

La spectrométrie de masse appliquée à l'étude de biomolécules

Spectrométrie de masse

- *Identification :*

- En comparant le spectre de masse d'une molécule avec des banques de spectres, il est possible d'identifier la molécule.
- Lors de l'utilisation d'un analyseur haute résolution, la spectrométrie de masse permet de mesurer avec précision la masse monoisotopique d'un ion et d'en déduire sa formule brute.

Spectrométrie de masse

- *Analyse structurale :*

- Les ions peuvent se fragmenter dans un spectromètre de masse (dans la source d'ionisation, dans l'analyseur ou dans une cellule de collision) l'étude de ces fragments permet de déterminer la structure des ions.

- *Quantification :*

- Un spectromètre de masse est un détecteur universel et très sensible. Sa gamme linéaire va de 3 à 7 ordres de grandeur, d'où la possibilité d'obtenir une quantification fiable sur un domaine large.

Spectrométrie de masse

- 😊 Très grande sensibilité (fentomole)
- 😊 Sélectivité
- 😊 Analyse échantillons minéraux, organiques, bio-organiques quel que soit leur état physique: gazeux, liquide ou solide.
- 😊 Domaine d'application: la médecine, la biologie, la pharmacologie, l'industrie chimique, alimentaire, la pétrochimie, l'archéologie, la géologie, l'environnement, le nucléaire...

Qu'est ce que la spectrométrie de masse?

C'est une méthode de mesure des rapports

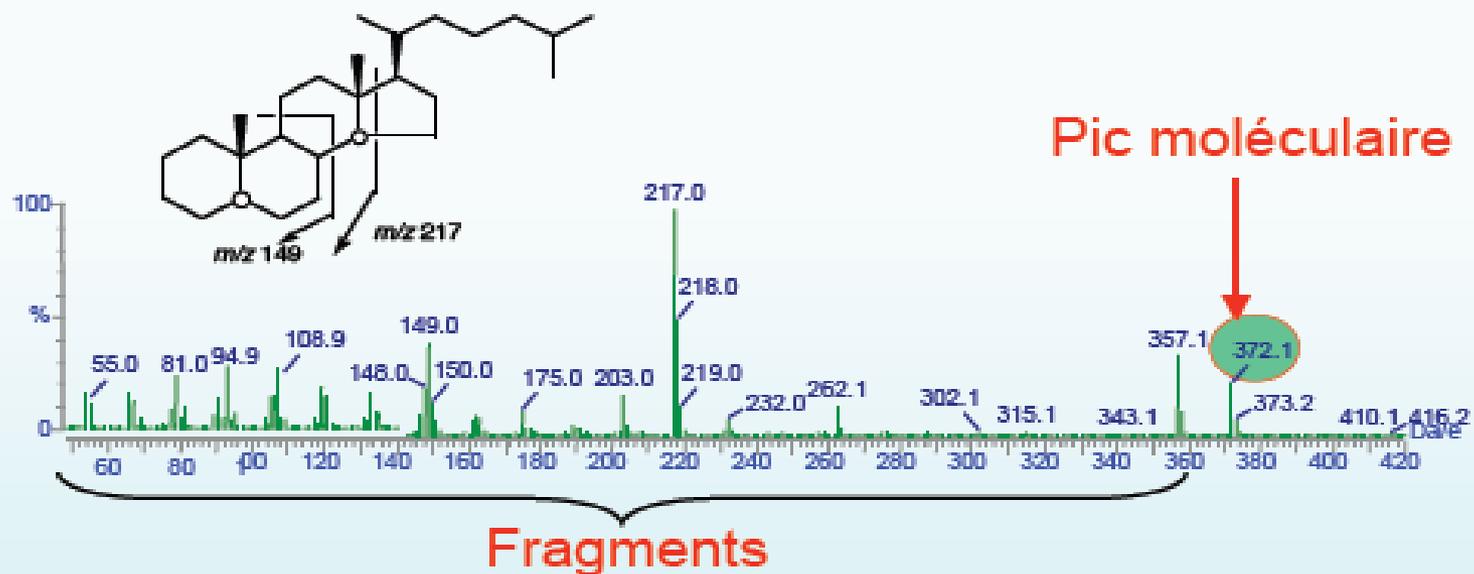
masse/charge (m/z) exprimé en Thomson (Th)

de molécules et de leurs produits de fragmentations

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.

