

Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biochimie et de BMC
Master1 Biochimie de la Nutrition

Module / Semestre 2

Analyse protéomique

Crédit: 4

Coefficient: 2

Chapitre 4: Techniques d'identification des protéines

« Spectrométrie de masse »

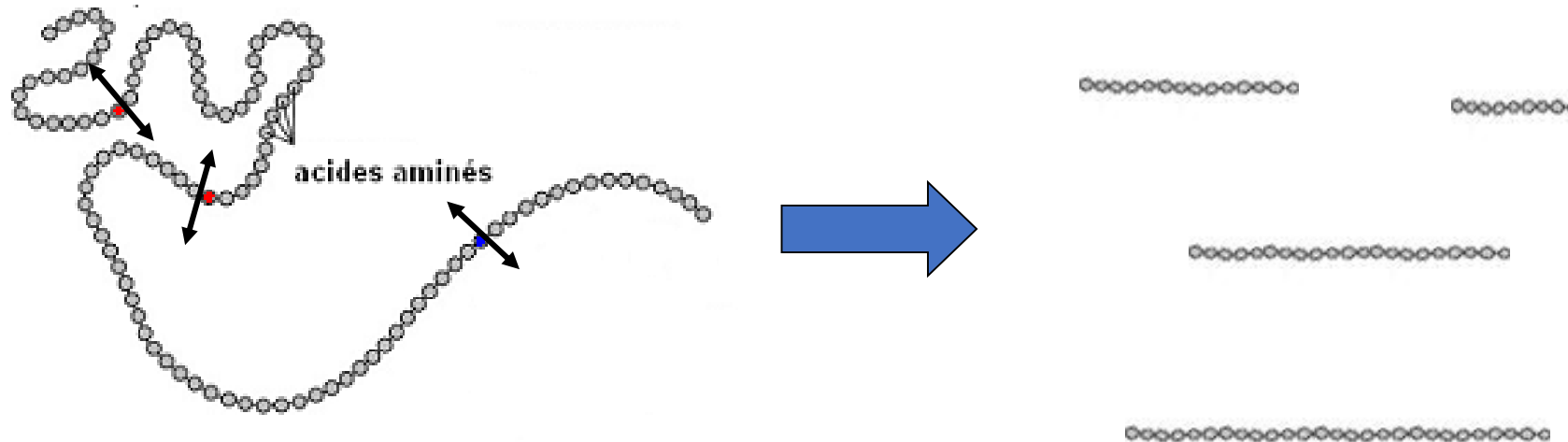
Principe général :



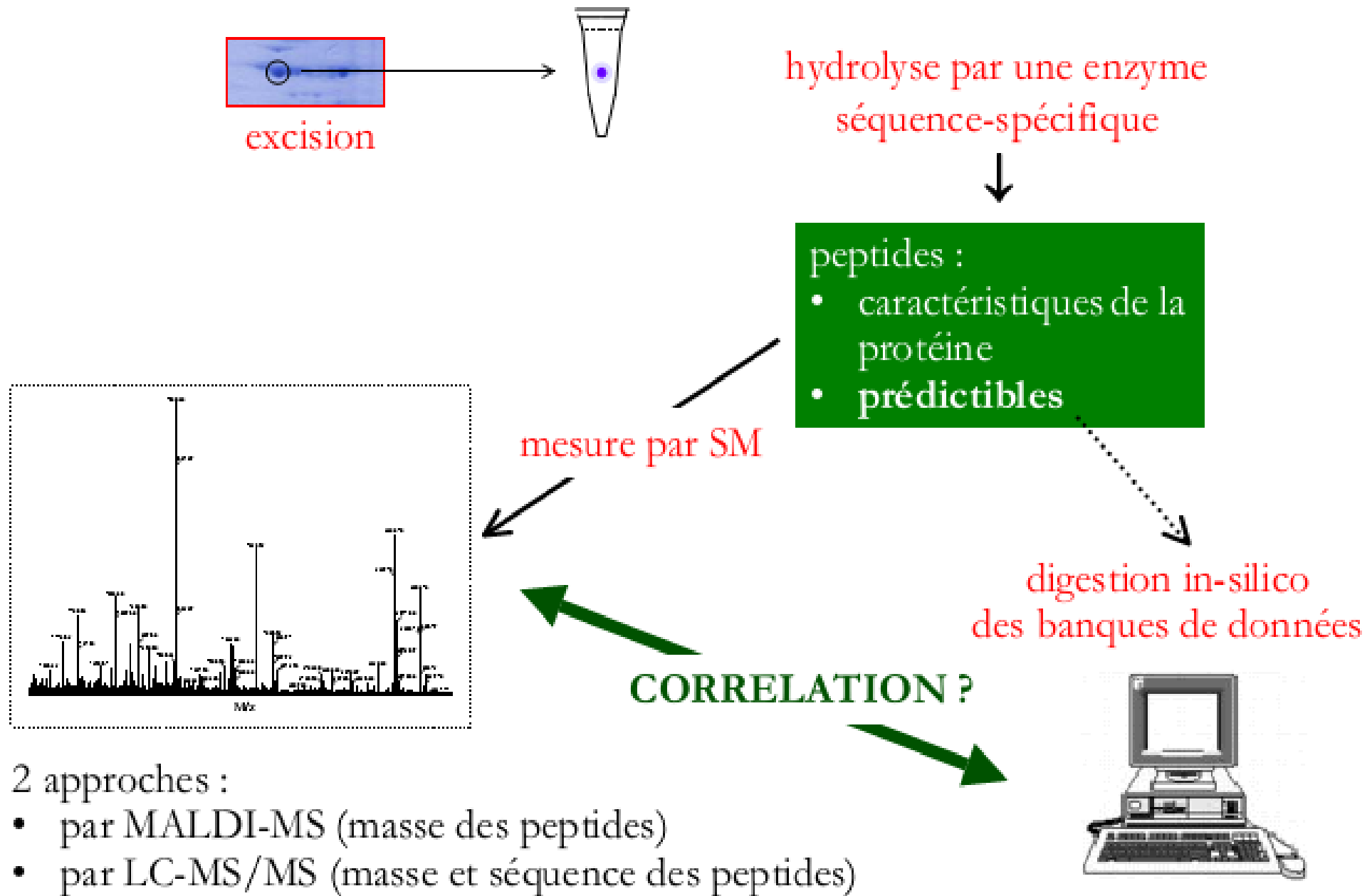
Spectrométrie de masse

Technique permettant d'identifier les protéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle ou les protéines en solution (mais en nombre limité).

Il faut casser au préalable les protéines : on utilise un enzyme qui fragmente les protéines toujours après 2 acides aminés bien précis.



