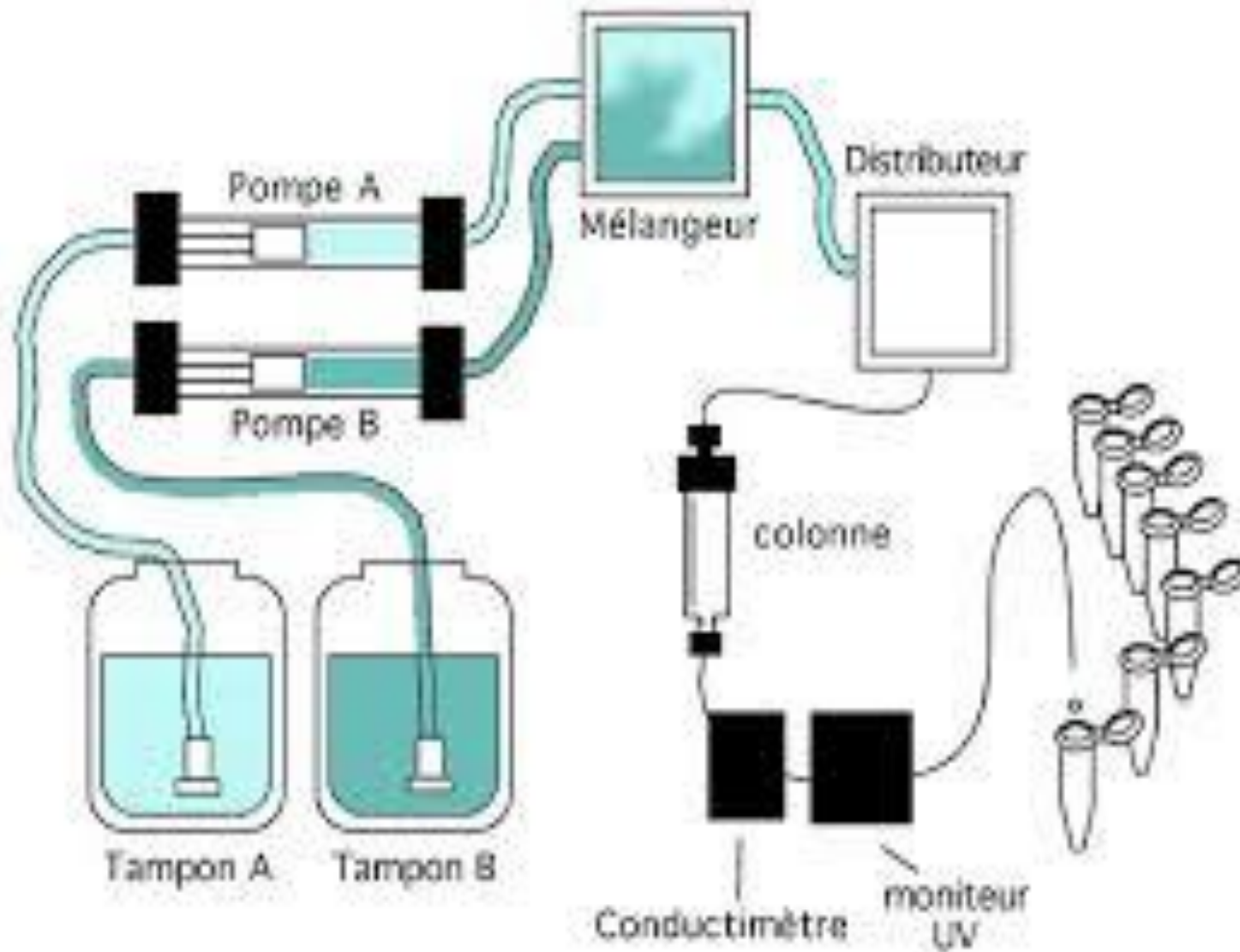
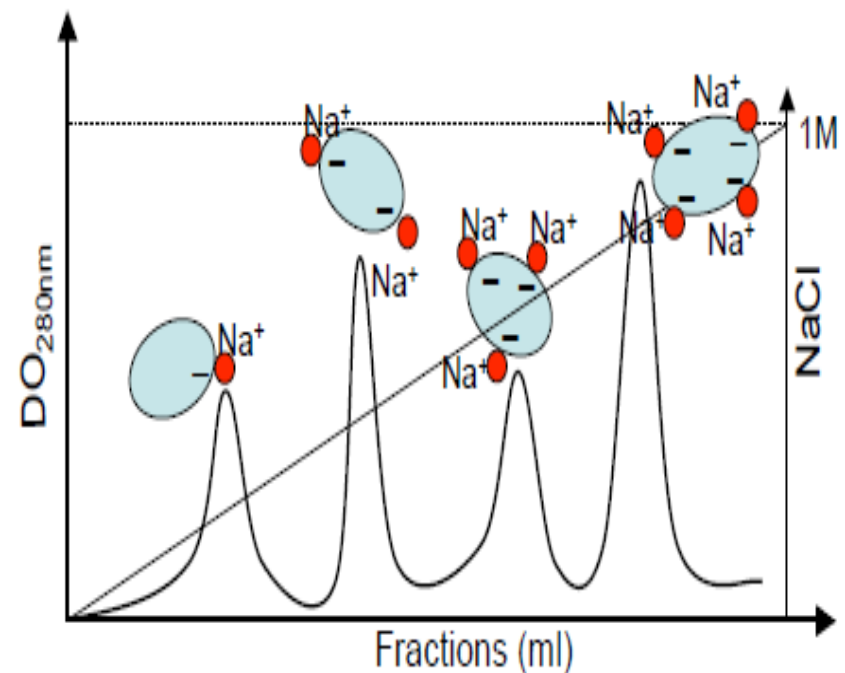
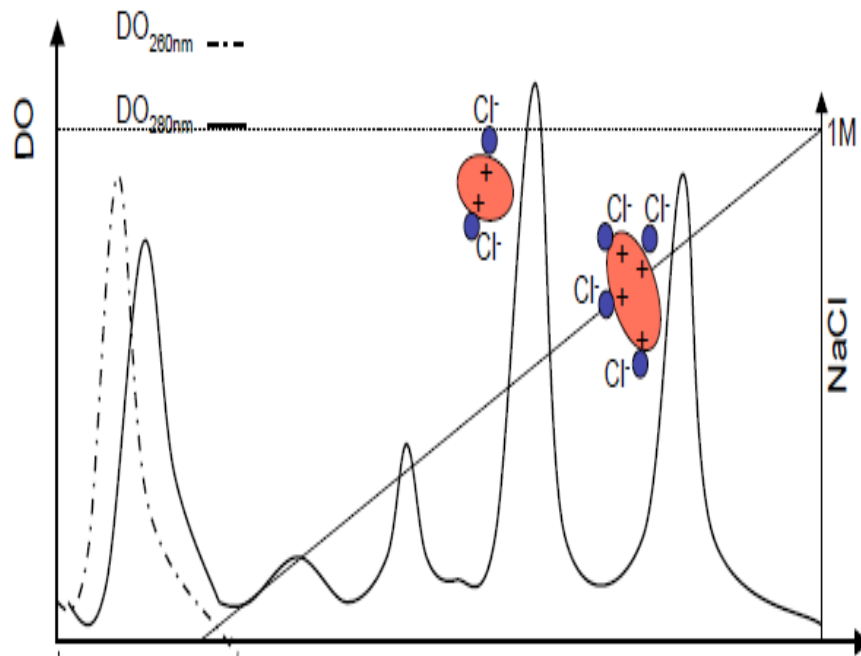


Schéma d'une chromatographie par échange d'ions



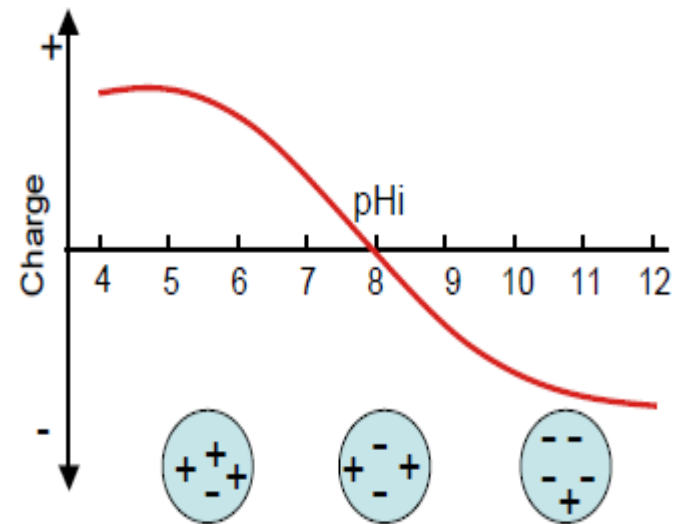
•Nombre de charge : peu chargées---> faiblement retenues---> élution à faible concentration de sels

très chargées---> fortement retenues---> élution à forte concentration de sels



une protéine présente ;

- une charge positive aux $\text{pH} < \text{pI}$
- une charge négative aux $\text{pH} > \text{pI}$

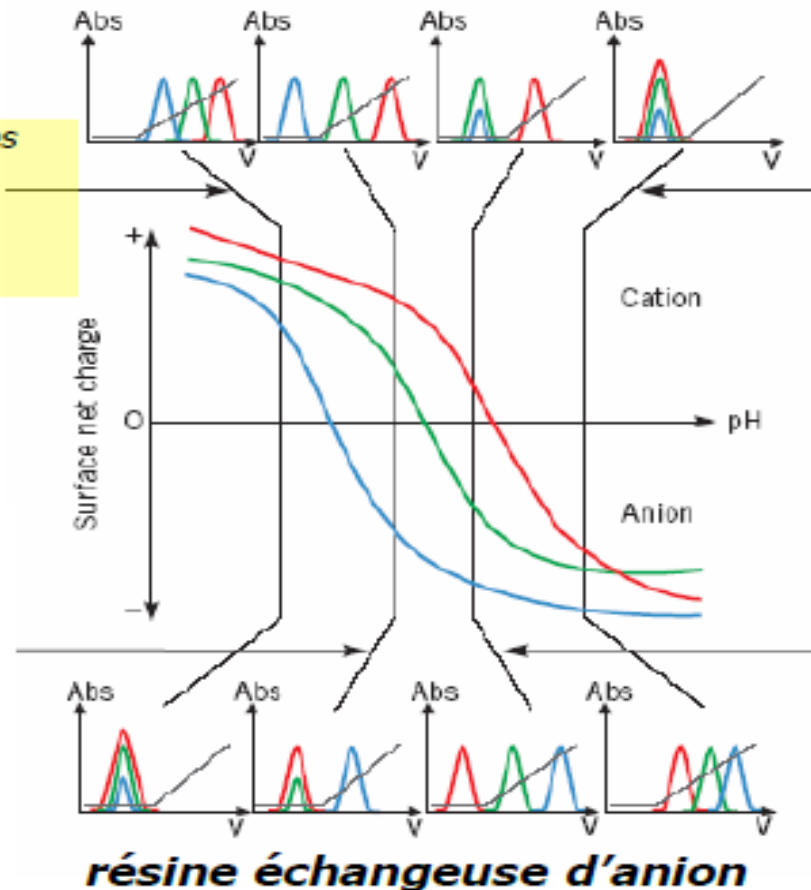


Sélection du pH et ordre d'élution

résine échangeuse de cation

pH acide inférieur aux pI des protéines, interactions préférentielles avec résine échangeuse de cation

pH moins acide. Une protéine négativement chargée (bleu) interagit avec la résine anionique et peut être séparée des autres. Alternativement les autres protéines peuvent être séparées avec une résine anionique, alors que la protéine en bleu n'est pas retenue.



pH basique supérieur aux pI des protéines, interactions préférentielles avec résine échangeuse d'anion.

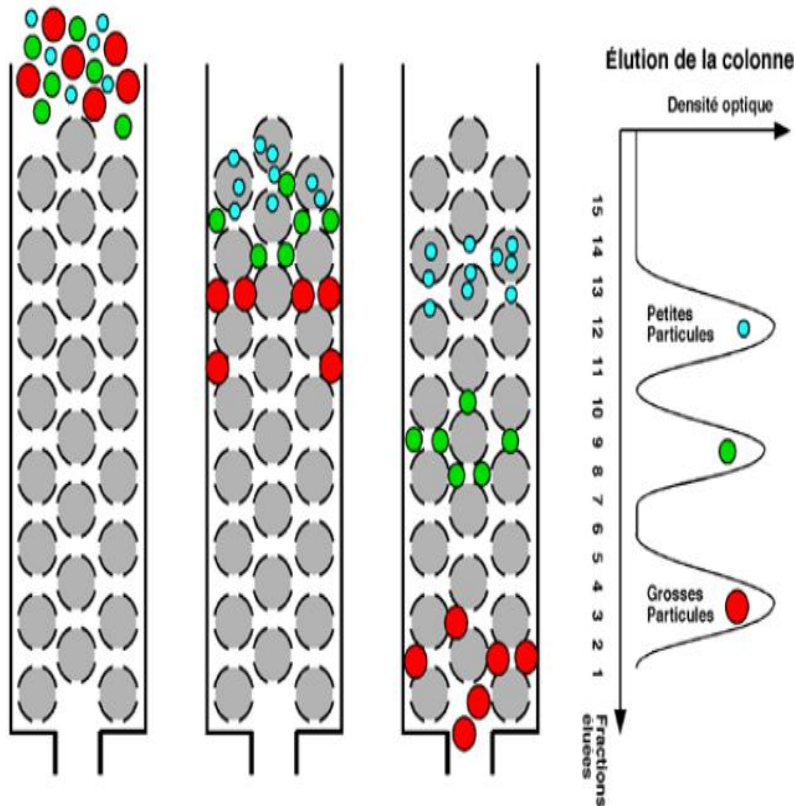
pH moins basique. Une protéine positivement chargée (rouge) interagit avec la résine cationique et peut être séparée des autres. Alternativement les autres protéines peuvent être séparées avec une résine anionique, alors que la protéine en rouge n'est pas retenue.

Chromatographie par d'exclusion moléculaire

Dans la chromatographie par filtration sur gel, appelée également chromatographie par exclusion ou par tamisage moléculaire, les protéines sont séparées selon leur taille et leur forme.