Pic moléculaire et masse moléculaire: Définition

- L'existence d'isotopes se traduit par la présence de plusieurs pics moléculaires
- On observe non pas un pic moléculaire, mais un GROUPE de pics moléculaires (un massif moléculaire ou cluster moléculaire)
- La présence d'isotopes complique donc la définition et la mesure du « pic moléculaire »

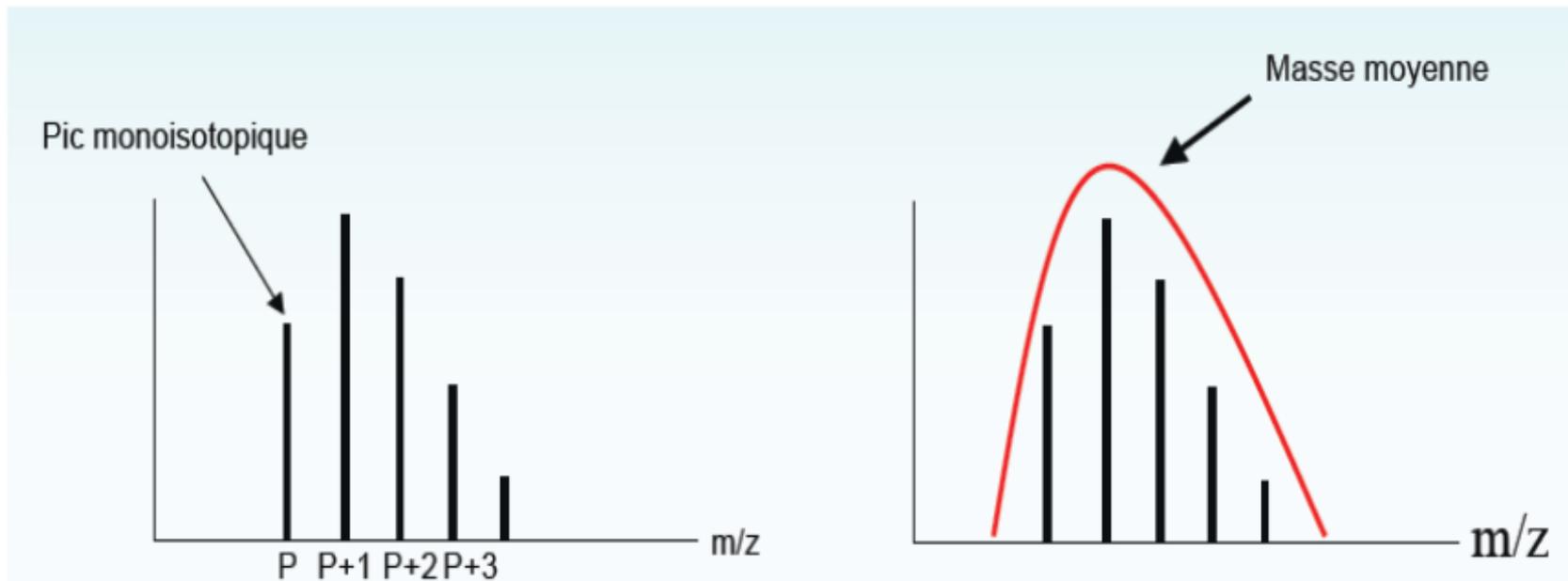
Isotopes naturels

Masse monoisotopique

C'est la masse du premier pic du profil isotopique c'est-à-dire celle qui ne prend en compte que les masses des isotopes les plus stables (C^{12} , H^1 , O^{16} , S^{32} , N^{14} , ...).

Masse chimique ou moyenne

C'est le barycentre (centroïde) des masses des pics constituant le profil isotopique c'est-à-dire la masse qui prend en compte la masse des éléments donnée par le tableau périodique ($C=12,011$).