Les fragments produits sont caractéristiques de la protéine :
« empreinte digitale »

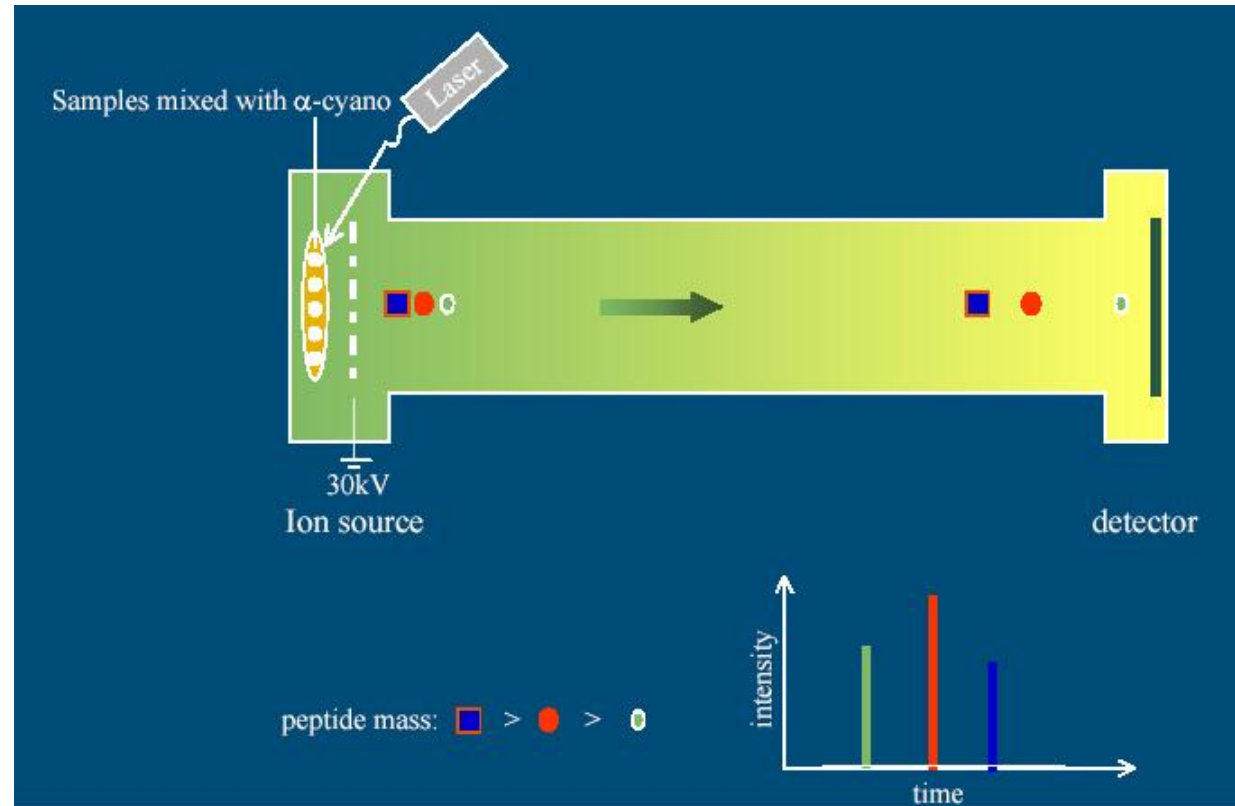


Qu'est-ce que la spectrométrie de masse ?

C'est une méthode de mesure des rapports
masse-sur-charge (m/z)
de molécules individuelles et ionisées
et de leurs produits de fragmentations

Spectrométrie de masse

Principe : propulser les fragments de protéines dans un tube sous vide. Pendant leur vol, les fragments se séparent selon leur masse, les plus légers arrivent les premiers sur le détecteur en bout de tube.

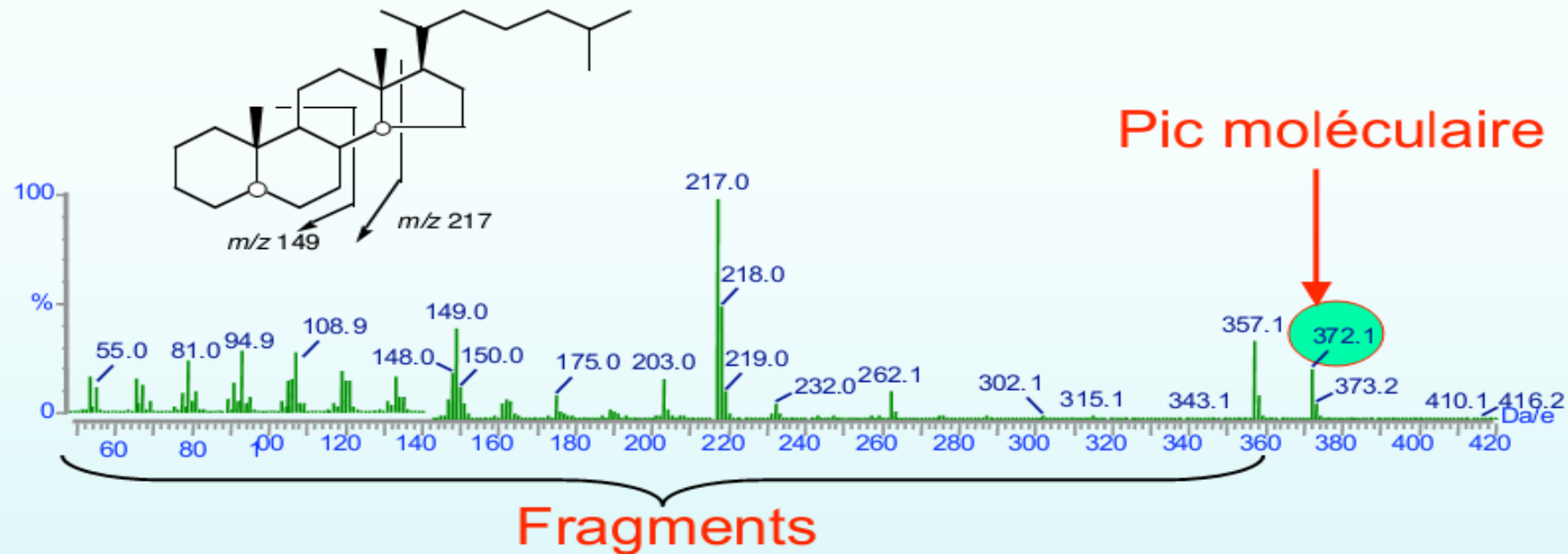


Mesure du temps de parcours = mesure de la masse

Quelles informations peut apporter la spectrométrie de masse ?