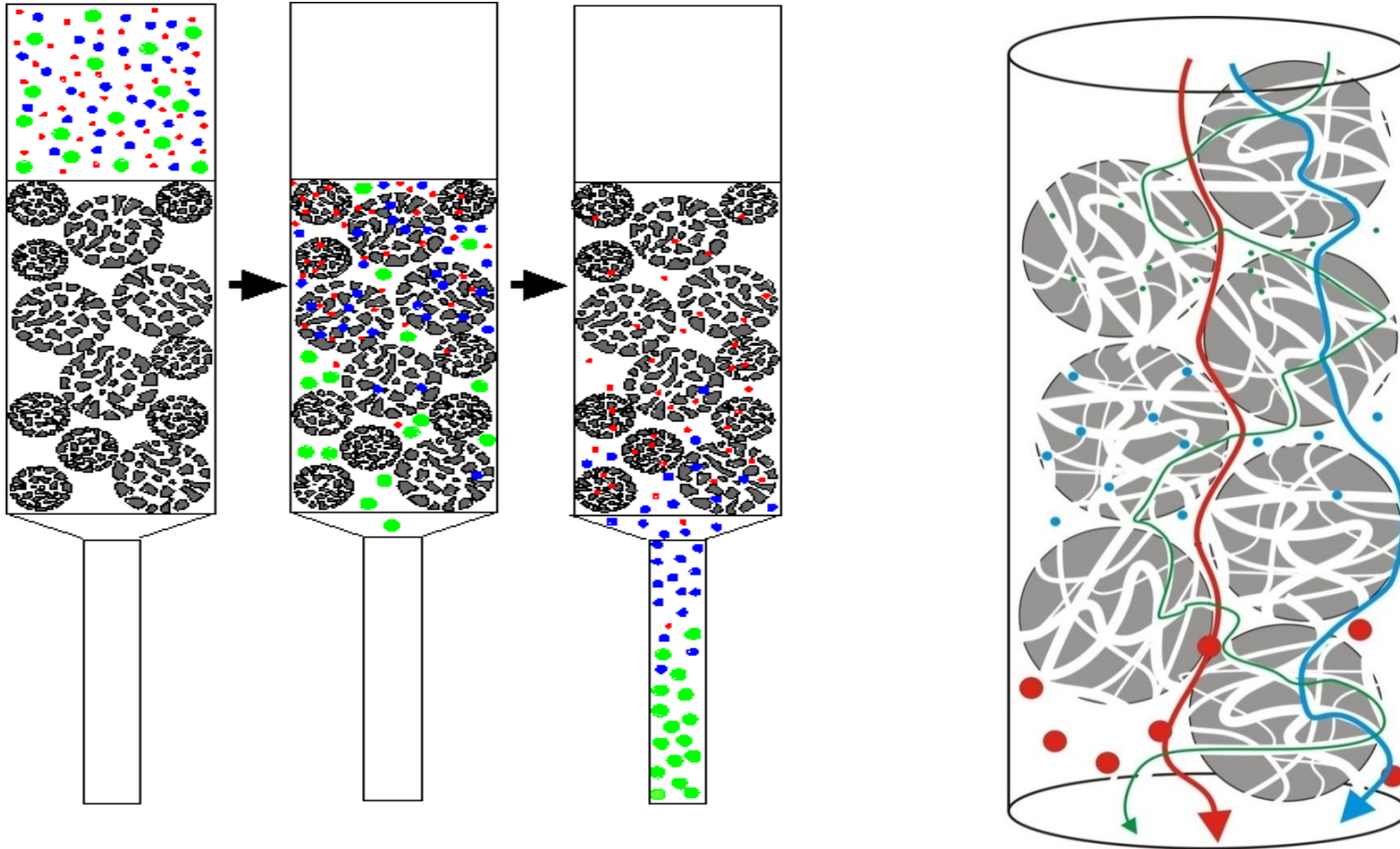
La plupart des gels sont constitués de dextran (Sephadex), d'agarose ou de polyacrylamide.

La filtration sur gel est souvent utilisée pour "dessaler" une solution protéique.



L'ordre d'élution est inversement proportionnel à la masse moléculaire.

- 1 : Dépôt d'un mélange de deux molécules (des grosses et des petites) sur une colonne remplie de phase stationnaire.
- 2 : Les petites molécules peuvent pénétrer dans les billes du gel car leur diamètre est inférieur à celui des pores du gel. Les grosses molécules ne le peuvent pas en raison de leur grande taille; elles sont donc exclues du gel (d'où le nom de chromatographie d'exclusion).
- 3 : Les grosses molécules ont donc un trajet plus court à parcourir pour arriver en bas de la colonne; elles sont donc éluées les premières.
- 4 : Les petites molécules sont éluées ensuite car elles ont une plus grande distance à parcourir pour arriver en bas de la colonne.



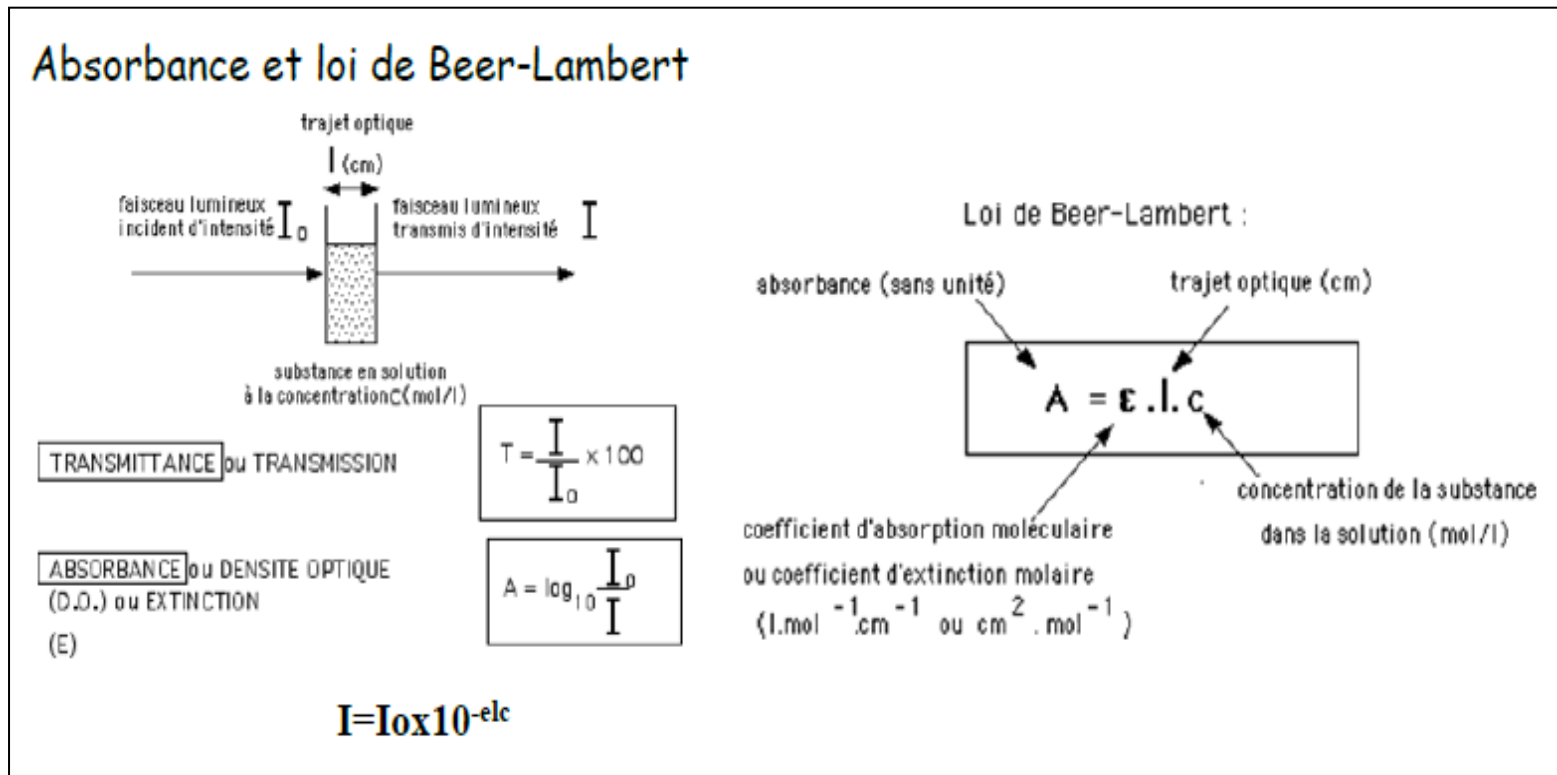
Représentation schématisée du passage de la phase mobile à travers la phase stationnaire en chromatographie d'exclusion : les lignes fléchées en **rouge**, **bleu** et **vert** représentent le parcours des molécules de grosse, moyenne et petite taille, respectivement à travers la phase stationnaire.



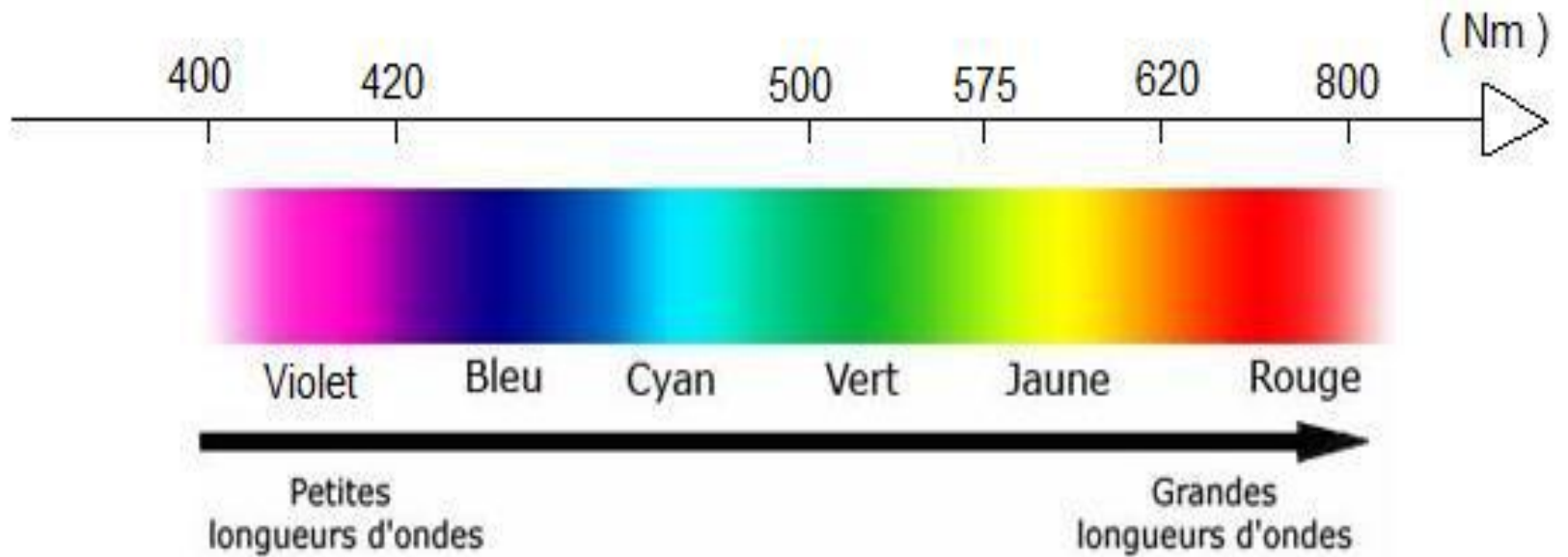
Différentes étapes de l'analyse protéomique

II. Dosage des protéines

Spectrophotométrie ou spectrométrie optique: méthode d'analyse physico-chimique qui permet de déterminer qualitativement et quantitativement des ions ou des molécules dans une solution. Basée sur la propriété des ions ou des molécules de pouvoir passer de l'état fondamental à un état excité par absorption d'un rayonnement de longueur d'onde adéquate.



Spectre de lumière blanche



Dosage par la méthode de Biuret

En milieu alcalin, les protéines qui possèdent au moins 2 liaisons peptidiques forment avec les ions cuivre II (Cu^{2+}) un complexe bleu-violet dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en protéines.

(absorbance à 540 nm)

Dosage de l'absorption à l'ultraviolet (UV)

Les acides aminés aromatiques absorbent la lumière dans l'UV. Le maximum d'absorption a lieu à 280 nm. En mesurant la D.O (densité optique), on peut calculer la concentration d'une protéine.

Dosage au bleu de coomassie (réactif Bradford)

Le colorant bleu de Coomassie G250 s'adsorbe sur les protéines (avec les acides aminés H K R et aromatiques Y W F) en milieu acide. Le colorant passe du rouge au bleu (absorbance à 595 nm)

Dosage par la méthode de LOWRY (LOWRY *et al*, 1951).

Le principe repose sur le développement d'une coloration bleue foncée suite à l'addition à la solution protéique d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu.

La coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungsto-molybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine. Les espèces réduites absorbent la lumière à 750nm.

La concentration en protéines de l'échantillon analysé est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie en employant une protéine de concentration connue.

Dosage par la Méthode à l'acide bicinchonique (BCA)

formation du complexe Cu^{2+} -protein en milieu alcalin suivie par la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^{1+} . Le taux de réduction est proportionnel au protéines présentes. Cys, cysteine, try, tyr et les liaisons peptidiques ont le pouvoir de réduire de Cu^{2+} en Cu^{1+} en milieu alcalin. Le BCA forme avec les ions Cu^{1+} , en milieu alcalin, un complexe pourpre, qui absorbe la lumière à 562nm.

III. Méthodes d'analyse des protéines : méthodes séparatives et d'identification

- Électrophorèse sur SDS-PAGE
- Électrophorèse bidimensionnelle
- Chromatographie HPLC
- Spectrométrie de masse

Electrophorèse

Principe

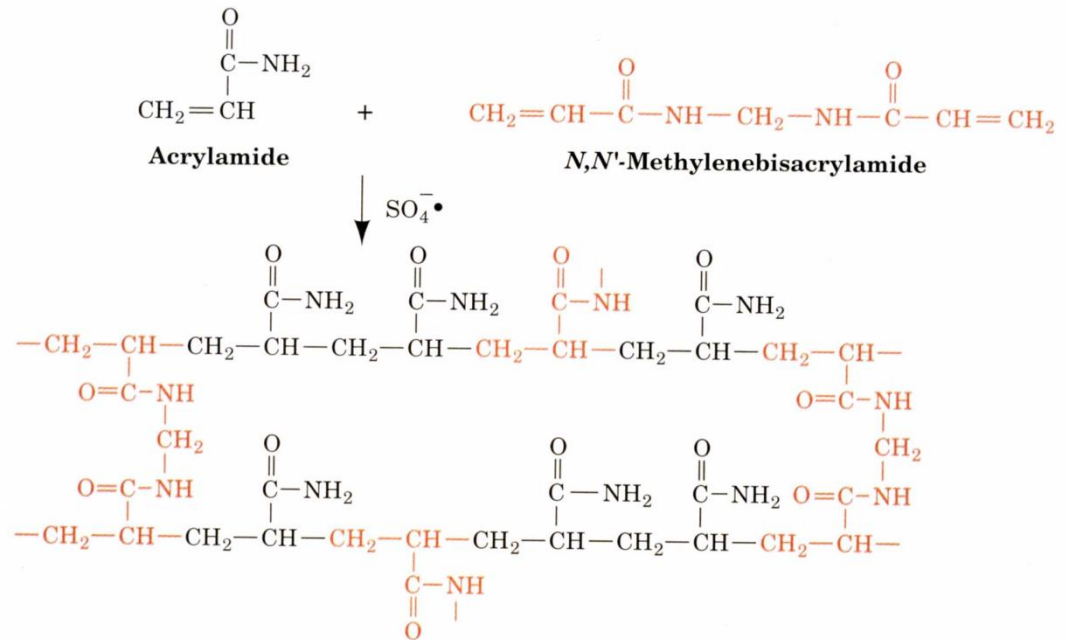
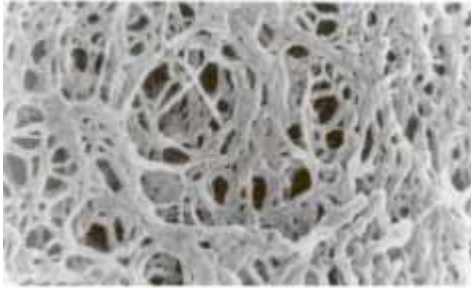
Séparation de solutés chargés par migration dans un champ électrique. La migration dépend de la charge de la protéine, de sa taille et du degré de réticulation du gel.