Le spectromètre de masse

- Il permet l'identification et la quantification des analytes.
- Tous les procédés de spectrométrie de masse reposent sur les déplacements de particules chargées dans les champs électromagnétiques.
- Un spectromètre de masse se compose de trois parties distinctes:
 - une source
 - un analyseur
 - un détecteur

Le spectromètre de masse

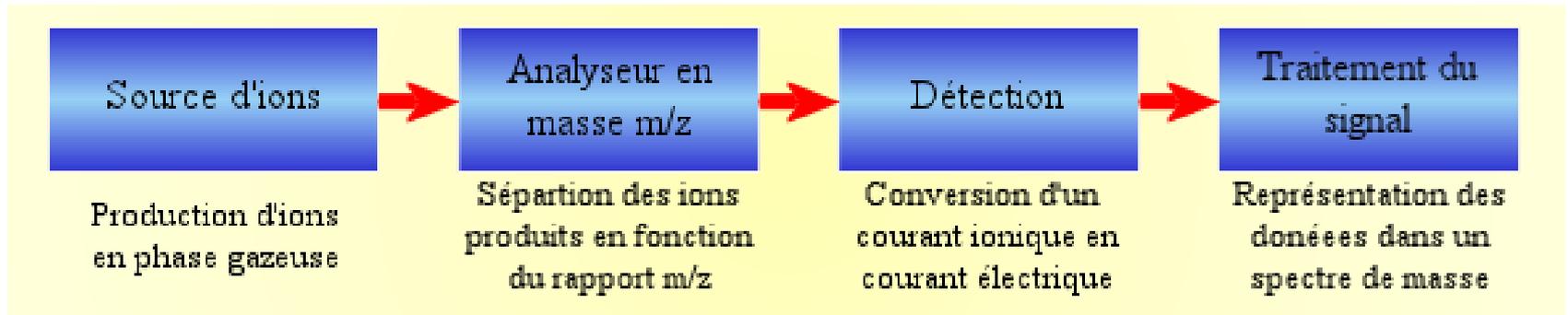


Schéma d'un spectromètre de masse

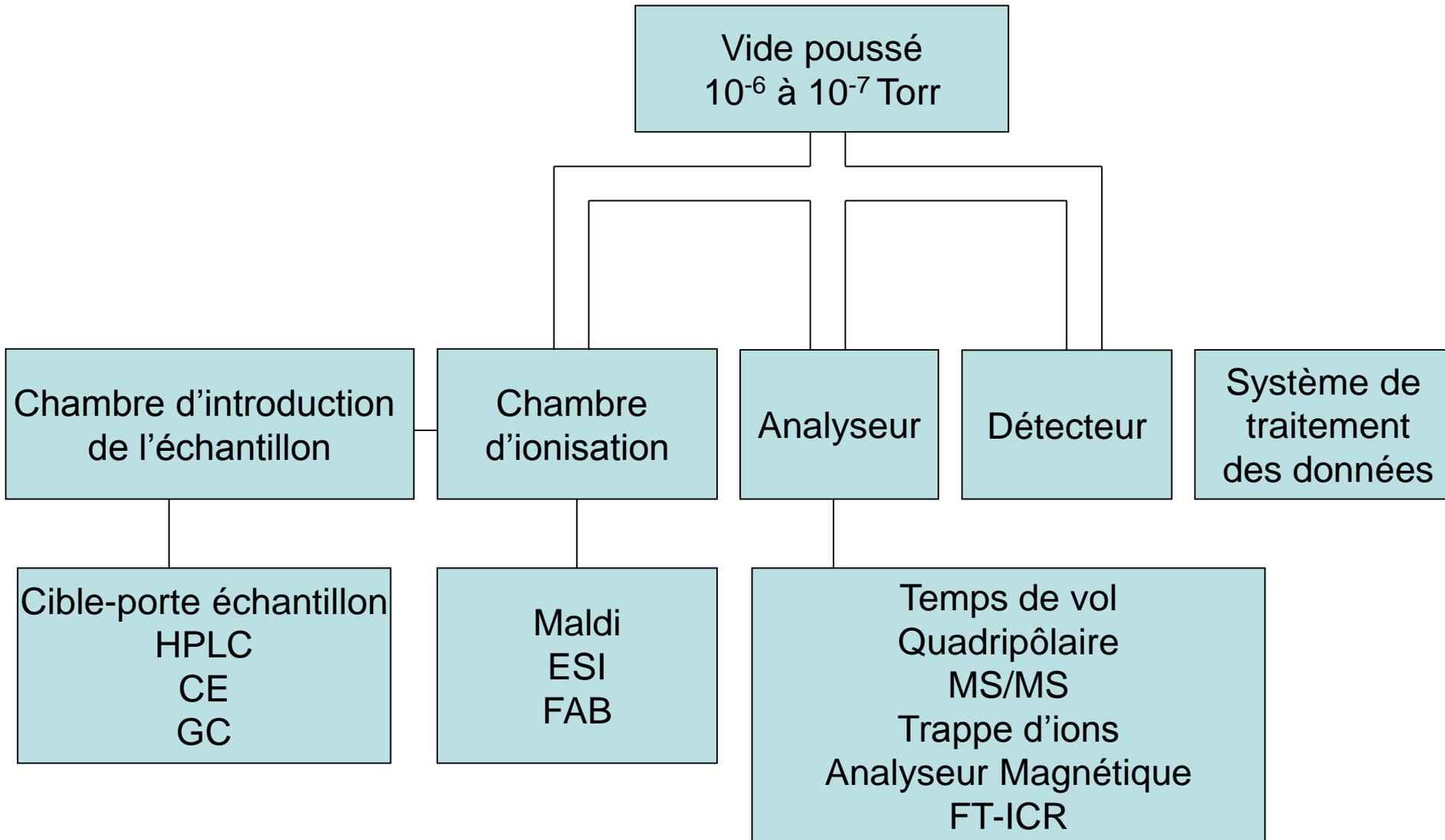


Schéma d'un spectromètre de masse

- ***En amont du spectromètre de masse:*** Le **système d'introduction** de l'échantillon dans le spectromètre de masse.
- ***En aval du spectromètre de masse:*** Un **ensemble informatique de traitement des données** qui permet de transformer les informations reçues par le détecteur en spectre de masse.

Structure d'un spectromètre de masse

Un spectromètre de masse se décompose en 3 parties :

- La chambre d'ionisation qui permet de produire des ions en phase gazeuse.
- L'analyseur qui permet de séparer les différents composés en fonction du rapport m/z.
- Le détecteur qui permet de convertir le courant ionique en courant électrique mesurable.

Comment s'ionisent les molécules?

- Soit par protonation des sites basiques, détection des ions positifs
- Soit par déprotonation des sites acides, détection des ions négatifs

Chambre d'introduction de l'échantillon

- L'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme:
 - **liquide** (infusion directe)
 - ou **solide** (canne d'introduction directe, dépôt sur plaque MALDI, ...)
 - ou par l'association à **une méthode séparative** (chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse, électrophorèse capillaire...)

La source d'ionisation

Son rôle est de vaporiser les molécules et de les ioniser. Elle peut être utilisée soit en mode positif (étude des ions positifs), soit en mode négatif (étude des ions négatifs). Il existe de nombreux types de sources d'ions

La source d'ionisation

Les critères de choix :

- 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 différentes sources

Production d'ions
en phase gazeuse

Molécules volatiles		Chauffage et introduction du gaz	L'ionisation chimique
	Phase solide (microcristaux)	Impact laser	Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice
Molécules non volatiles	Phase liquide	Dispersion en microgouttelettes sous haute tension	Electronébulisation