- 1- La valeur m/z du pic moléculaire permet de calculer la **masse moléculaire**
- 2- Les pics de fragmentation permettent de reconstituer une partie de la **structure**
- 3- L'intensité des pics permet de faire de l'**analyse quantitative**

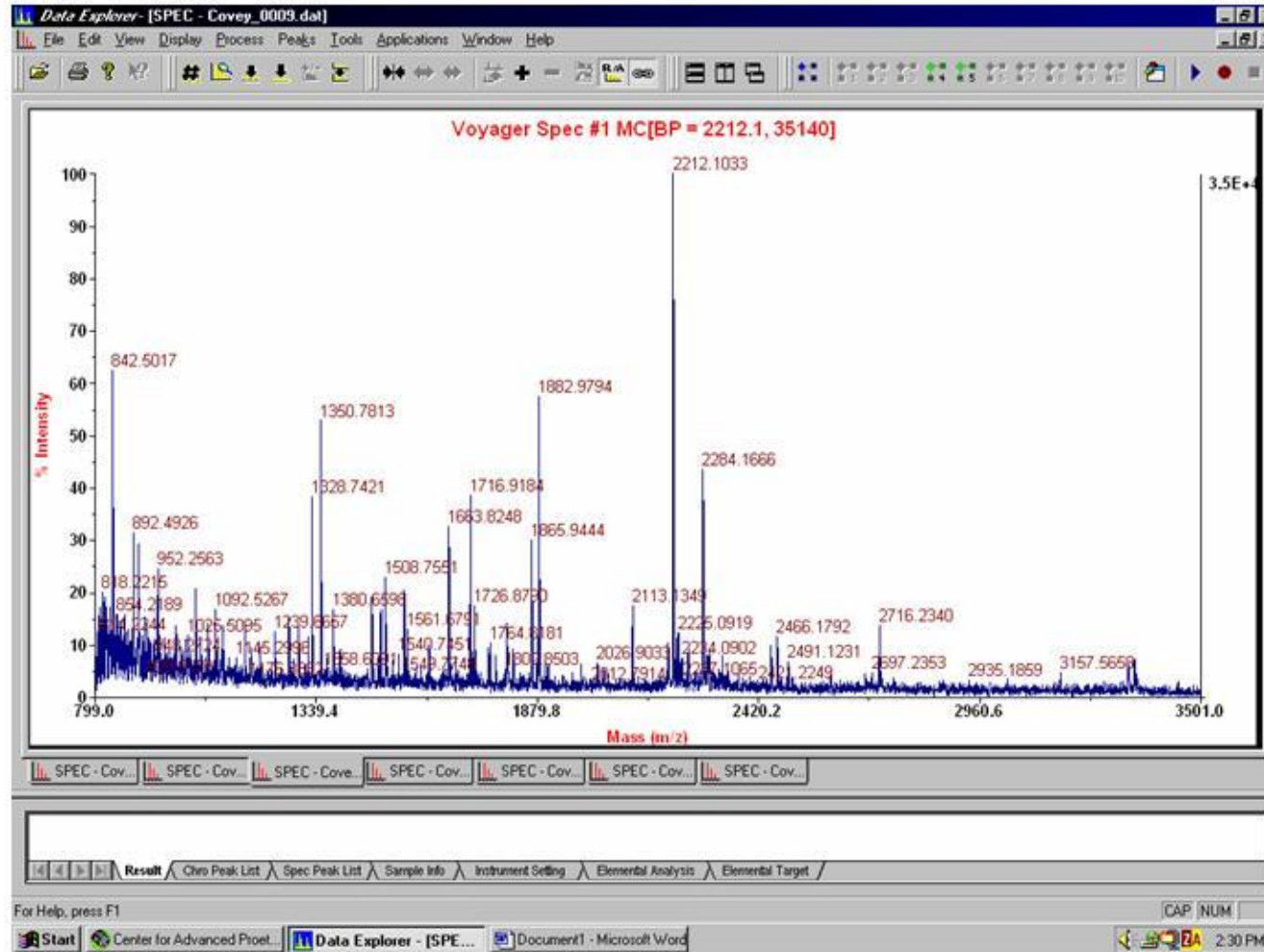
Cholestane



Exemple: spectre en ionisation par impact électronique du cholestane.

Spectrométrie de masse

Résultat : spectre de masse des fragments de la protéine



Liste de masses

- 2716.23
- 2284.16
- 2212.10
- 1882.97
- ...

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)/nb de charges (z)

Un spectromètre de masse est constitué de:



Source

obtention d'ions en
phase gazeuse



Interface

focalisation et
transmission des
ions



Analyseur

séparation des ions
en fonction de m/z

Un spectromètre de masse est donc constitué de deux parties :

1- La source d'ion : pour volatiliser et ioniser

Ces opérations peuvent se faire simultanément ou successivement selon le type de source d'ions. Leur mécanisme intime est souvent mal connu.

2- L'analyseur: pour mesurer m/z

Il mesure les valeurs du rapport: masse / nb de charge (appelé m/z)

C'est une partie de l'appareil où règne un vide suffisant pour que le libre parcours moyen des ions soit supérieur à la distance à parcourir dans l'appareil pour atteindre le détecteur.

CECI IMPLIQUE:

- **Des champs électrostatiques** très précis pour guider et déplacer les ions dans l'appareil (lentilles électrostatiques, optique ionique)
- **Un vide suffisant** pour que les ions puissent se déplacer sans être détruits ou déviés par des molécules résiduelles (notion de libre parcours moyen)

La source d'ions : son rôle est de volatiliser et d'ioniser

Il existe de nombreux types de sources d'ions et chacun de ces types de sources repose sur un principe physique différent.

Le principe physique qui permet de volatiliser et l'ioniser un type de composé est choisi par l'opérateur en fonction des caractéristiques de la molécule à analyser. Les étapes de volatilisation et d'ionisation se font successivement ou simultanément selon le type de source.

