

Chapitre 5. Spectrométrie de masse pour l'analyse des protéines.

Introduction et généralités :

1. La détection par spectrométrie de masse SM.
2. Structure d'un spectromètre de masse. SM
3. Principe d'un spectromètre de masse.
4. Les différents composants du spectromètre de masse SM.
5. Utilisation
6. Exemple d'un spectre de masse
7. Exercices.

Introduction et généralités :

Les protéines constituent avec les polysaccharides et les acides nucléiques une des trois classes de biopolymères intervenant dans la structure et dans le fonctionnement de tous les organismes vivants.

L'hydrolyse totale des protéines conduit aux acides aminés qui les caractérisent. Parmi les acides aminés isolés du règne vivant, une vingtaine seulement sont des constituants des protéines natives. Huit sont nécessaires à l'espèce humaine car nos cellules ne peuvent les synthétiser (Leu, Thr, Lys, Trp, Phe, Val, Met, Isl). Ils sont essentiels et doivent être présents dans l'alimentation ; les douze autres acides aminés sont synthétisés dans les cellules à partir de substances plus simples contenant carbone, hydrogène, oxygène, azote et soufre.

1. La détection par spectrométrie de masse SM.

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Elle est utilisée dans pratiquement tous les domaines scientifiques : physique, astrophysique, chimie en phase gazeuse, chimie organique, dosages, biologie, médecine... le temps de détection est très rapide.

La spectrométrie de masse est d'abord une méthode d'analyse spectrale capable de fournir la masse moléculaire et des renseignements structuraux sur les molécules.

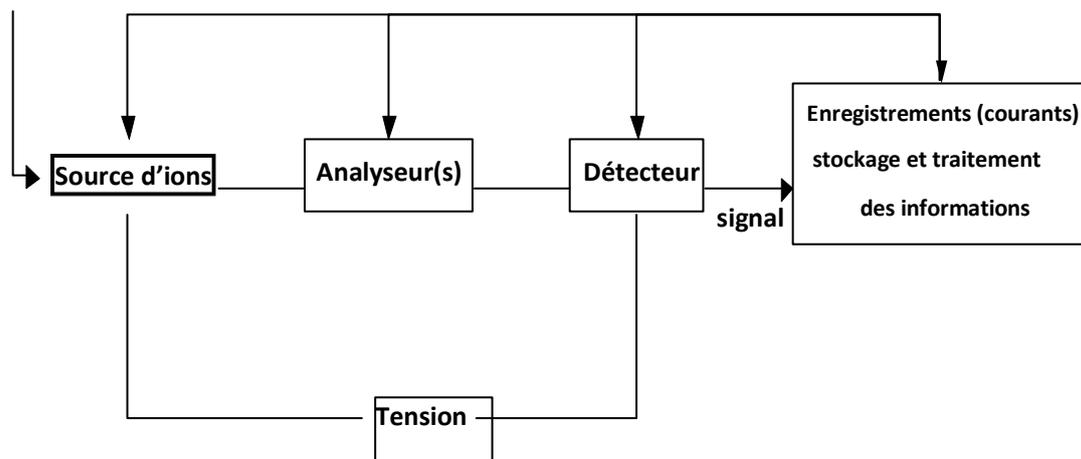
2. Structure d'un spectromètre de masse. SM

Le spectromètre de masse, comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z , d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal.

Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports m/z , où m représente la masse et z la valence (ou m/q , q représentant la charge) des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'abondance relative de ces ions selon l'axe de ordonnées.

Les différents composants d'un spectromètre de masse. SM.

Echantillon



3. Principe d'un spectromètre de masse.

Fondamentalement, un spectromètre de masse contient 5 parties :

- Introduction de l'échantillon
- une source de production d'ions,
- un système analyseur des rapports masse sur charge (m/z),

- un détecteur,
- Un système de traitement, stockage de données (microinformatique) est associé au spectromètre pour gérer les signaux résultants de l'analyse et imposer un rétrocontrôle de l'appareil.

4. Les différents composants du spectromètre de masse SM.

Le système d'introduction de l'échantillon : l'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme gazeuse, liquide (infusion directe) ou solide ou encore par l'association à une méthode séparative (chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse, électrophorèse capillaire...).

La source d'ionisation : elle consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Il existe plusieurs sources d'ionisation, nous ne citerons que quelques sources d'ionisations.

- L'ionisation électronique (EI),
- l'ionisation chimique (CI)
- Le bombardement par atomes rapides (FAB),
- Electrospray ionisation ESI ou L'électronébulisation.

L'analyseur : il sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Il comporte un système comprenant un secteur magnétique couplé à un secteur électrique qui permet de terminer le temps de vol (TOF), de chaque ion.

Ces analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

En général, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet de fragmenter les ions, et un second analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs, comme les pièges à ions, constituent plusieurs analyseurs en un et permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement.