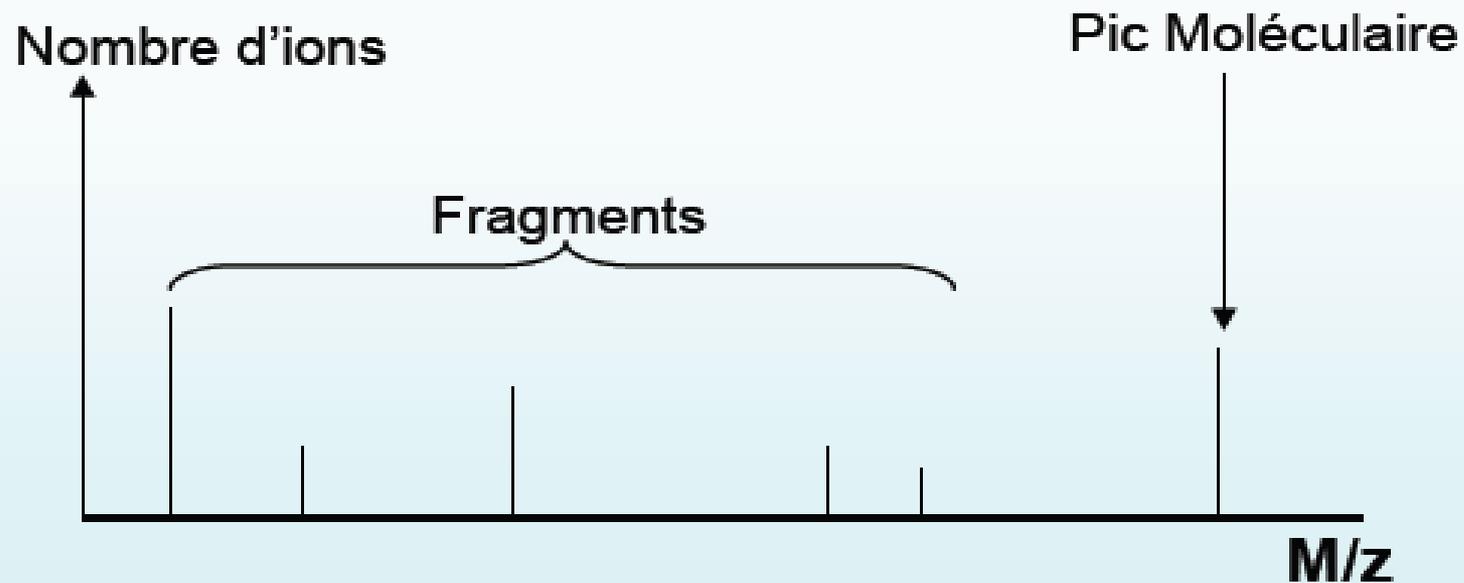
Les sources d'ions se classent en sources « dures » et en sources « douces »

Les « ionisations dures » génèrent des ions moléculaires à nombre impair d'électrons, qui se fragmentent parfois totalement avant d'avoir eu le temps de sortir de la source (ions métastables).

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.

Quelles informations peut apporter une source à ionisation dure ?

- 1- La **masse moléculaire** d'un composé
- 2- La masse des **fragments** de ce composé
- 3- Une mesure de la **quantité**

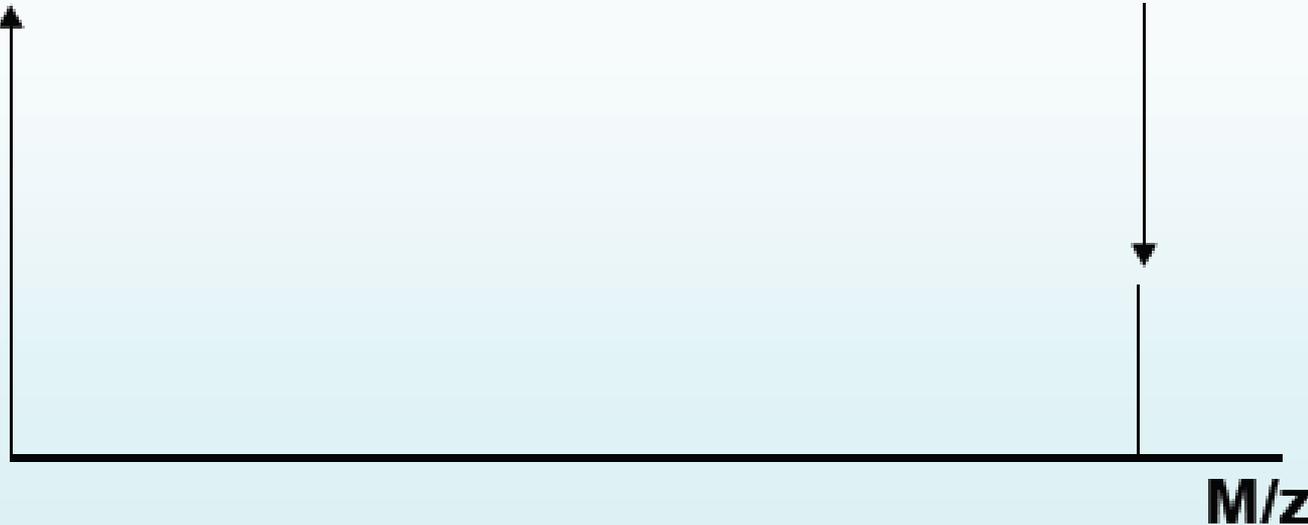


Quelles informations peut apporter un source à ionisation douce ?