Les critères de choix principaux sont:

- la volatilité et la stabilité thermique du composé à analyser
- sa labilité chimique
- les fonctions chimiques présentes et leur aptitude à induire une ionisation
- la taille des molécules
- les quantités de produit disponibles
- le type d'introduction souhaitée (directe ou en couplage chromatographique)

Les sources d'ions se classent en sources « dures » et en sources « douces »

- De très nombreuses méthodes d'ionisation ont été inventées pour ioniser et volatiliser des molécules de plus en plus fragiles, grandes et polaires.
- Les « **ionisations dures** » génèrent souvent des ions moléculaires, à **nombre impair d'électrons**, qui se **fragmentent** beaucoup et parfois même totalement avant d'avoir eu le temps de sortir de la source. Lorsque leur durée de vie est assez longue pour qu'il sortent de la source intacts, mais qu'ils se décomposent avant d'avoir complètement traversé l'analyseur et d'arriver au détecteur, on les appelle ions métastables. Leurs fragments peuvent être analysés et donnent des informations de structures.
- Les « **ionisations douces** » génèrent des ions moléculaires à **nombre pair d'électrons**, qui sont relativement stables et qui ont des durées de vie suffisantes pour traverser l'analyseur, arriver jusqu'au détecteur, et donc être mesurés.

Les sources d'ions les plus courantes sont :

La source à plasma induit couplé (Induced coupled plasmas: ICP-MS)	Très dure	
La source à impact électronique (EI)	Dure	
La source à ionisation chimique (CI)	Assez douce	
La source à ionisation chimique par désorption (DCI)	Assez douce	
L'ionisation par thermospray (TSP)	Assez douce	
La désorption de champs (FD)	Assez douce	
L'ionisation par bombardement d'ions ou d'atomes rapides (LSIMS, FAB)	Assez douce	
La désorption par plasma (PD)	Assez douce	
La désorption laser (LD)	Assez douce	
L'ionisation chimique à pression atmosphérique (API ou APCI)	Assez douce	
La photoionisation (APPI)	Assez douce	
L'ionisation laser assistée par matrice (MALDI)	} Utilisées en PROTEOMIQUE	Douce
L'électronébulisation (electrospray: ES ou ESI)		Douce

L'analyseur : pour mesurer m/z

Il existe différents types d'analyseurs. Ils sont tous basés sur des principes physiques différents, mais tous les analyseurs mesurent des valeurs m/z .

C'est une partie de l'appareil où règne un vide suffisant pour que le libre parcours moyen des ions soit supérieur à la distance à parcourir dans l'appareil pour atteindre le détecteur.

B: Déflexion par un champ magnétique (c'est l'analyseur le plus ancien)

Q: Déflexion par un champ quadropolaire

IT: Confinement dans un piège à ion (Ion Trap)

TOF: Mesure d'un temps de vol (Time Of Flight)

FT-ICR: Résonance Cyclotronique d'Ions à Transformée de Fourier

Les ions formés dans la source sont dirigés (extraction et focalisation) vers l'analyseur par des champs électrostatiques qui peuvent être de quelques volts (Q, IT, FT-ICR) ou de plusieurs dizaines de kilovolts (TOF, B). La vitesse de déplacement des ions dans l'analyseur dépend de l'intensité du champ d'extraction

On peut coupler plusieurs analyseurs (MS-MS et MS^n) pour faire de la spectrométrie de masse à plusieurs dimensions en utilisant successivement le pouvoir séparateur de chaque analyseurs. Ceux-ci peuvent être identiques ou différents.

Les caractéristiques principales d'un analyseur sont :

- La résolution R
- La gamme m/z qu'il peut analyser
- La rapidité de balayage en m/z
- La sensibilité
- La vitesse avec laquelle les ions le traversent

Souvent, avec un même analyseur, on peut augmenter l'une de ces caractéristiques aux dépens des autres, mais seulement dans certaines limites.

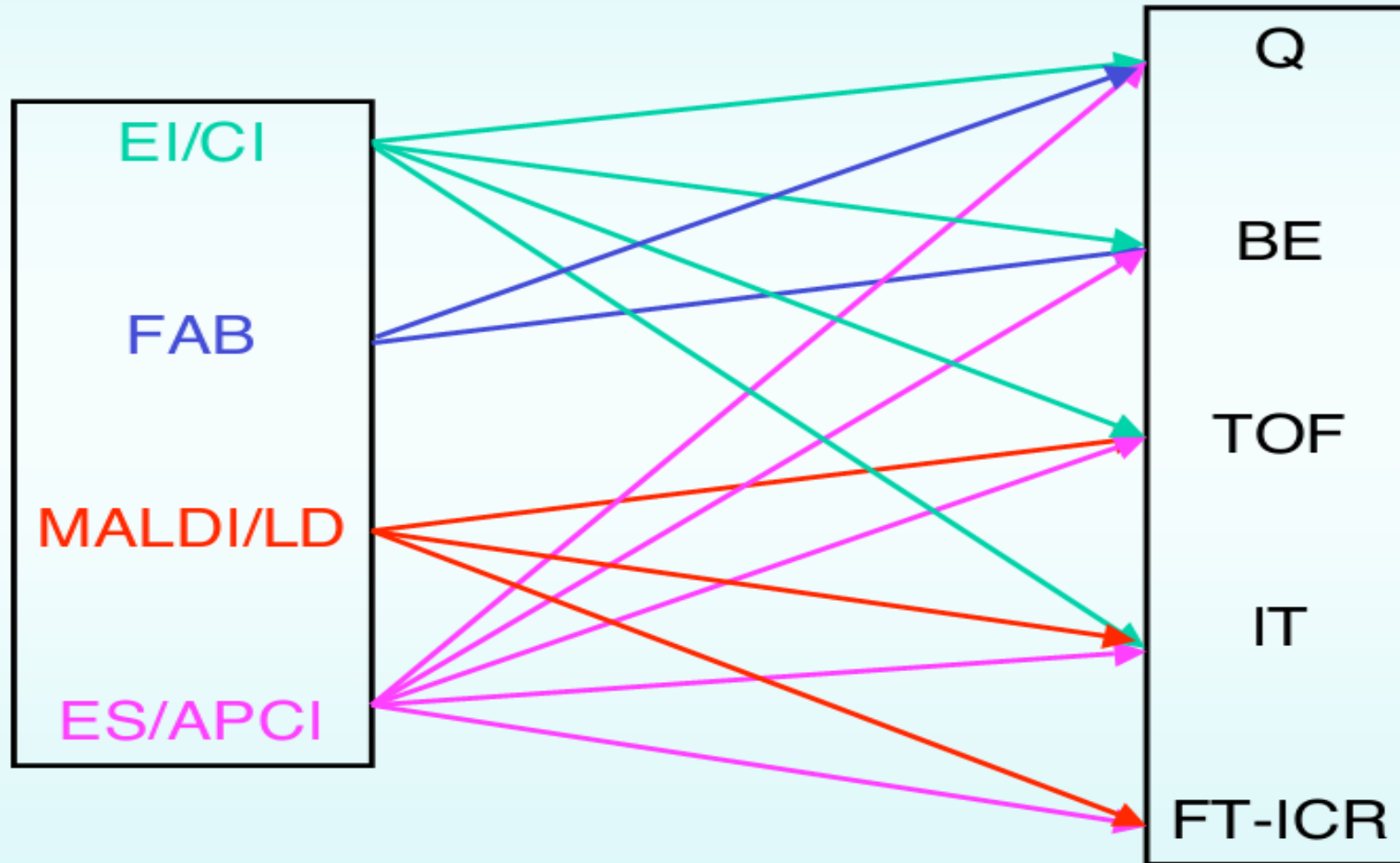
Chaque type d'analyseur a son "point fort".