- l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS (SDS-PAGE) (ou l'électrophorèse en conditions dénaturante)

toutes les protéines sont chargées négativement, la vitesse de migration dépend du **PM uniquement**.

- Dans la focalisation isoélectrique la migration se fait selon le **point isoélectrique (PI)**.

l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS (SDS-PAGE) (ou l'électrophorèse en conditions dénaturante)



Réaction du polymérisation de l'acrylamide catalysée par le persulfate d'ammonium (APS) ; Générateur de radicaux libres et TEMED ; stabilisateurs des espèces radicalaires.

Un gel de polyacrylamide est caractérisé par :

$$T = \frac{a+b}{V} \times 100 (\%); \quad C = \frac{b}{a+b} \times 100 (\%),$$

T = concentration totale en acrylamide

C = facteur de réticulation (Crosslinker)

(a) Masse en acrylamide en gramme

(b) Masse en Bis en gramme

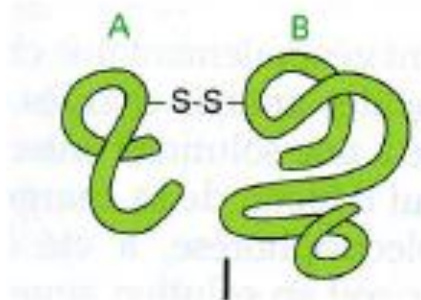
(V) Volume en mL

Sodium dodécyl sulfate ou SDS: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{O}-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$

Mercaptoéthanol: $\text{OH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$

Protéine native

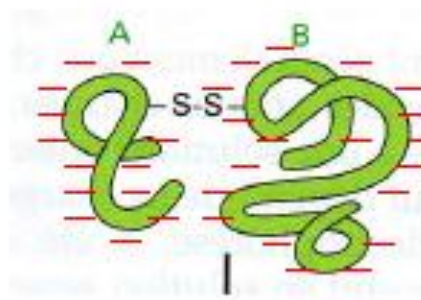
- SDS
- β -SH



**Charge
et masse**

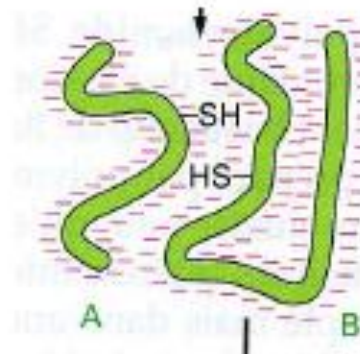
Protéine dénaturée

- + SDS
- β -SH

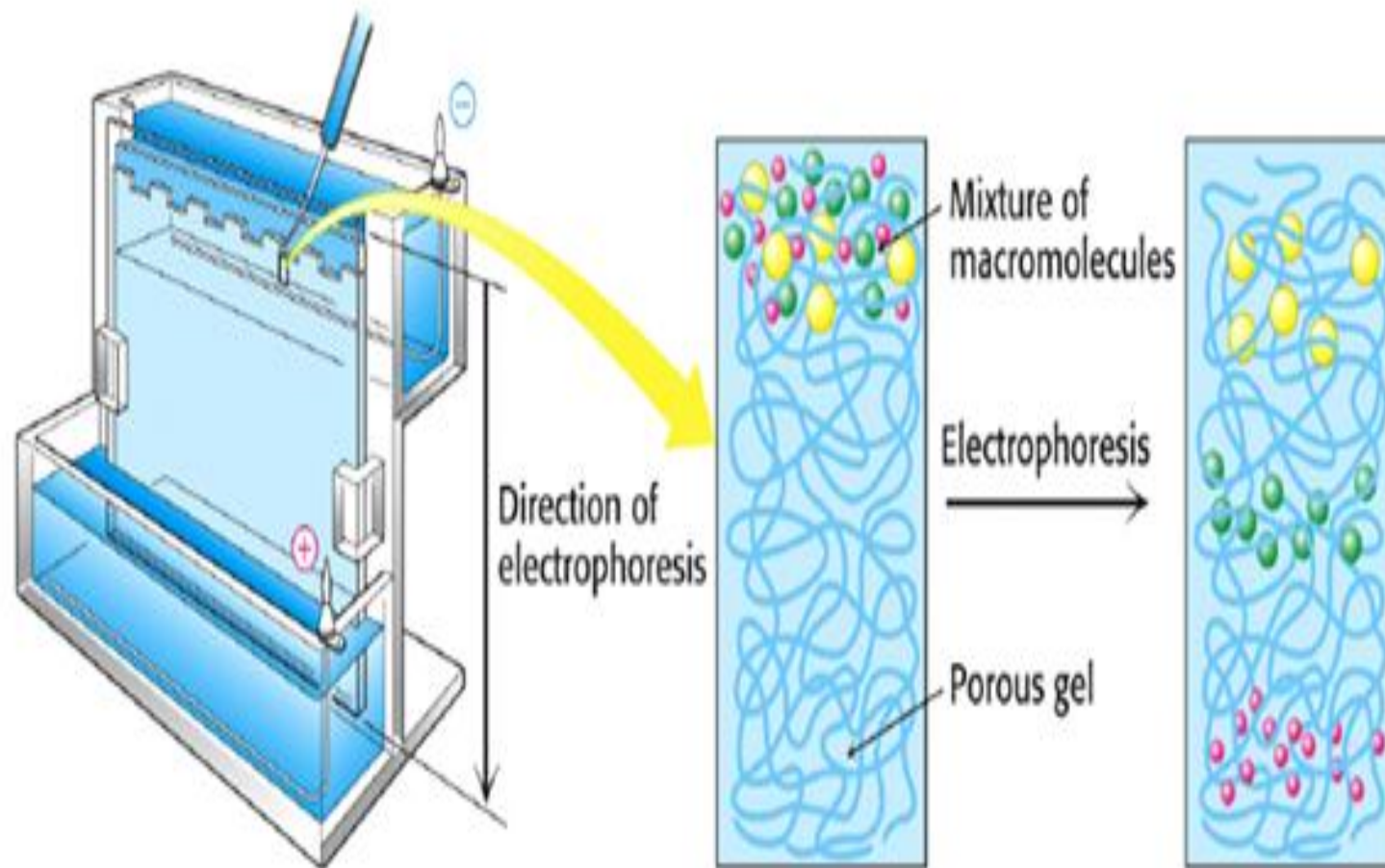


**Masse
globale**

- + SDS
- + β -SH



**Masse de
chaque chaîne**

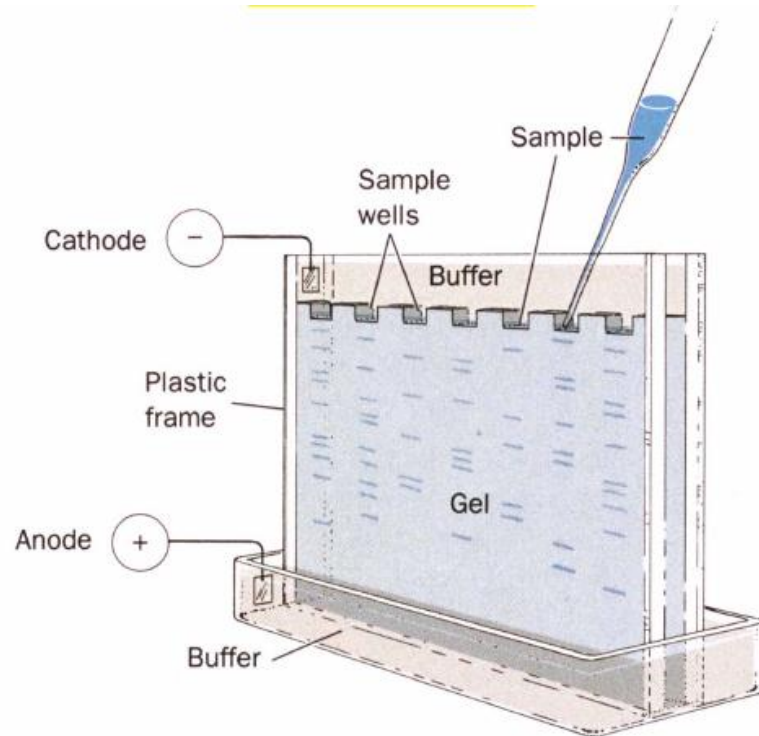


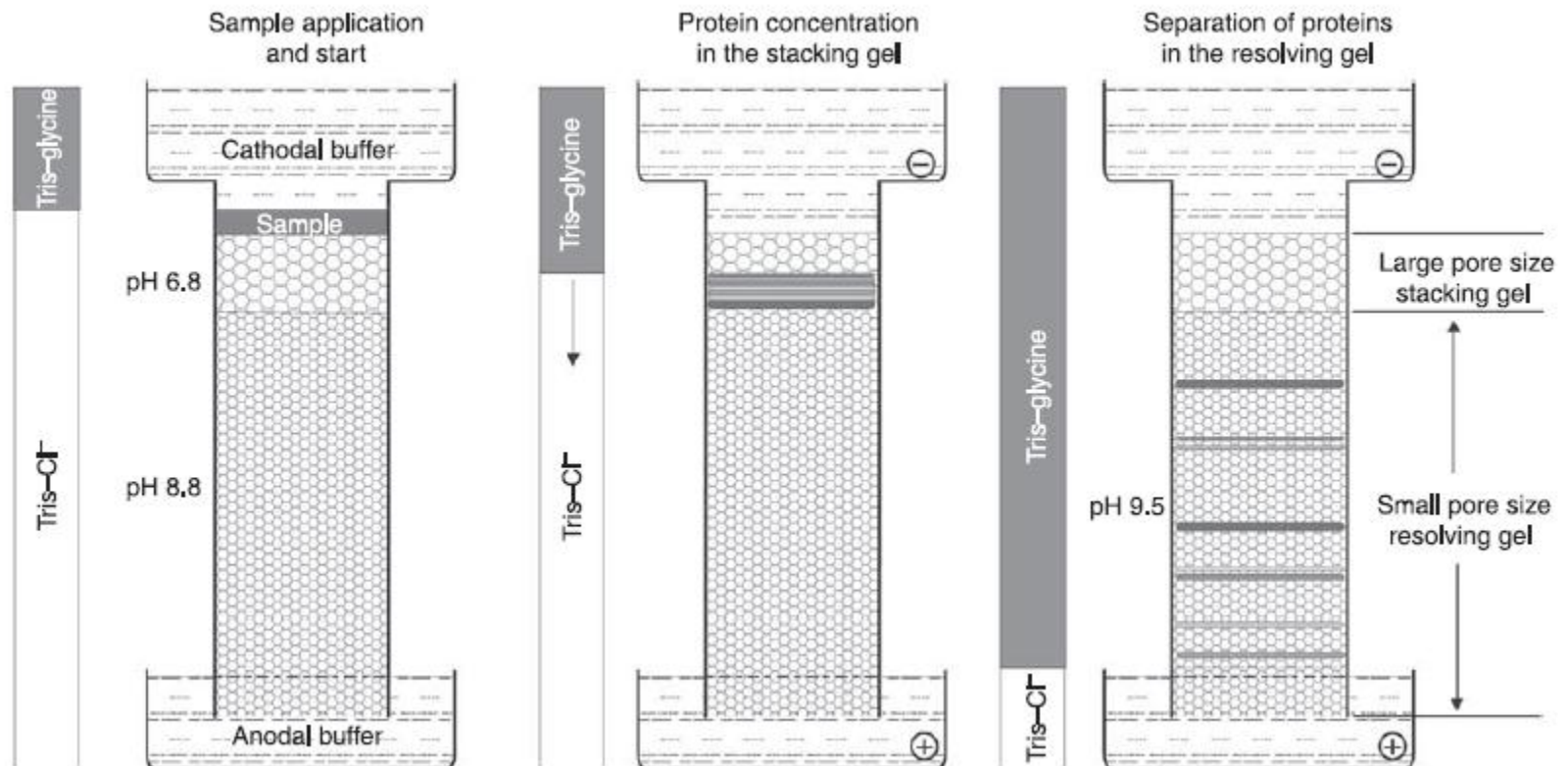
**1 gel de concentration
(STACKING)**

tampon Tris/HCl pH 6.8
Polyacrylamide 4% ou 7.5%

**1 gel de séparation
(MIGRATION ou RESOLVING)**

tampon Tris/HCl pH 8.8
Polyacrylamide de 8 à 16%
(selon la taille des protéines)



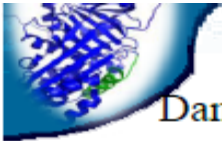


Lorsqu'on a appliqué le courant, les espèces négatives vont migrer vers l'anode (+)

le pI de la glycine 6.5:

Peu chargée dans le gel de concentration (pH 6.8)

Très chargée dans le gel de séparation (pH 8.8)



Dans le gel de concentration (Stacking)

Dans le gel de concentration (pH 6.8, acrylamide 4 – 7.5 %) , les espèces négatives sont:

Les ions chlorure (très mobile)

Les protéines (mobile, chargées négativement par le SDS)

La glycine faiblement chargée (peu mobile)

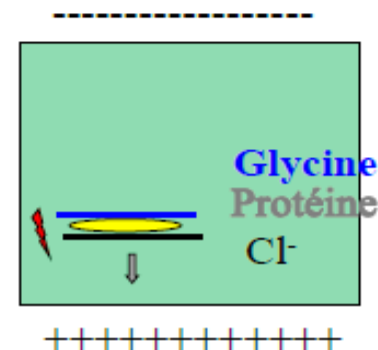
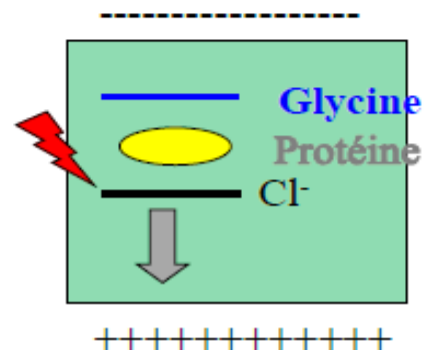
Les ions chlorure avance très rapidement.