- 1- La **masse moléculaire** d'un composé
- 2- Pas de fragmentation
- 3- Une mesure de la **quantité**

Nombre d'ions

Pic Moléculaire



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'électronebulisation (electrospray: ES ou ESI)		Douce

L'ionisation chimique s'adresse à des composés volatils, apolaires et stables à la chaleur



CH_4 (méthane) en large excès

e^- électron de haute énergie

M (analyte)



Une molécule de méthane qui reçoit l'impact d'un électron à haute énergie émis par un filament chauffé à haute température va subir l'arrachage d'un électron pour donner un ion radicalaire chargé positivement ($\text{CH}_4^{\cdot+}$).

Il s'ensuit une réaction qui donne naissance à des ions CH_5^+ pouvant réagir avec les molécules d'analyte (M) arrivant dans la source.

Ce type de réactions ions-molécules produit principalement des ions $[\text{MH}]^+$ et $[\text{MCH}_4]^{\cdot+}$.

D'autres gaz d'ionisation chimique peuvent être utilisés, tels que l'isobutane et l'ammoniac.

Spectrométrie de masse: Analyse de biomolécules

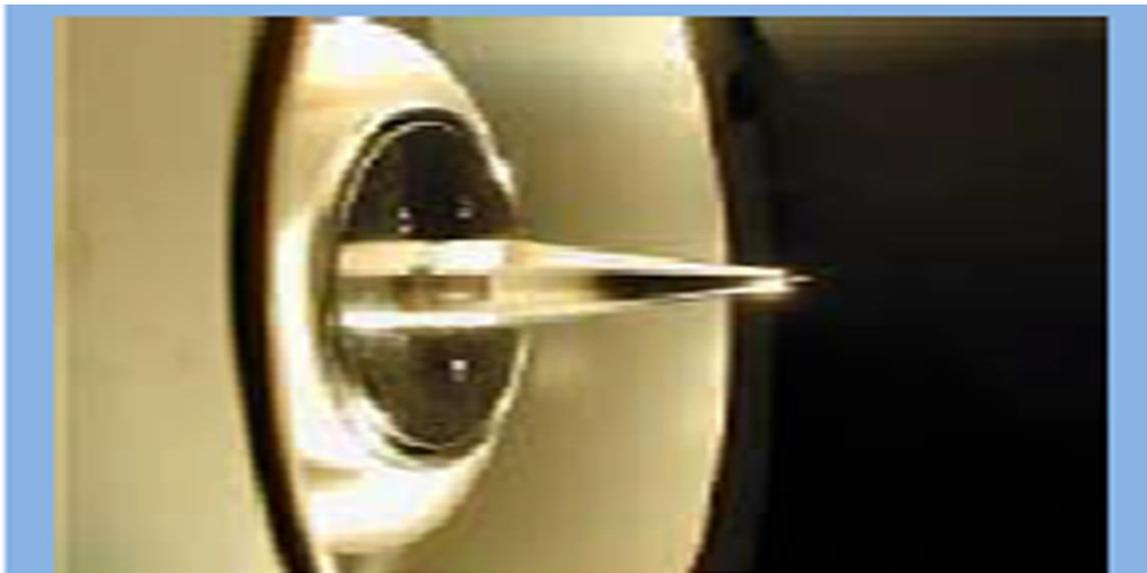
- Sources utilisées pour l'analyse de biomolécules:
 - L'ESI (ionisation par électrospray)
 - Le MALDI (ionisation désorption laser assistée par matrice)

SPECTROMÉTRIE DE MASSE à source électrospray

- Mode d'ionisation adapté à l'analyse de composés polaires et thermosensibles
- Mode d'ionisation à la **pression atmosphérique** et à **température ambiante**
- L'ESI est également applicable à des molécules ne possédant aucun site ionisable grâce à la formation d'adduits sodique, potassique, ammonium...