Caractéristiques des analyseurs

Analyseurs	Résolution	Gamme m/z
Quadripôle (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

Spectromètres de masse commerciaux:

De nombreux couples source /analyseur sont possibles



**Un Nobel 2002 pour la Spectrométrie de Masse
et la protéomique**

John Fenn



Electrospray

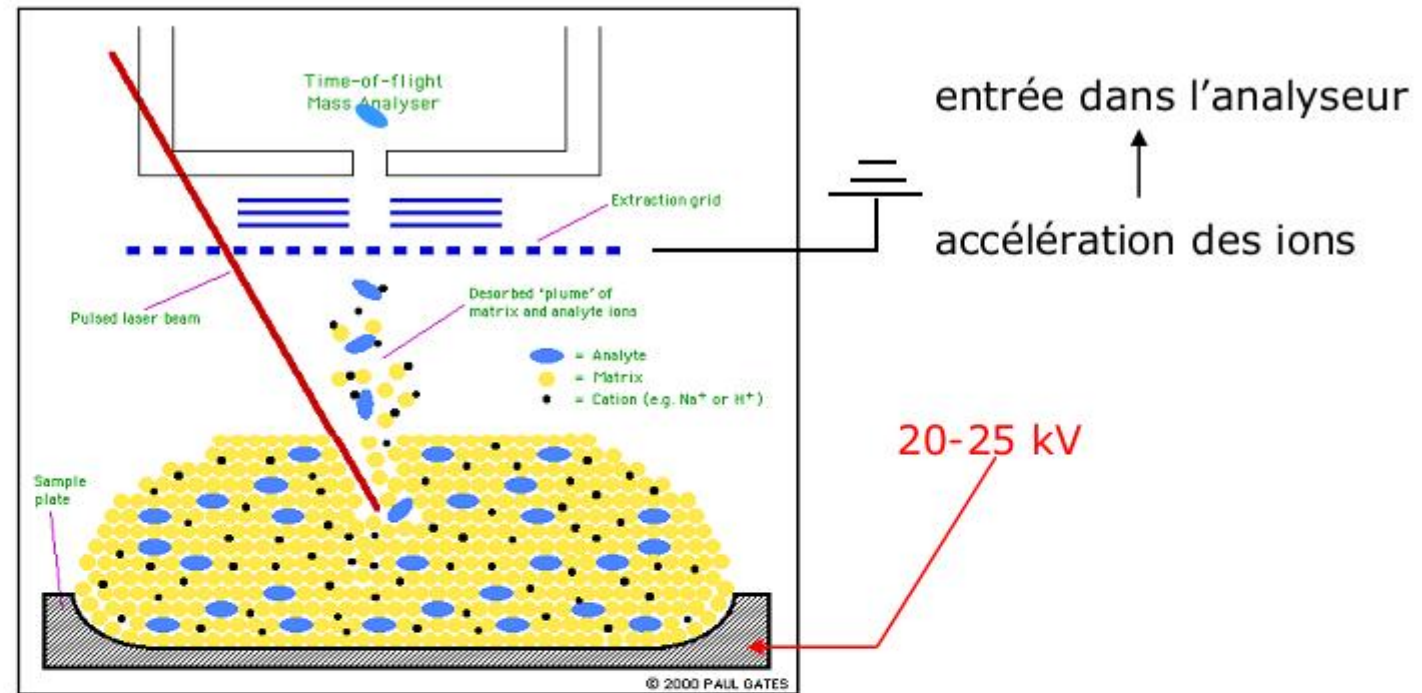
Koichi Tanaka



Maldi

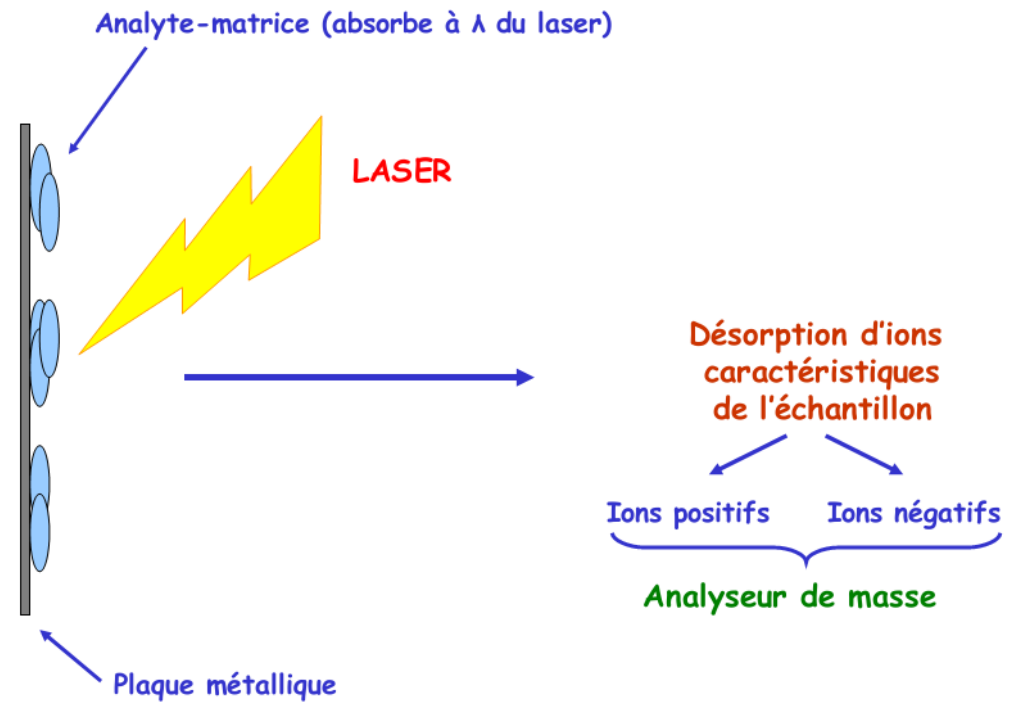
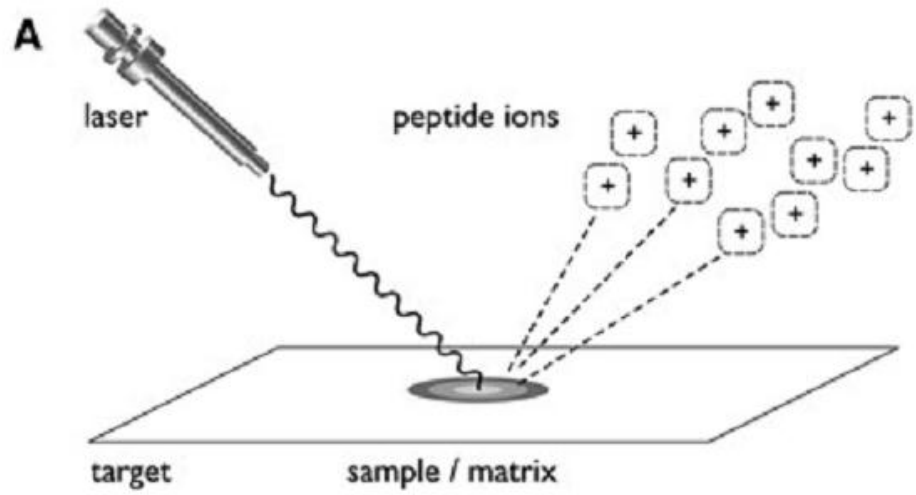
La source MALDI (Matrix associated laser desorption Ionization)