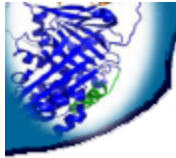
Derrière eux, on trouve une zone sans transporteur de charge. (**protéines**)

S'il y a peu de charge, il y a augmentation du potentiel électrique qui force la migration de la glycine et des protéines qui vont stacker au front de migration des ions chlorure.

On obtient ainsi de très fines bandes de protéines

Dans le stacking (gel de concentration)





Dans le gel de séparation (Resolving)

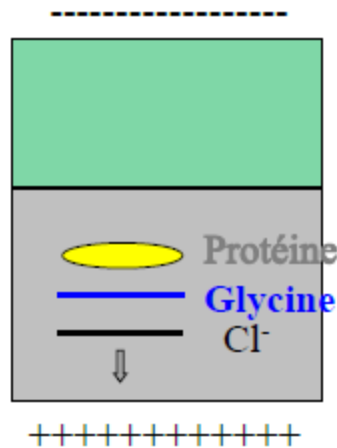
Lorsqu'on arrive dans le gel de séparation (pH 8.8 polyacrylamide 8-16%) les espèces négatives qui vont migrer sont:

Les ions chlorure (très mobile)

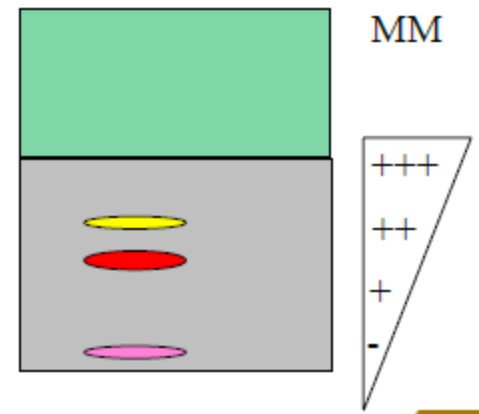
Les protéines (chargés par le SDS) sont ralenties (% acrylamide plus important)

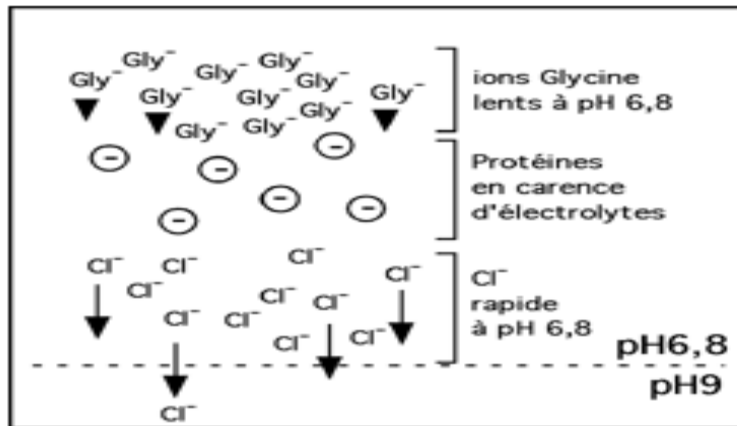
La glycine est chargée (très mobile)

Les protéines (**plus grosses**), sont maintenant les espèces les plus lentes.
La glycine passe devant les protéines

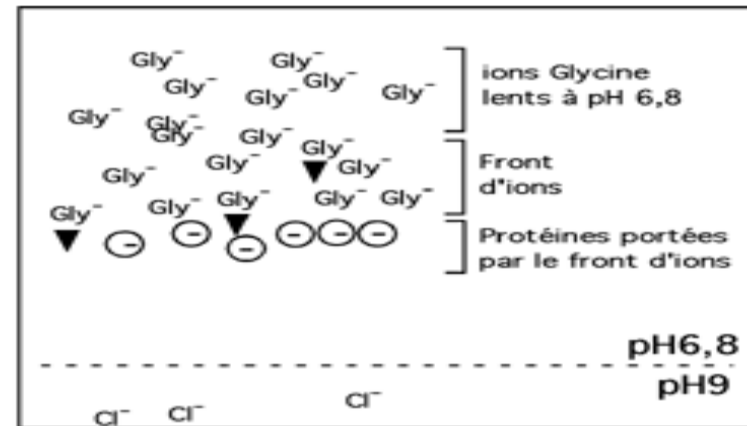


Les protéines arrivent en mêmes temps dans la gel de migration et restent sous formes de fine bandes.
La migration se fait principalement en fonction de leurs masse moléculaire

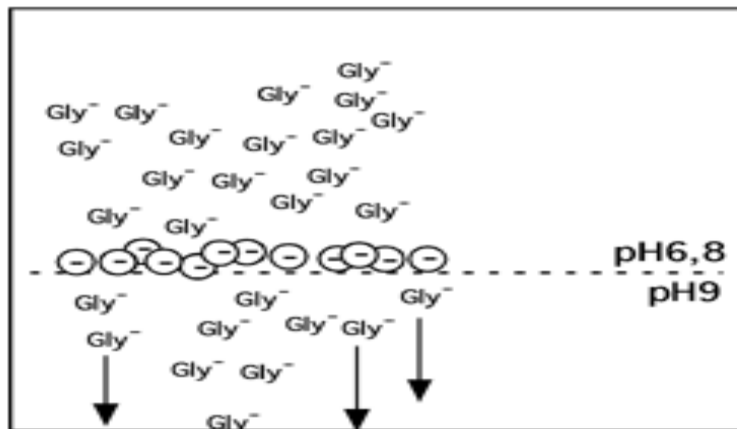




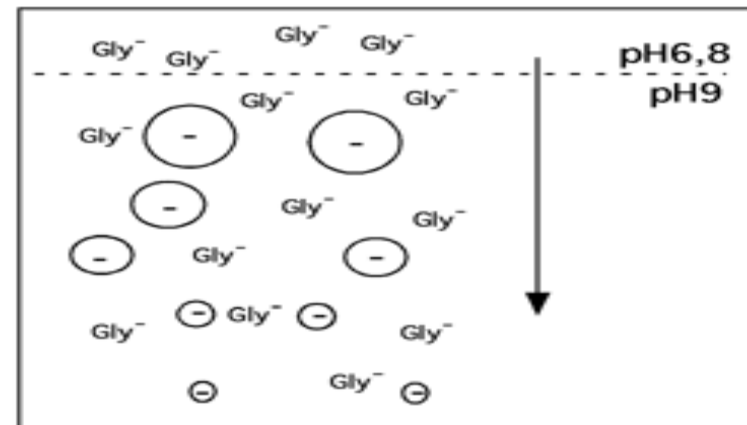
(A) Cl⁻ prend de l'avance et laisse un vide ionique dans lequel les protéines n'avancent plus guère.



(B) Les ions glycine avancent quand même un peu; leur front de migration portent les protéines pour lesquelles la glycine est le seul électrolyte disponible → concentration des protéines en une bande.



(C) À l'interface entre le gel de concentration et le gel de séparation, les ions glycine deviennent beaucoup plus mobiles et le front d'ions dépasse les protéines, maintenant concentrées en une bande.



(D) Les protéines ont maintenant assez d'électrolytes de part et d'autre pour se séparer selon leur poids moléculaire.

Exemple de profil électrophorétique : séparation des protéines de lactosérum camelin

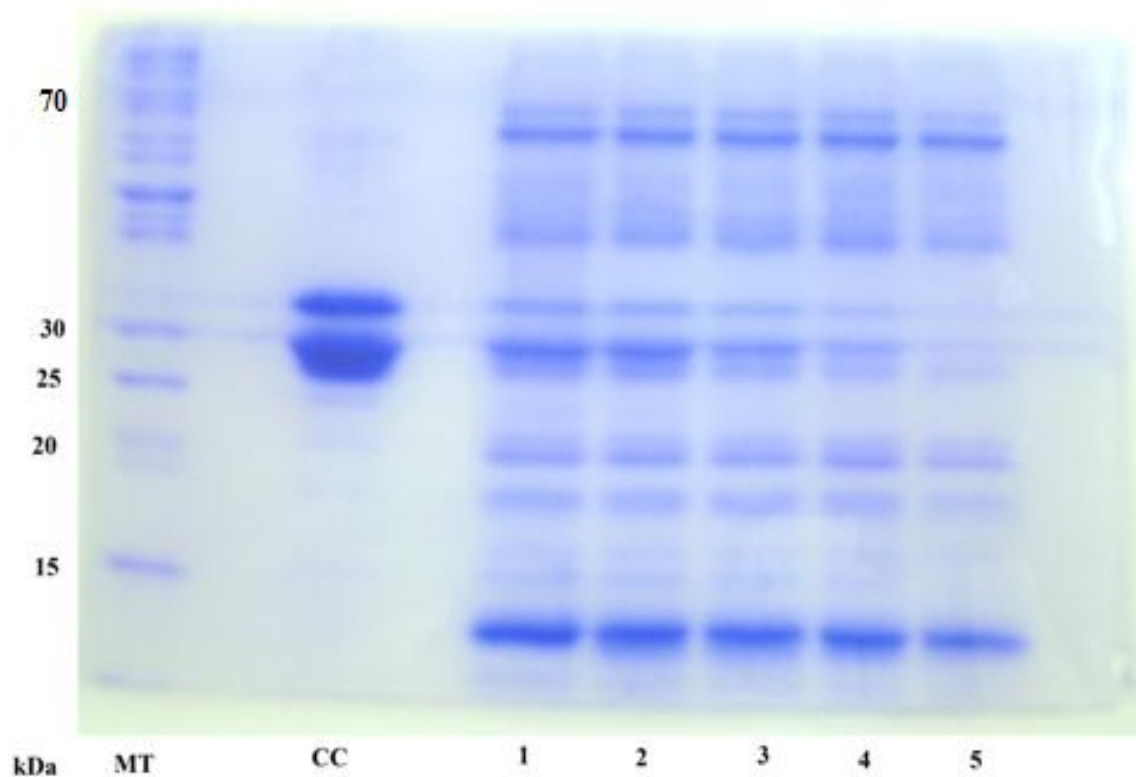


Figure 23. profil électrophorétique sur SDS-PAGE (à 15 % d'acrylamide) du lactosérum camelin obtenu à différents valeurs de pH de précipitation des caséines (MT : marqueur de taille, CC : caséine cameline, de 1 à 5 : échantillons de lactosérum à pH 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, et 4,3 à 30-35°C respectivement).

Exemple de profil électrophorétique : Comparaison des protéines du lait bovin et camelin.

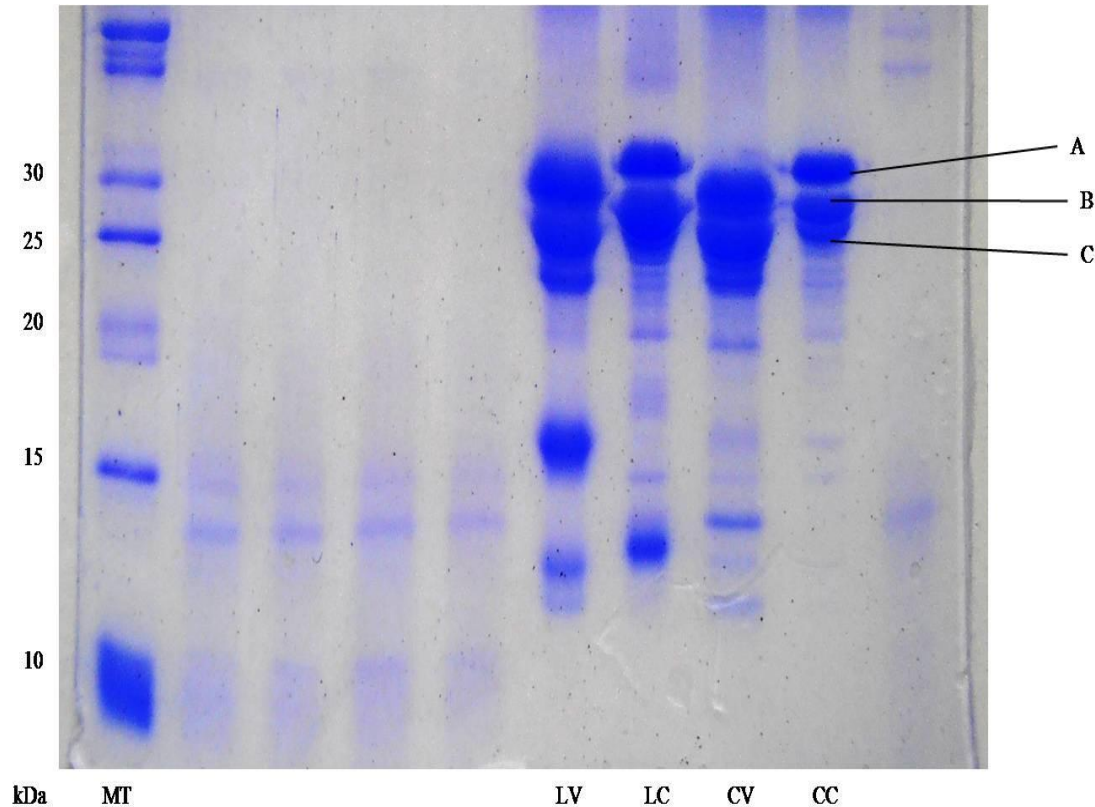
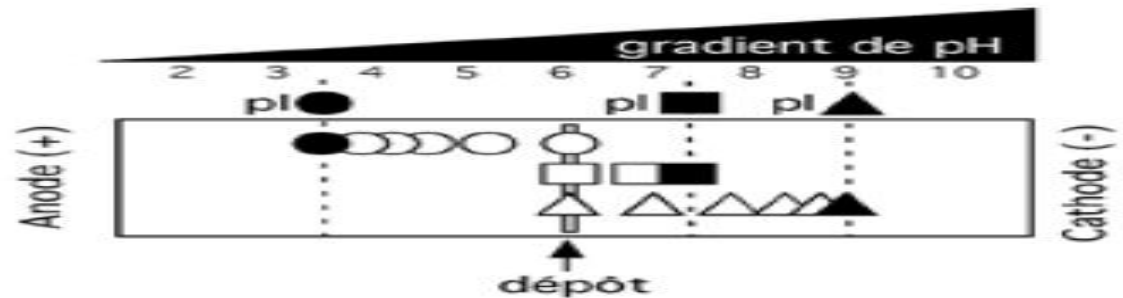


Figure 24. Profil électrophorétique sur SDS-PAGE (à 15%) d'échantillons de lait bovin et camelin et de caséines bovines et camelines. (MT : marqueur de taille, LV : lait de vache, LC : lait de chamelle, CB : caséine bovine, CC : caséine cameline).