Le détecteur et système de traitement : le détecteur transforme les ions en signal électrique. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.

5. Utilisation

Un spectromètre de masse permet de réaliser les fonctions suivantes :

Identification des molécules : un spectre de masse peut être caractéristique d'une molécule. Ainsi en le comparant avec le contenu de banques de spectres, il est possible d'identifier la molécule. La spectrométrie de masse permet de mesurer avec précision la masse mono-isotopique d'un ion et d'en déduire sa formule brute.

Analyse structurale : Les ions moléculaires peuvent se fragmenter dans un spectromètre de masse : dans la source d'ionisation, dans l'analyseur ou dans une cellule de collision. Comme les fragmentations respectent des lois précises, l'étude de ces fragments permet de déterminer la structure des molécules ionisées.

Quantification : Un spectromètre de masse possède un détecteur très sensible permettant de faire une quantification fiable des molécules ionisées. (Densité optique ou Intensité relative).

La source d'ionisation

Les ionisations EI et CI, qui nécessitent un certain niveau de vide, sont préférentiellement utilisées en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse (la CI fonctionnant à partir d'une source EI). En revanche, les deux sources à pression atmosphérique (electrospray et APCI) dites à « ionisation douce », sont principalement utilisées en couplage avec la chromatographie en phase liquide.

L'ionisation électronique (EI)

Source d'ionisation électronique. Des électrons émis par un filament rencontrent les molécules qui entrent dans la source : lors de la rencontre, si l'énergie cinétique des électrons est suffisante, un électron est arraché de la molécule M , la transformant en un ion radical M^{+o} . Celui-ci peut ensuite se fragmenter suivant son énergie interne. L'EI conduit ainsi à un spectre assez fourni, avec de nombreux fragments, très riche en informations structurales.

L'ionisation chimique (CI)

Source d'ionisation chimique. En plus du dispositif EI ci-dessus, un gaz réactif est introduit dans la source et ionisé par impact électronique. S'ensuit une série de réactions qui donne naissance à des ions pouvant réagir avec les molécules

d'analyte arrivant dans la source. Ce type de réactions ions-molécules produit principalement (en mode positif) des ions $[MH]^+$, et $[M+\text{adduit}+H]^+$, permettant ainsi d'accéder à la masse moléculaire de la molécule à analyser. Le méthane, l'isobutane et l'ammoniac sont parmi les gaz d'ionisation chimique les plus utilisés.

L'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB).

Elle permet d'analyser des molécules non vaporisables sous vide (grosses molécules biologiques). L'ionisation est effectuée par expulsion en phase vapeur des ions contenus dans un échantillon liquide à la suite d'un bombardement d'atomes rapides (Ar ou Xe). Les molécules ainsi ionisées n'ont pas beaucoup d'énergie interne, la fragmentation est donc faible mais l'ion moléculaire est facilement reconnaissable et la masse moléculaire est facile à déterminer.

Electrospray ionisation (ESI) ou électronébulisation

C'est une ionisation douce. Son principe est le suivant : à pression atmosphérique, les gouttelettes de solutés sont formées à l'extrémité d'un fin capillaire porté à un potentiel élevé.

Sous l'effet du champ électrique et grâce à l'assistance éventuelle d'un courant d'air, l'effluent liquide est transformé en nuage de fines gouttelettes (spray) chargées suivant le mode d'ionisation.

Durant ce parcours à pression élevée, les ions subissent de multiples collisions avec les molécules de gaz et de solvant.

En faisant varier les potentiels électriques appliqués dans la source il est possible de provoquer des fragmentations plus ou moins importantes.

L'analyseur

Les analyseurs se différencient par leur principe de mesure du rapport m/z des ions.

- Ils permettent la dispersion des ions, grâce aux instruments à secteur magnétique ou électrique
- Ils permettent la séparation des ions, en fonction de la masse moléculaire et le temps de vol ou Time Of Flight (TOF) lié avec la vitesse de vol.
- Ils permettent la transmission des ions traversant un champ magnétique ou électrodynamique ;

L'analyseur à temps de vol consiste à mesurer le temps que met un ion, accéléré préalablement par une tension, à parcourir une distance donnée. Le rapport masse sur charge est directement mesurable à partir du temps de vol.