Koichi Tanaka



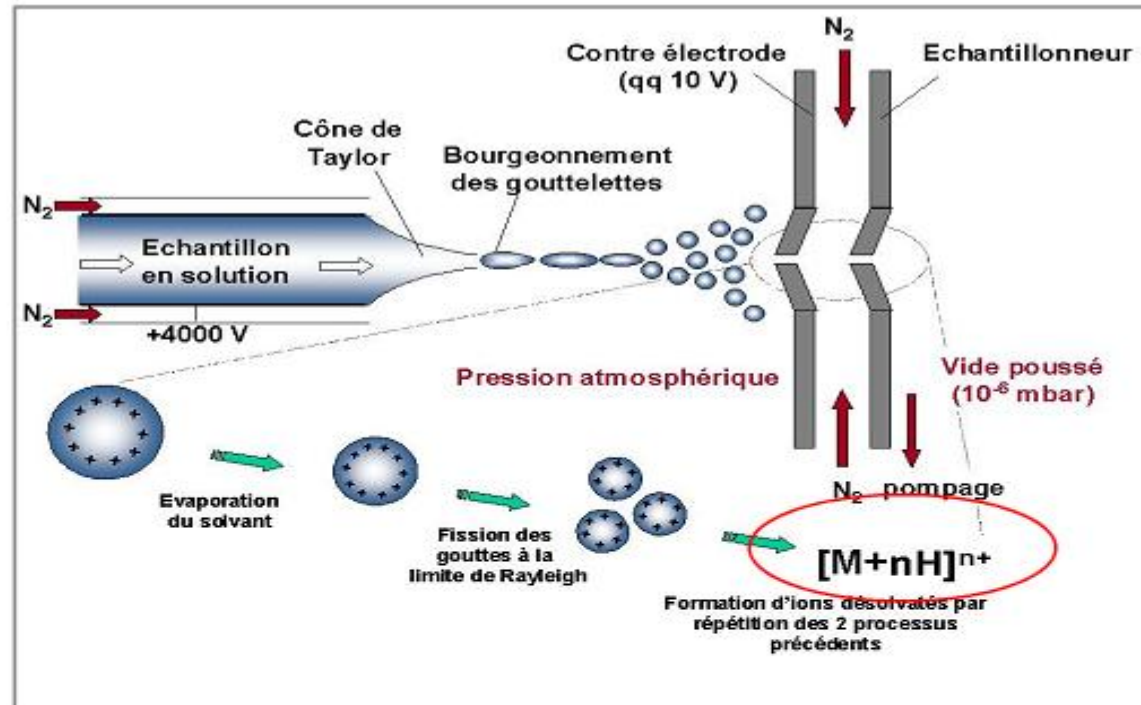
- co-cristallisation de l'échantillon et d'une matrice photo-excitable
- excitation de la matrice par tir laser (UV 337 nm)
- désorption et ionisation de l'échantillon (et de la matrice)

Les **ions monochargés [M+H]⁺** sont en général majoritaires



La source ESI (Electrospray Ionization)

John Fenn



- passage de l'échantillon dans un capillaire maintenu à 4–5 kV
- formation d'un nuage de gouttelettes chargées : nébulisation
- diminution de la taille des gouttelettes par évaporation du solvant (explosions "coulombiennes" successives : divisions spontanées de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites, provoquées par une charge surfacique très élevée)
- les ions désolvatés, en phase gazeuse, sont introduits dans l'analyseur

1 - Séparation de protéines sur gel d'électrophorèse 2D (ou 1D)

2 - Excision d'un spot protéique, décoloration

3 - Digestion enzymatique dans le gel (trypsine)

4 - Extraction des peptides

5 - Cartographie massique peptidique par MALDI TOF et interrogation des banques de données

Oui

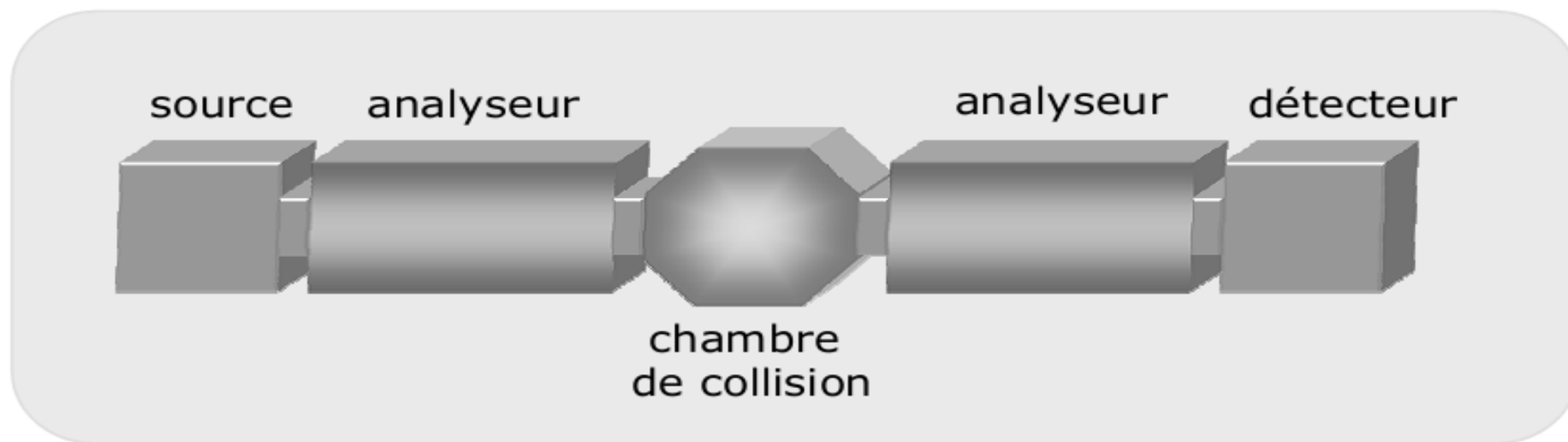
Identification ?