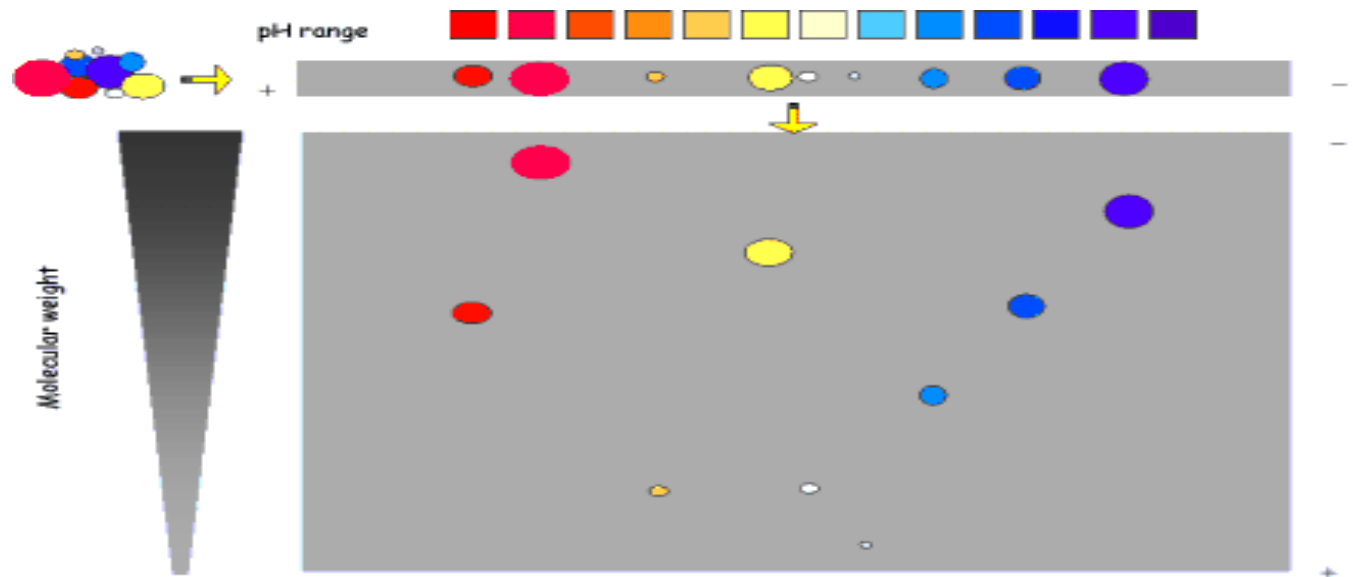
Électrophorèse bidimensionnelle (2DE)

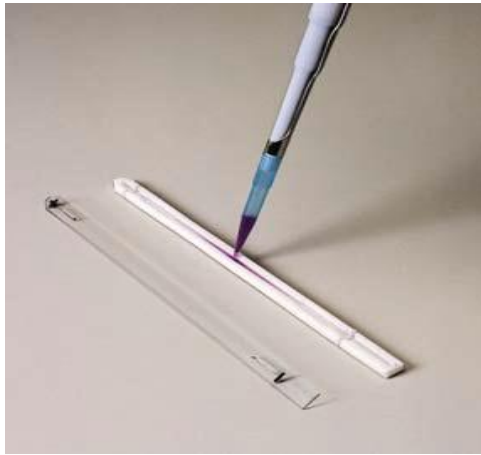
- Première séparation selon le point isoélectrique (p_i) : focalisation isoélectrique
- Deuxième séparation en fonction du poids moléculaire.

1^{ère} dimension



2^{ème} dimension

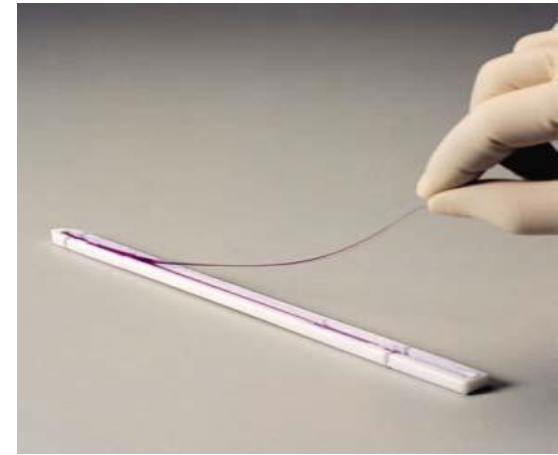




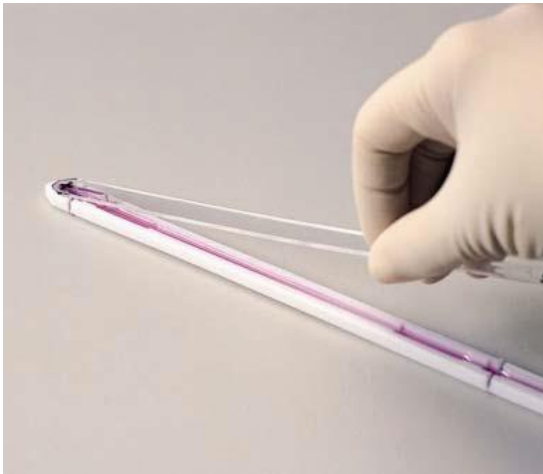
**Dépôt de l'échantillon
protéique**



**Enlever la protection du gel
avec gradient de pH immobilisé**



**Placer le « strip » au contact
de l'échantillon**



Couvrir le « strip »



Placer la solution de migration

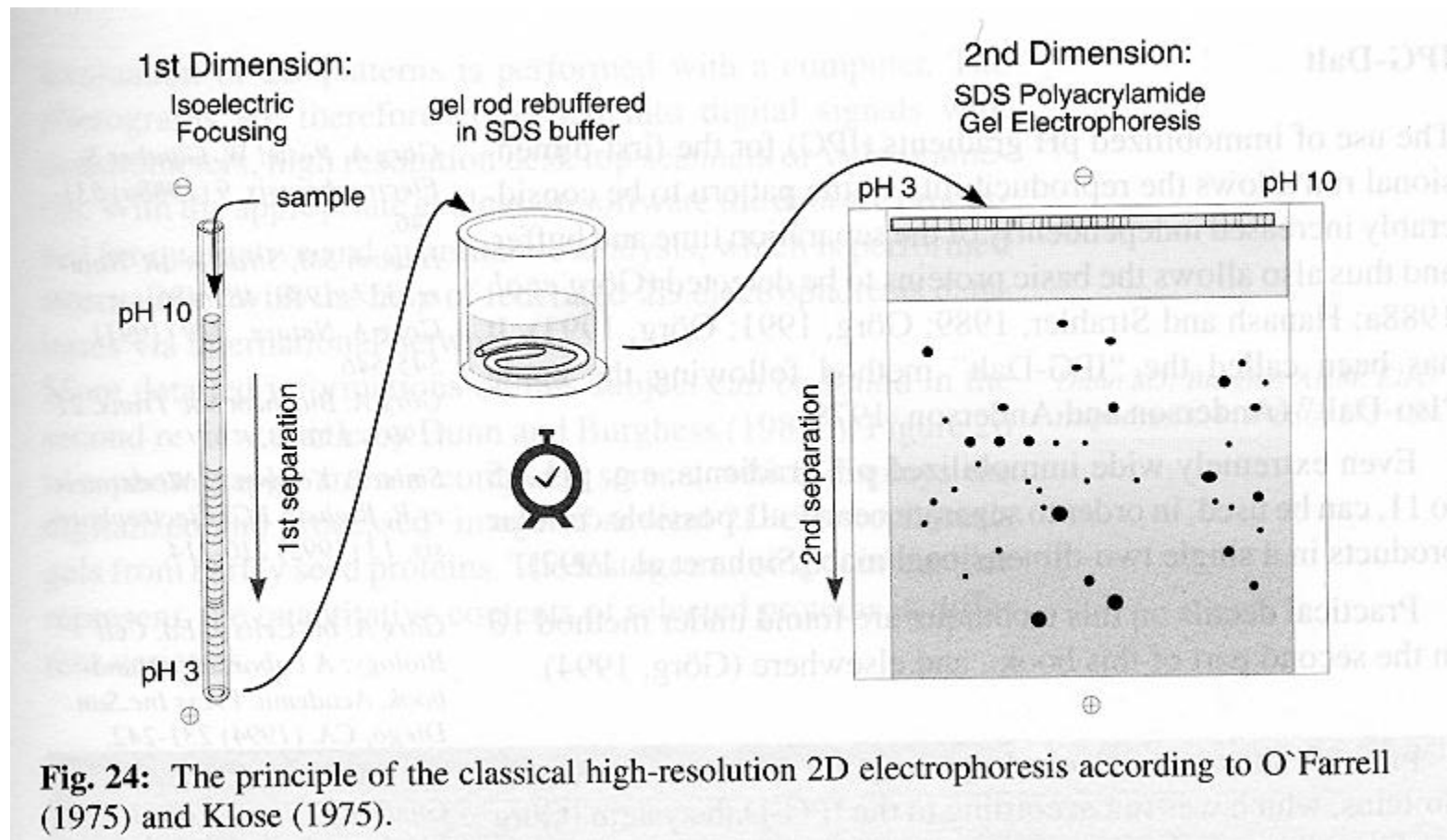
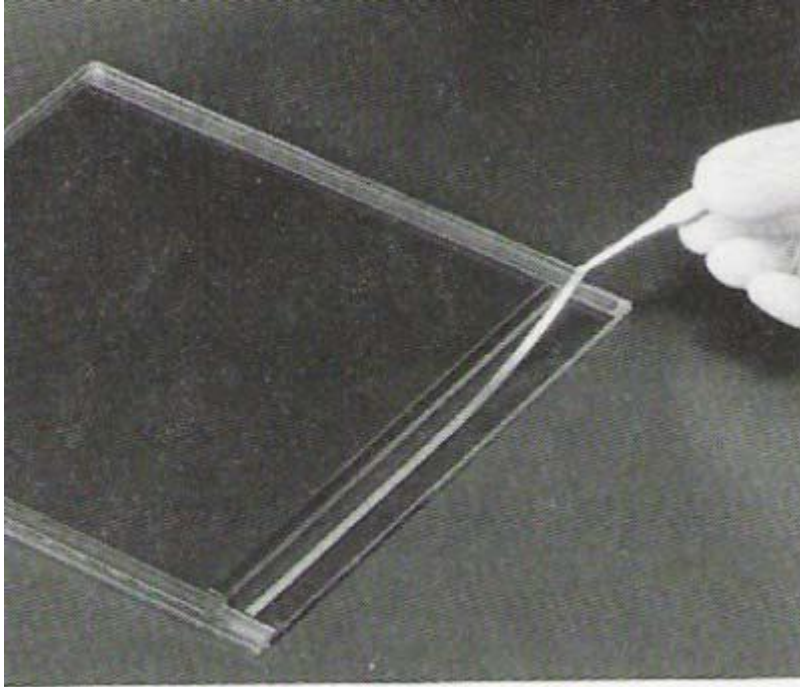


Fig. 24: The principle of the classical high-resolution 2D electrophoresis according to O'Farrell (1975) and Klose (1975).



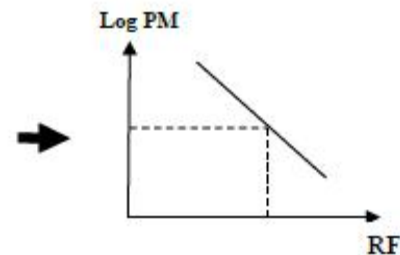
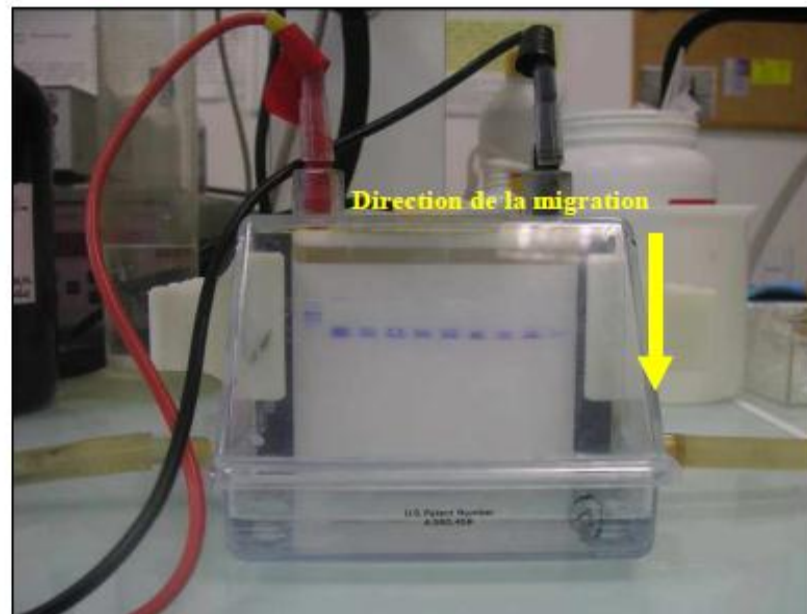
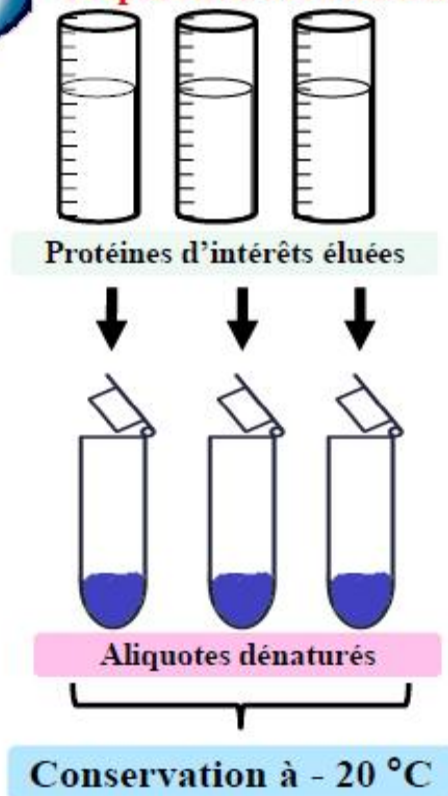
Le « strip » de gradient de pH est placé en haut du gel SDS-PAGE

- Le SDS dénature les protéines et les charges négativement
- (migration seulement selon la masse), 2^{ème} dimension



Electrophorèse en conditions dénaturantes : SDS-PAGE

Préparation des échantillons et électrophorèse en SDS-PAGE (Laemmli, 1970)



Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse (RP-HPLC)

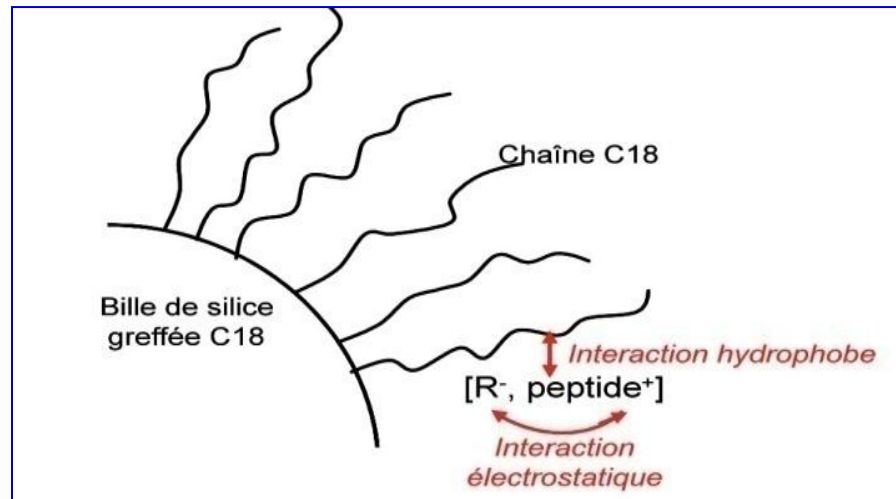
RP-HPLC : (de l'anglais Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography) est une technique qui permet la séparation des molécules en fonction de leur différence d'affinité pour une phase stationnaire apolaire et une phase mobile plus au moins polaire.