L'analyseur à secteur magnétique

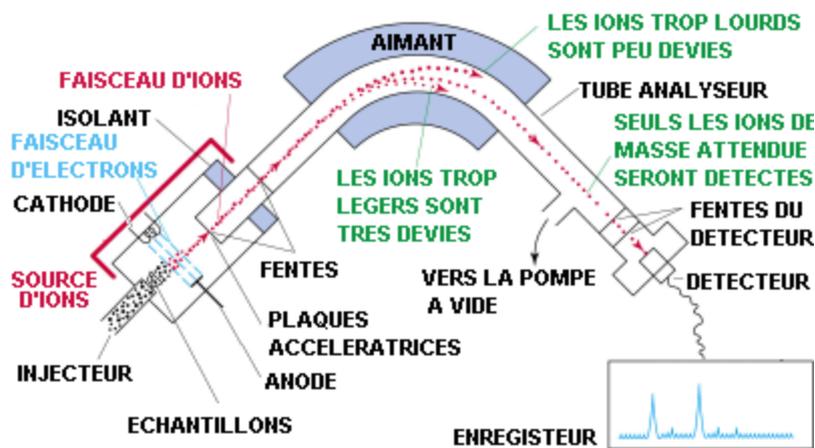


Schéma de la structure d'un spectromètre de masse.

Le détecteur

Comme les analyseurs et les sources d'ionisation, il existe différents types de détecteurs. Ils sont tous basés sur des principes physiques différents, mais leur rôle reste le même, compter les ions.

Les détecteurs sont des compteurs et amplificateurs signaux des ions, ils permettent de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Ils fournissent des informations sur le temps d'arrivée des ions au détecteur et leur intensité.

Le système informatique :

C'est au système informatique qui détermine la masse sur charge (m/z) en fonction du temps d'arrivée au détecteur et les paramètres de l'analyseur.

6. Exemple d'un spectre de masse d'une protéine x.

Il faut d'abord connaître la masse molaire de chaque élément du tableau des éléments périodiques. Tableau de Mendeliev

La masse monoisotopique, la masse atomique, masse du résidu d'acide aminé.

Les acides aminés sont composés essentiellement de :

Carbone : C	Hydrogène : H	Oxygène : O
Azote : N	Phosphore : P	Souffre : S .
Sodium : Na⁺	Potassium : K⁺	Ion Ammonium NH₄⁺

A chacun de ces éléments correspond une masse atomique.

Connaissant la formule brute d'une molécule, on peut donc calculer la masse chimique.

Par exemple, l'alanine ($\text{CH}_3\text{CHCO}_2\text{H}\text{NH}_2$), soit $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$

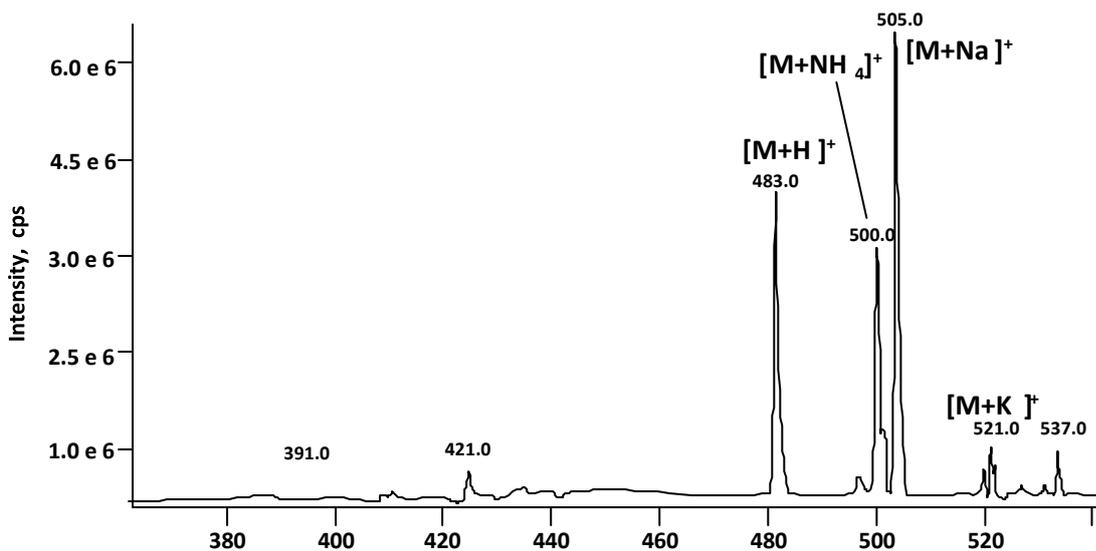
$$= (3 \times 12,01115) + (7 \times 1,00797) + (1 \times 14,0067) + (2 \times 15,9994)$$

$$= 89,09474 \text{ Da}$$

L'unité de masse (u) est appelée dalton (Da) pour une masse chimique.

Elle est définie comme 1/12 de la masse d'un atome de carbone 12 :

$$1u = 1\text{Da} = 1,660540 \times 10^{-27} \text{ kg}$$



Spectre de masse en mode positif M+H⁺ (M=482).