Non

6 - Nano électrospray MS/MS et interrogation des banques de données

⇒ microséquençage

La SM en tandem (MS/MS)



pour les protéines non répertoriées dans les banques de données protéiques
pour identifier une protéine non identifiable par mass fingerprint

- sélection un à un des peptides ionisés
- **fragmentation des peptides** isolés (par collision avec un gaz)
- **analyse des fragments** (spectre MS/MS)
- reconstitution de la séquence en acides aminés du peptide
- analyse des banques protéiques et génomiques

La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions:

Il y a plusieurs analyseurs qui se suivent

Les analyseurs peuvent être couplés et agir de façon séquentielle.
On parle alors de **spectrométrie de masse à plusieurs dimensions**

Un premier analyseur sélectionne les ions avec un certain m/z

On purifie donc un ion présent dans un mélange d'ion qui peut être très complexe

L'ion « purifié » est alors fragmenté dans une **chambre de collision**.

Un deuxième analyseur mesure alors les m/z des fragments.

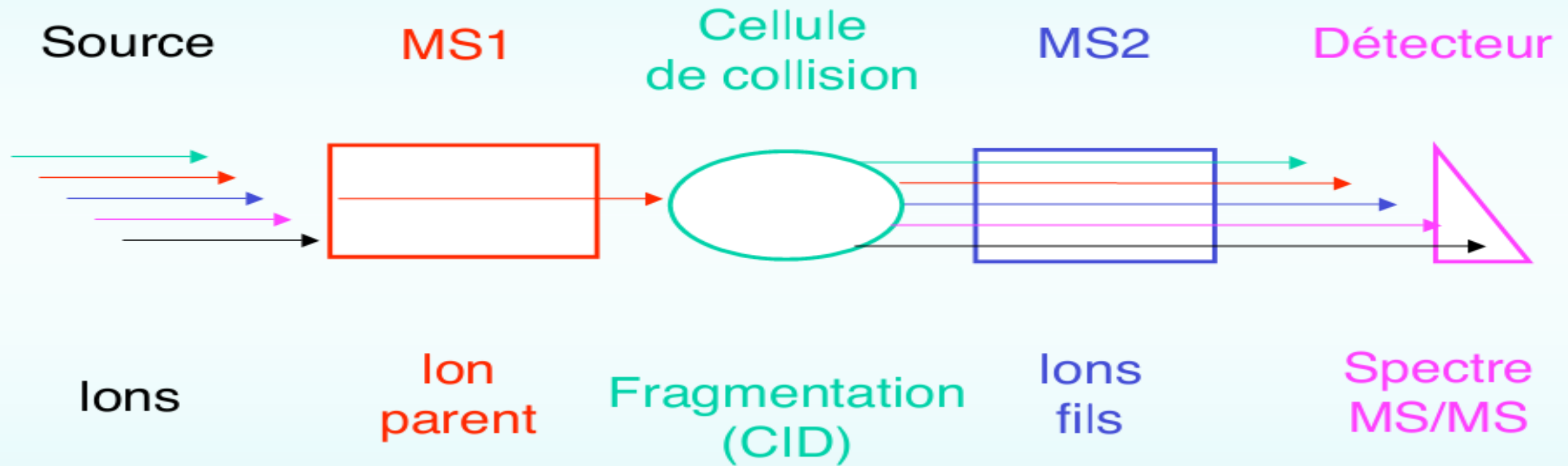
C'est de la **MS-MS** (spectrométrie de masse en tandem)

Si on répète l'opération, on fait de la MS-MS-MS ou MS³

Certain appareils permettent de faire de la MS¹⁰

La MS-MS est un puissant outil de détermination de structure

Principe de la MS/MS: étude d'ions fils



Le premier analyseur ne balaye pas

Les analyseurs MSⁿ

La MS-MS peut être réalisée par :