La phase mobile : mélange entre un solvant aqueux et organique.

Solvant Aqueux : Les acides carboxyliques perfluorés, l'acide trifluoroacétique (TFA) et heptafluorobutyrique (HFBA)

Solvant organique : L'acétonitrile et méthanol le plus souvent) en proportion variable.

La phase stationnaire : particules sphériques de silice poreuse greffées par des chaînes alkylées, aliphatique, (C4, C8 ou C18). qui confèrent à la phase stationnaire un caractère très hydrophobe



Quant la phase mobile est très polaire (donc peu hydrophobe), les molécules hydrophobes vont établir des **interactions hydrophobes** avec la phase stationnaire et ainsi être adsorbées.

La concentration en solvant organique dans la phase mobile est alors augmentée, graduellement, pour atteindre une hydrophobicité plus élevée que celle de la phase stationnaire provoquant la désorption et l'élution des molécules hydrophobes.

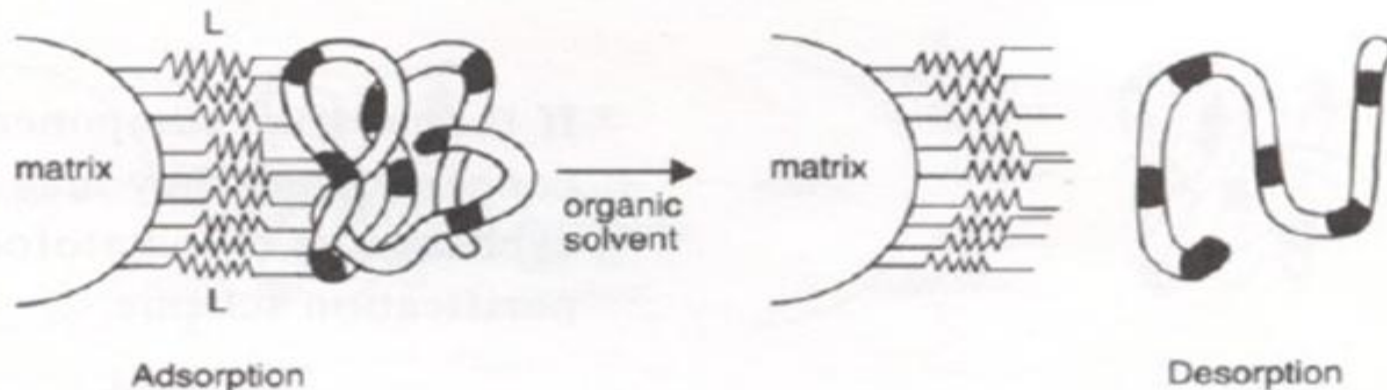
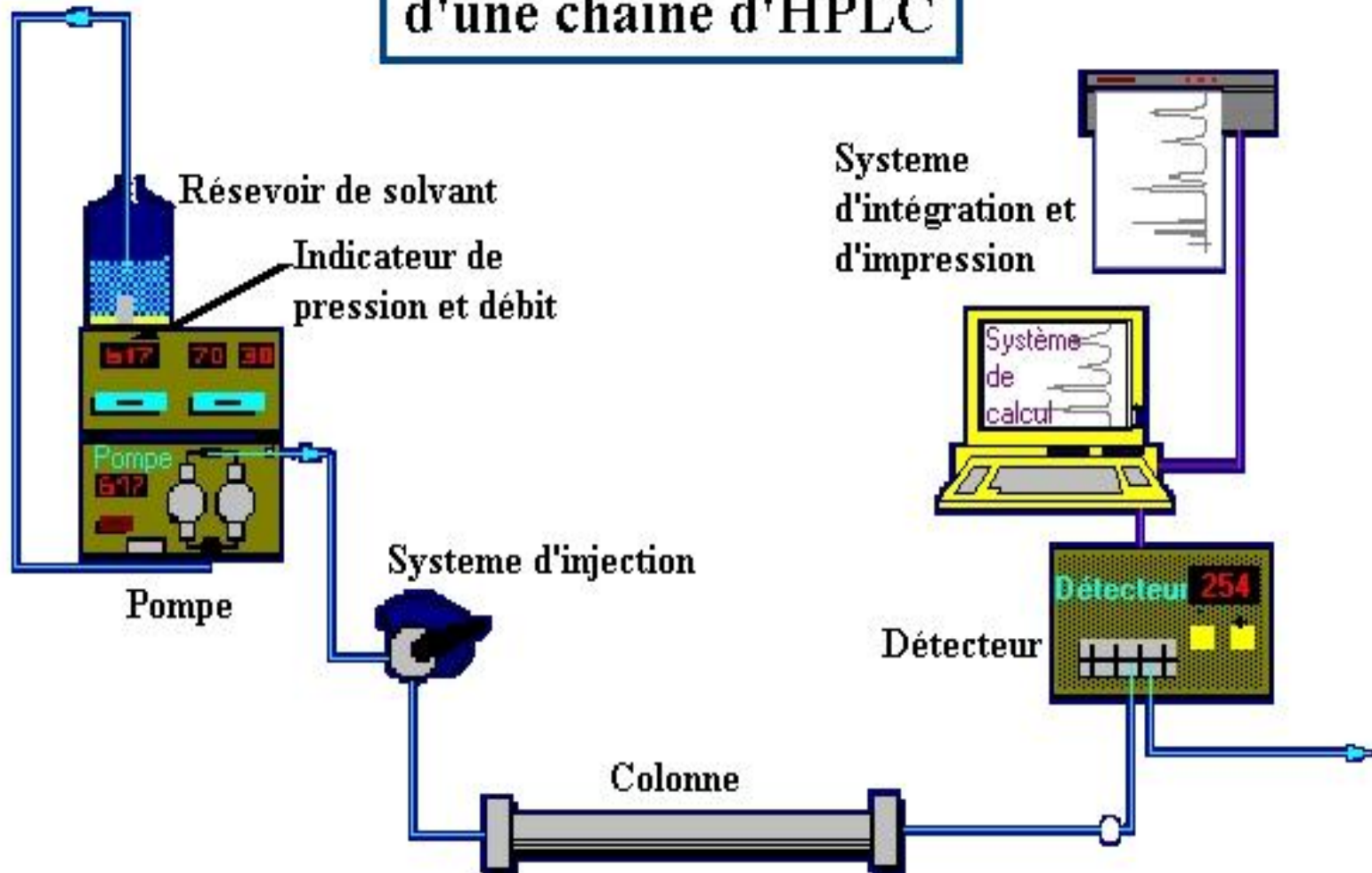
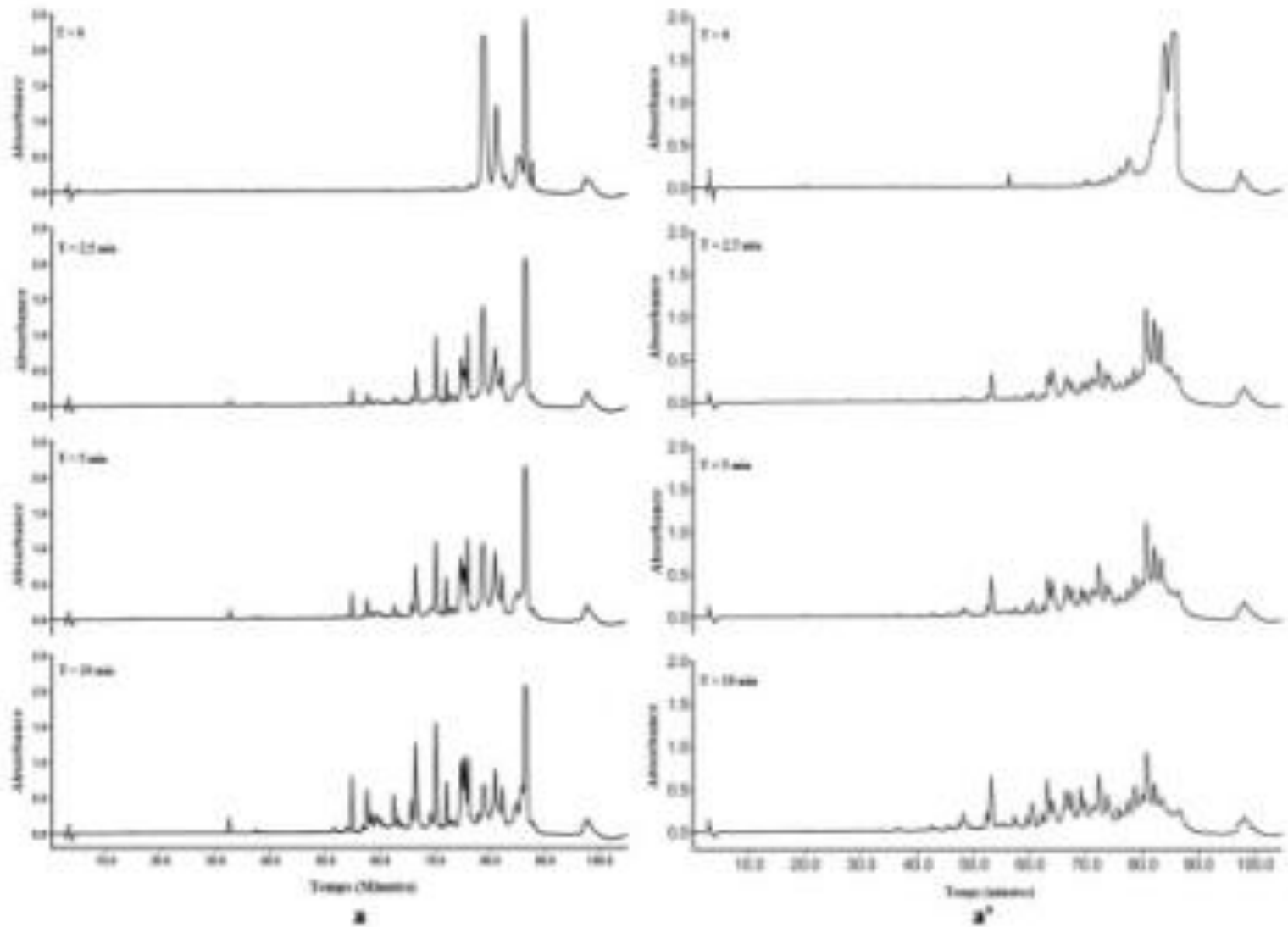


Schéma de principe d'une chaine d'HPLC





Exemple de profil chromatographique obtenu sur une HPLC en phase inverse.

Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une **méthode d'identification** de la matière qui repose sur la détermination **des masses atomiques ou moléculaires des espèces individuelles présentes dans un échantillon.**

Les appareils qui mettent en œuvre cette technique sont des spectromètres de masse. Ils se répartissent en 5 catégories distinctes suivant leur conception. Certains utilisent, après ionisation, des champs électriques et magnétiques, d'autres uniquement des champs électriques. Les appareils sont utilisés seuls ou, le plus souvent, en aval de techniques séparatives (e.g. chromatographie en phase gazeuse).

La technique est très répandue en raison de son couplage possible avec d'autres techniques (polyvalence) et de son extrême sensibilité.

Principe

La spectrométrie de masse (MS) est une méthode de mesure **des rapports masse sur charge (m/z)** de molécules individuelles et ionisées et de leurs produits de fragmentation.

Plusieurs informations sur le composé traité peuvent être obtenues :

- ✓ sa masse moléculaire ;
- ✓ La masse des fragments de ce composé ;
- ✓ une appréciation quantitative de ce composé.

Un spectromètre de masse mesure la masse de molécules isolées

Pour cela, le spectromètre de masse doit assurer les opérations suivantes :

1- Volatiliser

Séparer les molécules les unes des autres : on passe de l'état de matière condensée à un état gazeux.