- *Le pic à m/z=505 (M+23) correspond à l'ion adduit [M+Na]⁺.*

- *La masse moléculaire est confirmée par la présence d'un adduit $[M+K]^+$ à $m/z=521 (M+39)$ et*
- *En acidifiant la solution avec $HCOOH$, l'ion $[M+H]^+$ apparaît sur le spectre ainsi que l'ion $[M+NH_4]^+$*

En mode positif, l'obtention de l'ion $[M+H]^+$ par transfert d'un proton sur la molécule de masse M sera majoritairement recherchée. Cet ion est en effet le plus facile à interpréter.

Très souvent aussi, la présence d'ions "adduits" peut être observée avec les cations de métaux alcalins (Na^+ , K^+) ou encore avec l'ion ammonium (NH_4^+).

7. Exercices :

Structure chimique des Acides aminés.

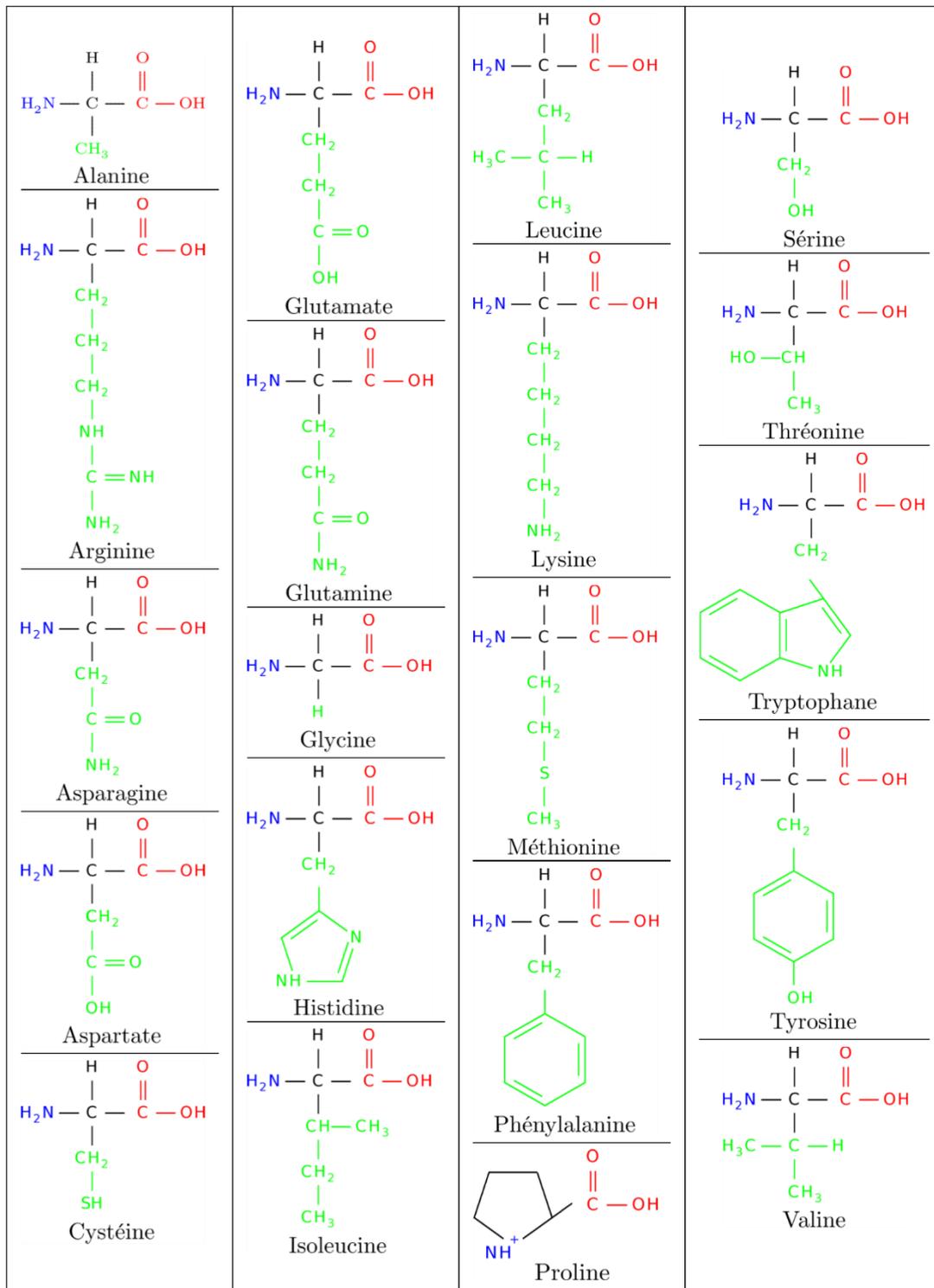


Tableau - Dénomination, code et masse monoisotopique des acides aminés.

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

Soit une protéine : Ala-gly-leu.

Donner son spectre de masse possible.