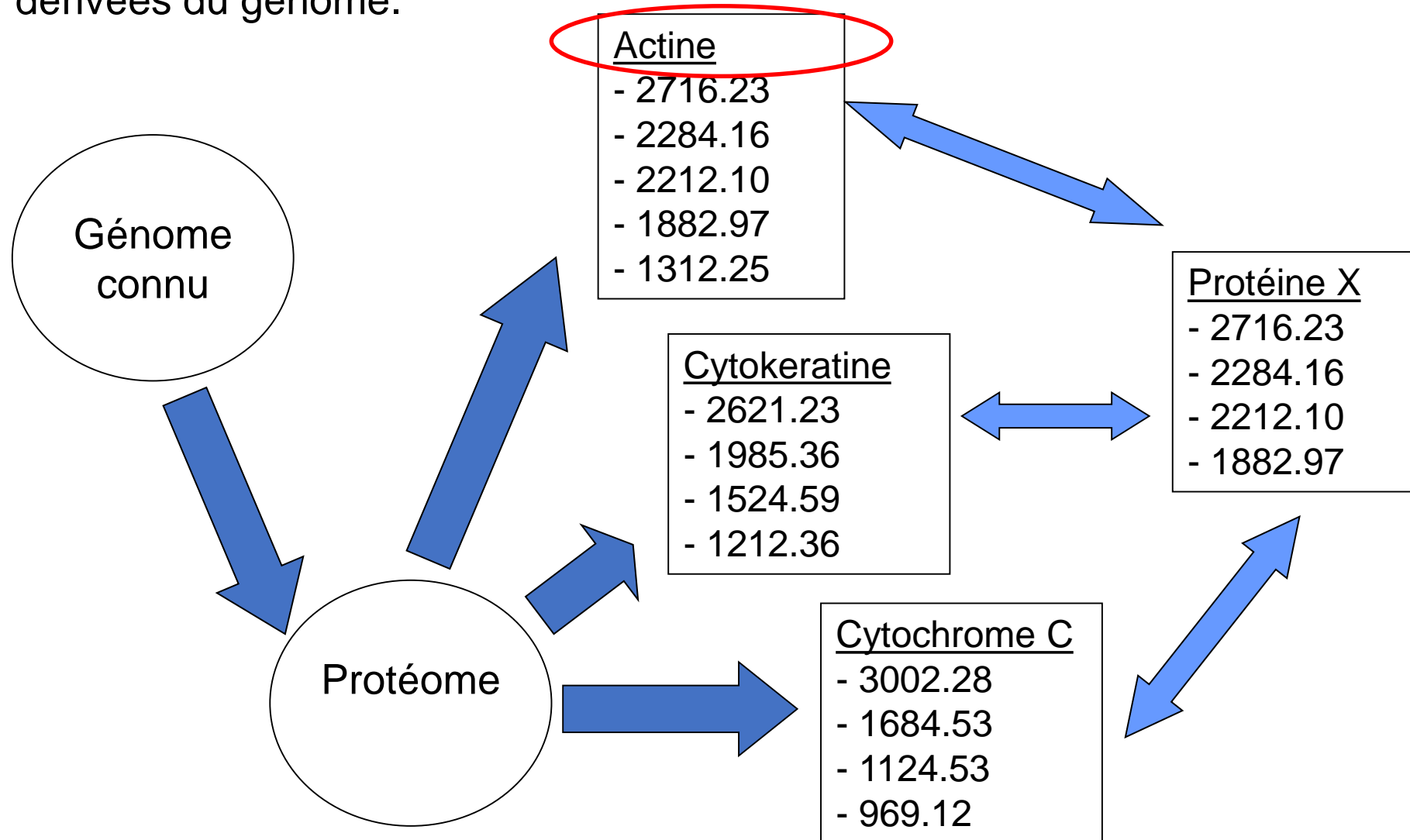
Deux quadrapôles	Q-Q
Un quadrapôle et un analyseur à temps de vol	Q-TOF
Deux analyseurs à temps de vol	TOF-TOF
Un piège à ions (Ion Trapp)	IT
Une résonance cyclotronique d'ion à transformée de Fourier	FT-ICR

La MSⁿ peut être réalisée par :

Un piège à ions (Ion Trapp)	IT
Une résonance cyclotronique d'ions à transformée de Fourier	FT ICR

Spectrométrie de masse

Analyse des données : la liste de masses de la protéine est comparée aux listes de masses théoriques obtenues à partir des séquences protéiques dérivées du génome.



Outils informatiques pour l'étude des protéines

Bases de données

Comme pour le gènes, les séquences de toutes les protéines sont stockées dans des bases de données accessibles par Internet.

SwissProt : base contenant les séquences de protéines connues. En plus de la séquence, sont stockées des informations sur la protéine (structure, fonction, etc...)

Logiciels de recherche dans les bases de données

Pour les données de spectrométrie de masse par exemple. Différents algorithmes :

SEQUEST : calcul d'un score basé sur la corrélation entre la liste de masses et les listes de masses théoriques

MASCOT : calcul d'un score basé sur la probabilité de trouver une correspondance entre la liste de masse et les listes théoriques qui n'est pas due au pur hasard

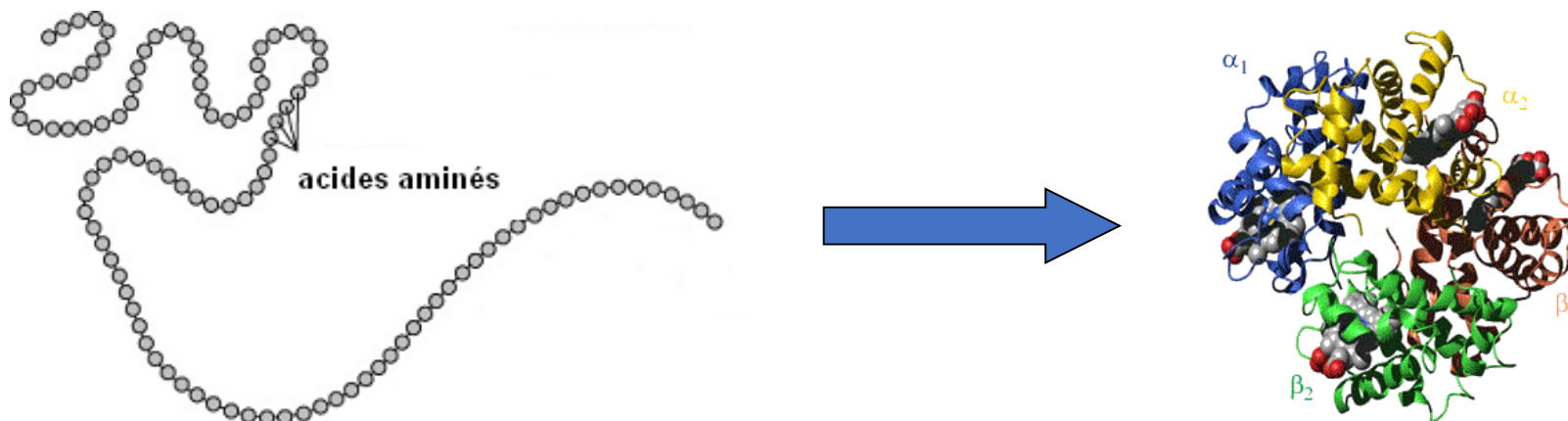
Outils informatiques pour l'étude des protéines

Prédiction de structure

A partir de la séquence, des programmes tentent de déterminer la structure tridimensionnelle de la protéine.

Nécessite beaucoup de calculs (très grand nombre de combinaisons possibles) : réalisés sur des supercalculateurs.

Souvent les programmes se basent sur des modèles de structures de protéines connues (détermination de la structure par homologie).



Outils informatiques pour l'étude des protéines

Le calcul partagé (grid computing)

Programme Décryphon :

Mieux comprendre le fonctionnement et le rôle des protéines, prédire leur fonction si elle est inconnue, progresser dans la connaissance de leur structure en 3 dimensions, croiser les données du protéome et celles du génome

- 3 supercalculateurs (Bordeaux, Lille et Paris 6) connecté par le réseau à haut débit RENATER. Puissance de calcul initiale de de 298 Gflops
- grille d'internautes : 75 000 volontaires qui ont permis la comparaison de 559275 séquences protéiques en moins de deux mois

Berkeley Open Infrastructure for Network Computing (BOINC)

- projet Predictor@home et Rosetta@home : pour la prédiction de structure de protéines impliquées dans les maladies telle que le SIDA, les cancers, etc...