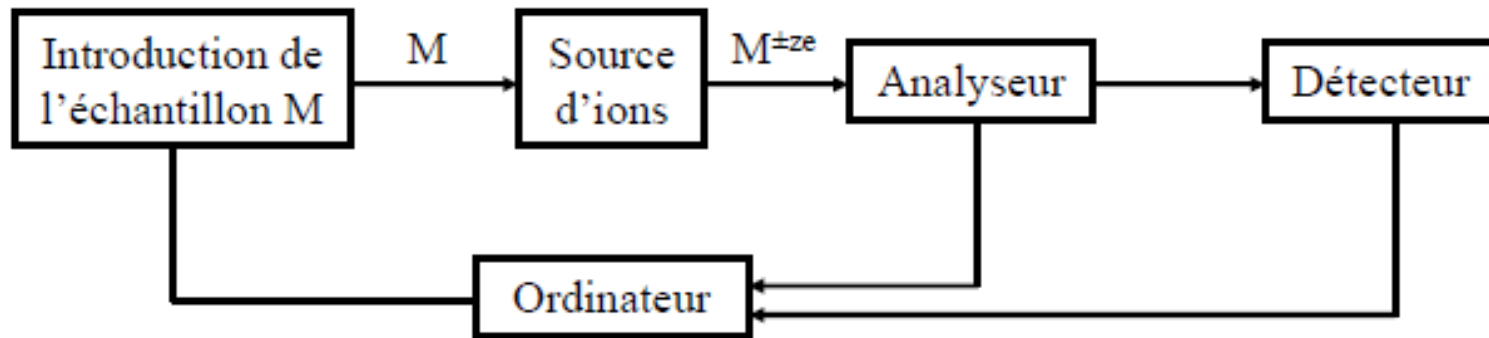
2- Ioniser

Transformer les molécules en ions, car un spectromètre de masse fonctionne grâce à des champs électriques.

3- Mesurer les rapports m/z

La masse moléculaire est calculée à partir du rapport masse (m)/charge (z).

Principales étapes de l'analyse spectrométrique



1. Faible quantité d'échantillon M introduit dans une → volatilisation puis ionisation
2. Accélération des ions formés sous l'action d'un champ électrique qui accroît leur énergie cinétique
3. Séparation des ions en fonction de leur rapport m/z en étudiant leurs trajectoires dans des champs électriques et magnétiques
4. Détection des ions en sortie du spectromètre de masse par un détecteur sensible aux charges électriques
5. Traitement du signal pour obtenir un spectre de masse

Plusieurs types de source d'ions , d'analyseurs et détecteurs sont disponibles

Sources d'ionisation

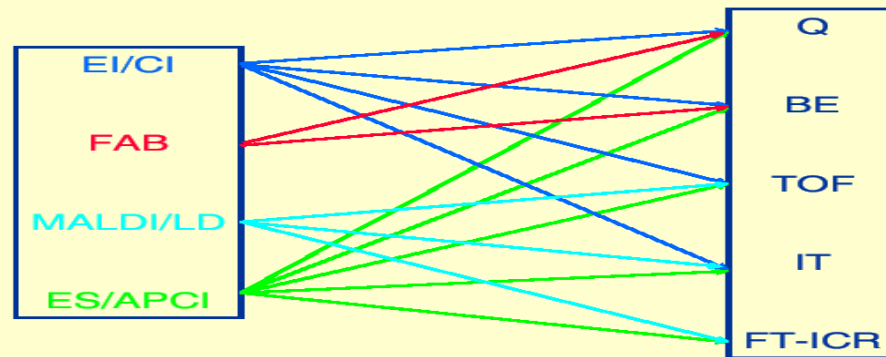
Ionisation EI (Electronical Impact)	} Petites molécules volatiles et non thermosensibles
Ionisation CI (Chemical Ionisation)	
Ionisation FAB (Fast Atom Bombardment)	} molécules < 6000 Da
Ionisation LSI (Liquid Secondary Ion)	
Ionisation LD (Laser Desorption)	
Ionisation ES (electrospray)	} Biomolécules (1-300 kDa) et complexes non-covalents
Ionisation MALDI (Matrix Assited Laser Desorption Ionisation)	

Analyseurs

Analyseurs	Résolution	Gamme m/z
Quadrupôle (Q)	2 000	8 000
Magnétique (EB)	20 000	20 000
Temps de vol (TOF)	20 000	500 000
Trappe ionique	5 000	6 000
Cyclotron à résonance des ions (FT-ICR)	1 000 000	4 000

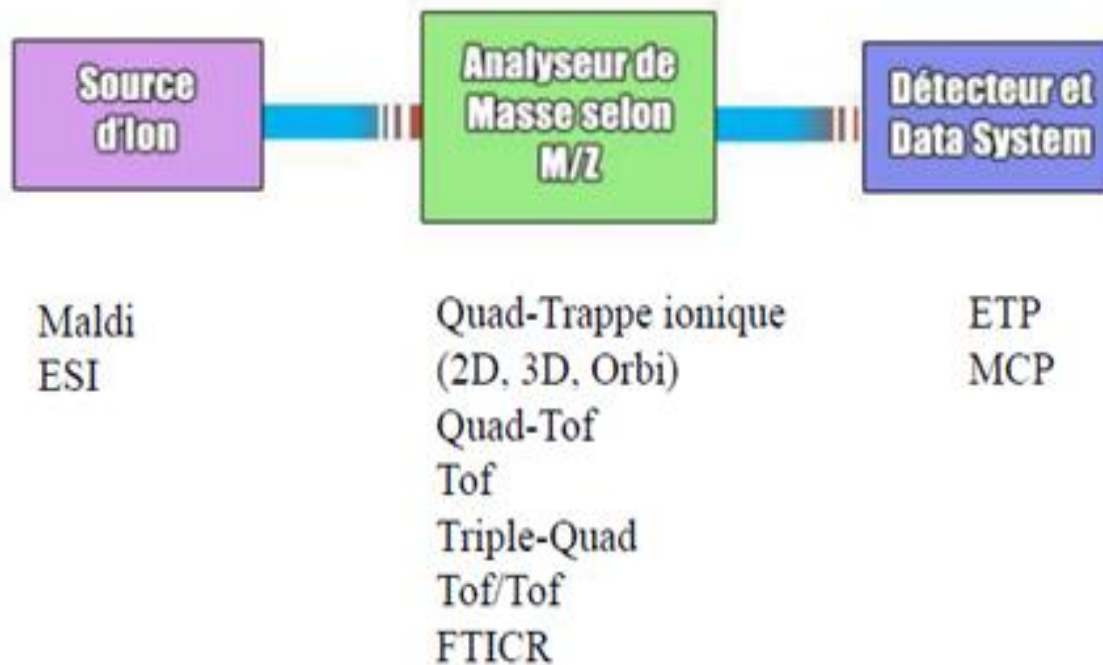
Les source d'ions , analyseurs et détecteurs existants peuvent être associés de manière différente et ainsi créer une grande variété d'appareil.

Spectromètres de masse commerciaux



un temps de vol est facilement compatible avec une source de type MALDI alors que les sources ESI sont compatible avec les analyseurs quadrupole et trappe ionique

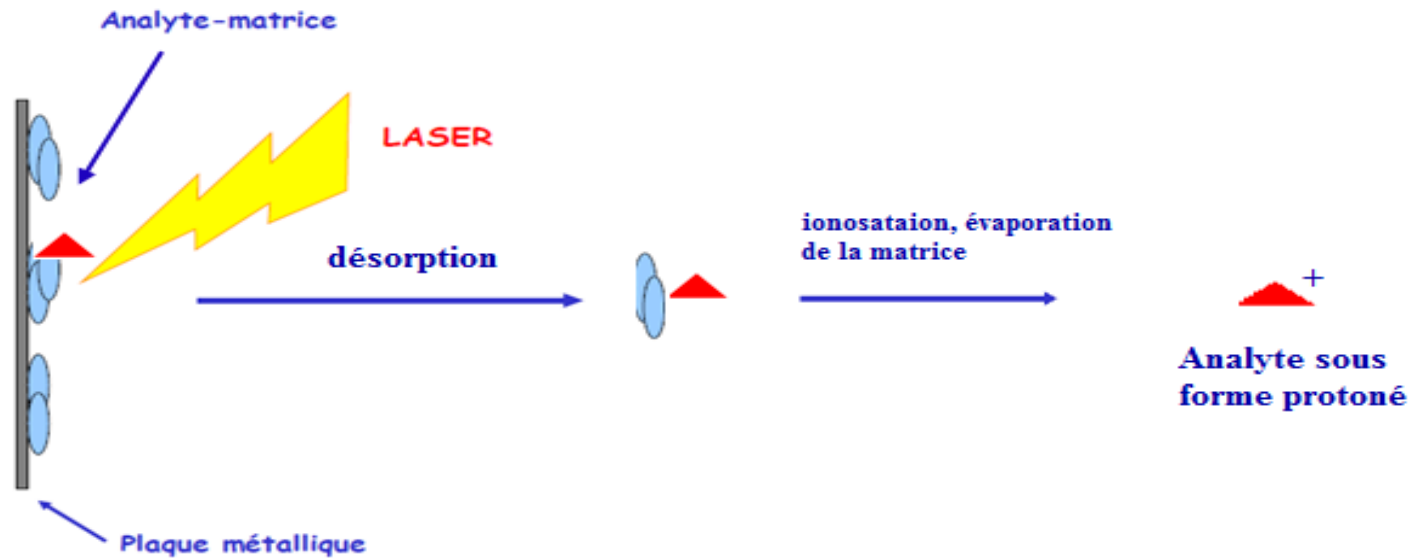
Spectrométrie de masse appliquée aux biomolécules:



La technique de la désorption laser assistée par matrice MALDI

La technique MALDI utilise en général un faisceau laser pulsé émettant dans l'ultraviolet (U.V.) ou l'infrarouge (I.R) pour désorber et ioniser un mélange matrice /échantillon co-cristallisé sur une surface métallique (appelée cible).

L'énergie est restituée en partie et transférée à l'échantillon qui sera alors volatilisé et ionisé par transfert de protons pour former des ions mono ou dichargés de type $[M+nH]^{n+}$.

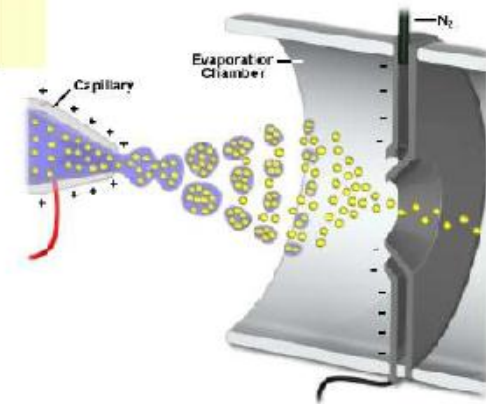
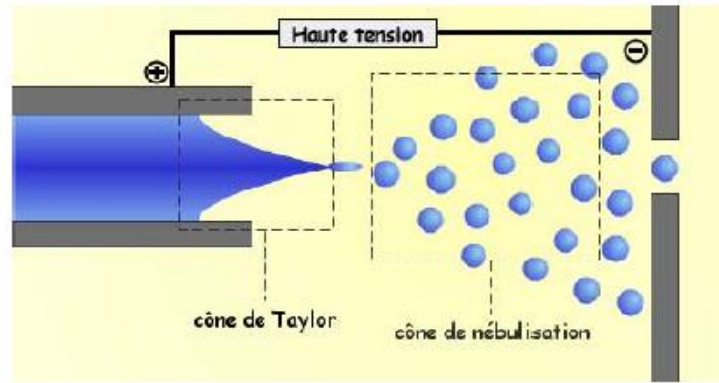


Principe de l'ionisation en MALDI

- **ElectroSpray ionization**

= **ionisation par électrospray**

- échantillon en solution
- production de gouttelettes chargées à partir de l'analyte dissout en solution
- évaporation du solvant, diminution de la taille de la gouttelette
- désintégration des gouttelettes : micro-gouttelettes plus chargées
- ions désolvatés -> spectrométrie de masse

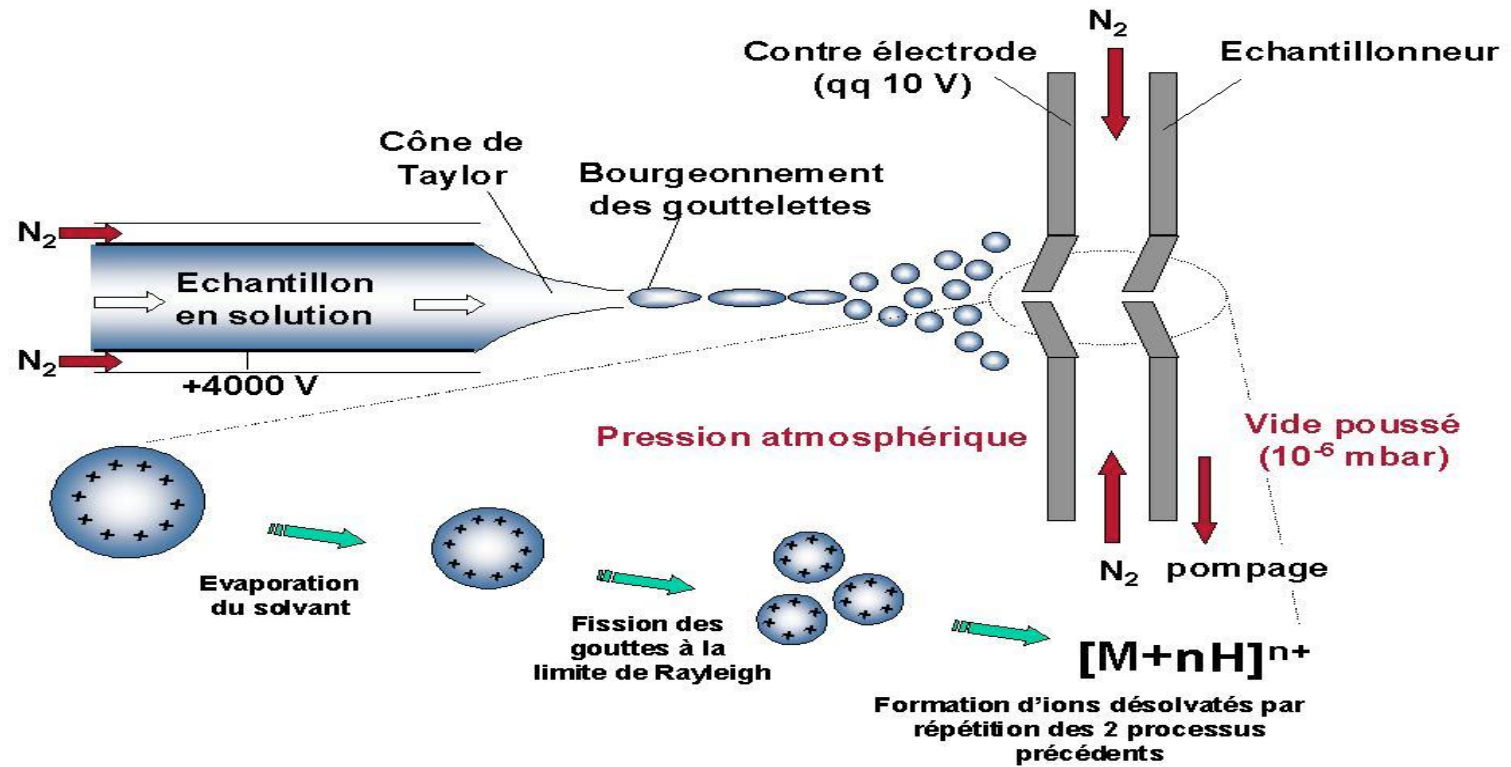


Une solution est pulvérisée dans une chambre. Un courant de gaz sec (N_2) évapore progressivement le solvant

Un potentiel de quelques kV est appliqué à la sortie du capillaire ce qui permet de charger les gouttelettes

Les gouttelettes chargées (de plus en plus petites) sont dirigées par un champ électrique vers l'analyseur

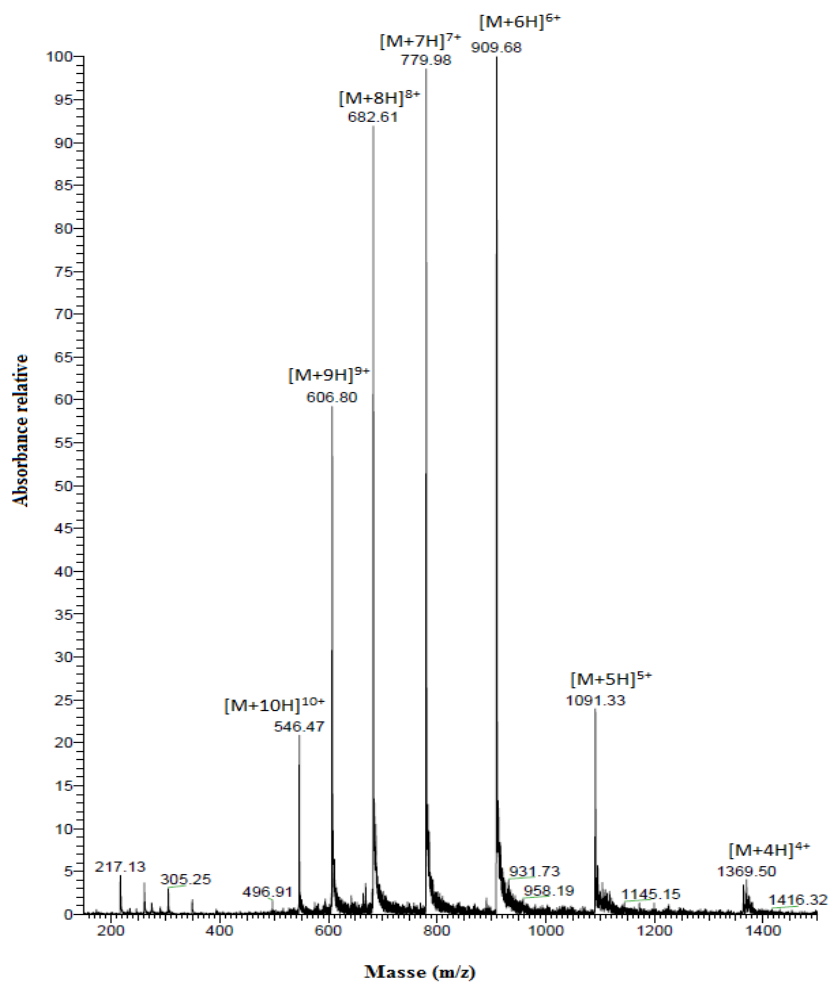
Schéma du principe de l'ionspray.



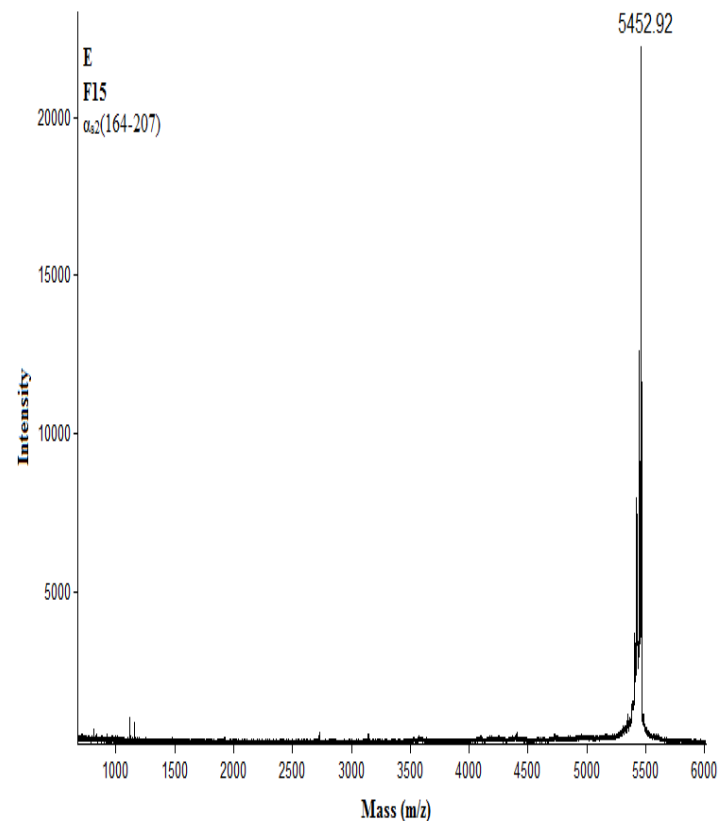
Les gouttelettes chargées et désolvatées, sont ensuite séchées par un flux d'azote chauffé circulant à contre courant, entrainant une série d'éclatement de la goutte et des ions en phase gazeuse sont finalement produits

L'électrospray permet d'obtenir des ions en phase gazeuse à partir d'ions en solution, à pression atmosphérique. Ce qui permet l'analyse de mélanges directement en solution et de couvrir une gamme de masse assez large, en générant des espèces multichargées provenant des molécules.

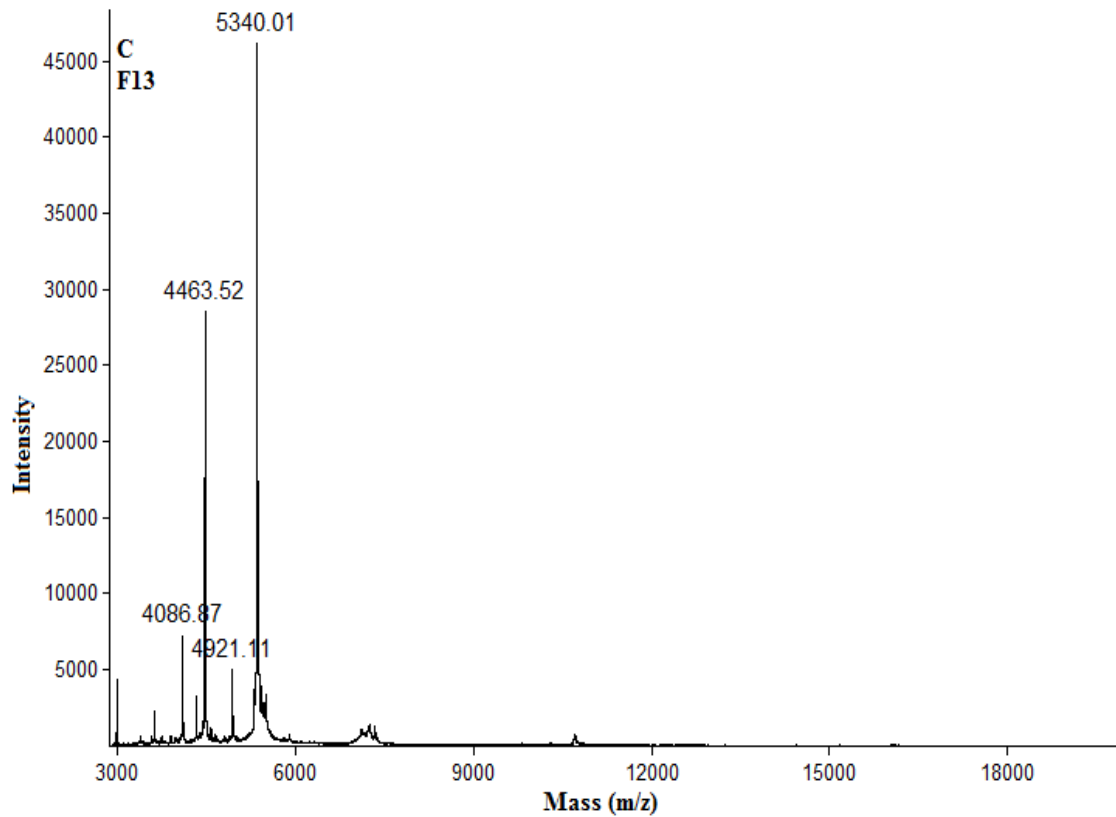
Avec l'arrivée en continue des échantillons en solution, l'électrospray peut être couplé avec la chromatographie liquide haute performance (LC/MS) ou avec l'électrophorèse capillaire (CZE/MS).



Spectre de masse du peptide α_{s2} (164-207) analysé en LC/MS, (ESI/Q).



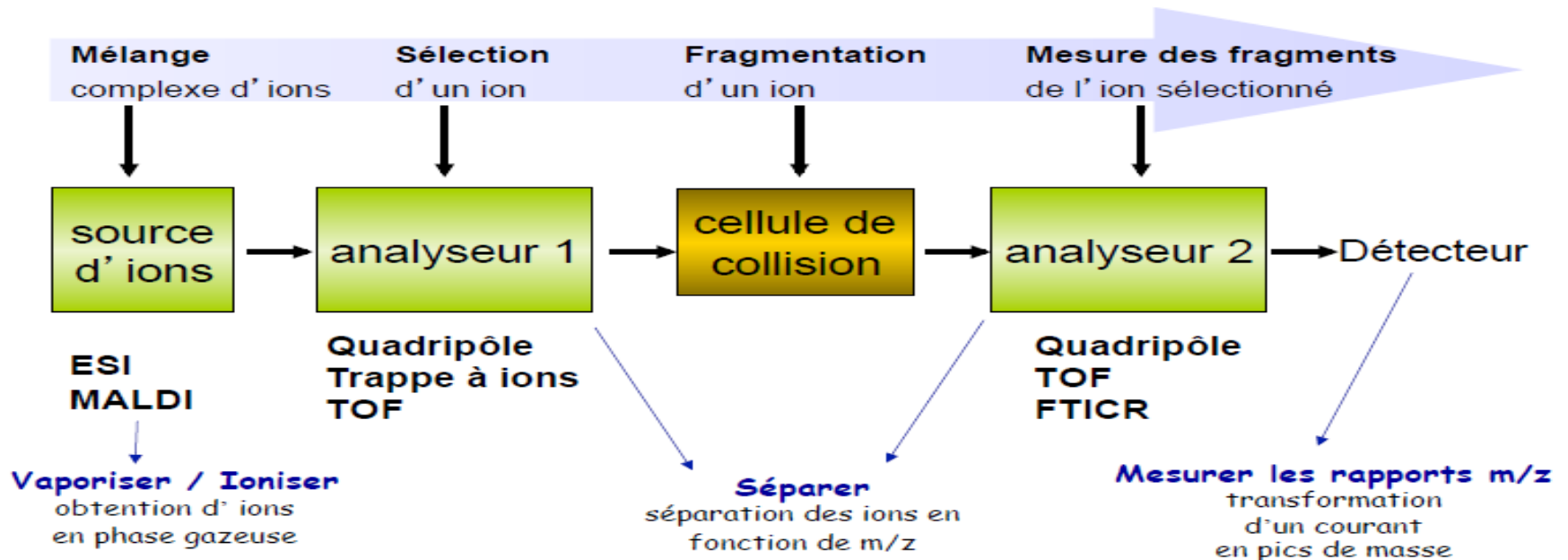
Spectres de masse du peptide α_{s2} (164-207) analysé par MALDI-TOF.



Spectres de masse d'une fraction peptidique analysé par MALDI-TOF.

II. Analyse de la séquence par fragmentation (MS/MS)

Cette technique permet d'identifier la séquence d'une protéine ou d'un peptide par des opérations successive de mesure de la masse, une fragmentation des molécules analysées et une deuxième mesure de la masse des fragments obtenus (MS/MS).



➤ Les fragments N-terminaux sont obtenus en rompant la liaison peptidique et en conservant la charge de l'ion sur la N-terminale du peptide :

les fragments primaires obtenus à basse énergie sont de types a, b, c et les fragments secondaires obtenus à haute énergie de type d.

➤ les fragments C-terminaux sont obtenus en rompant la liaison peptidique et en conservant la charge de l'ion sur la C-terminale du peptide :

les fragments primaires obtenus à basse énergie sont de types x, y, z et les fragments secondaires obtenus à haute énergie de type v et w.

ces fragments sont notés avec un indice qui précise le nombre de résidus portés par l'ion fragments.

Les spectres de fragmentations peptidiques à basse énergie donnent majoritairement des ions de série y et b.

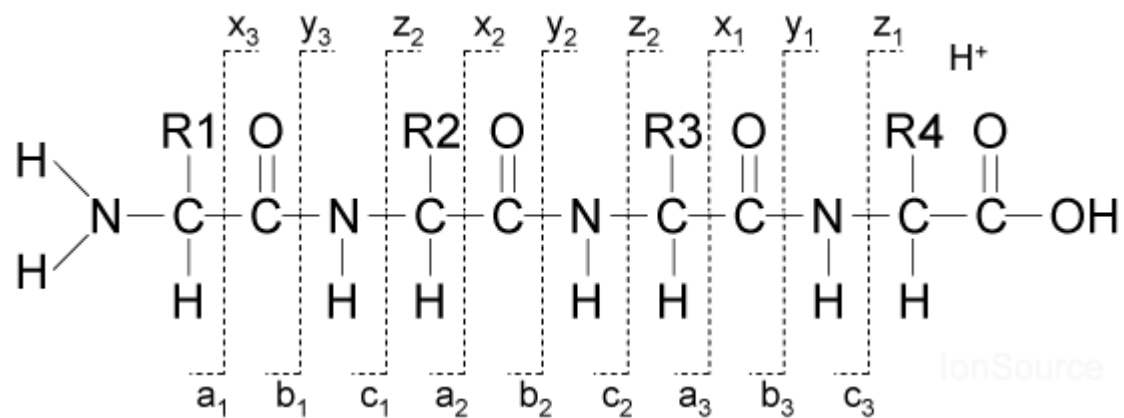


Schéma théorique de la fragmentation d'un peptide

des ambiguïtés lors de l'interprétation des résultats;

- *impossibilité de distinction des AA isobares (Leu, Ileu),
- masse très proche (Lysine et Glutamine) et certaines combinaisons de résidus de masse égale à celle d'un autre résidu.
- Cela nécessite de distinguer les AA par l'étude de la fragmentation de leur chaînes latérales (ions de série d) par spectrométrie de masse en Tandem à haute énergie.

FIN