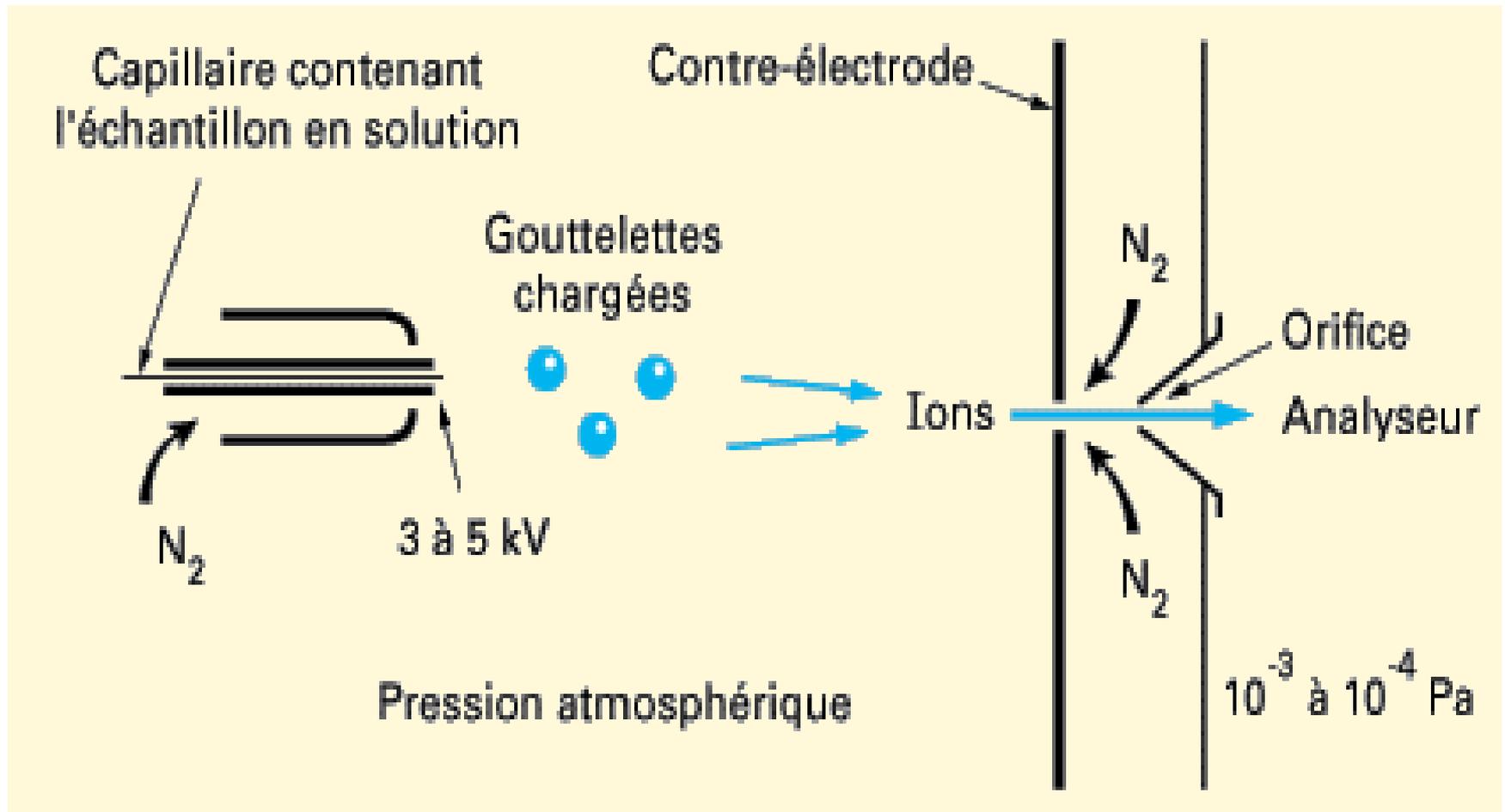
SPECTROMÉTRIE DE MASSE à source électrospray

L'échantillon en solution est introduit (au moyen d'un pousse-seringue ou d'une pompe chromatographique) dans l'appareil par l'intermédiaire d'un capillaire dont l'extrémité traverse une aiguille métallique portée à un potentiel de plusieurs kilovolts (typiquement 3 à 5 kV).



Détail d'une source d'ionisation par électrospray

Interface électrospray



SPECTROMÉTRIE DE MASSE à source électrospray

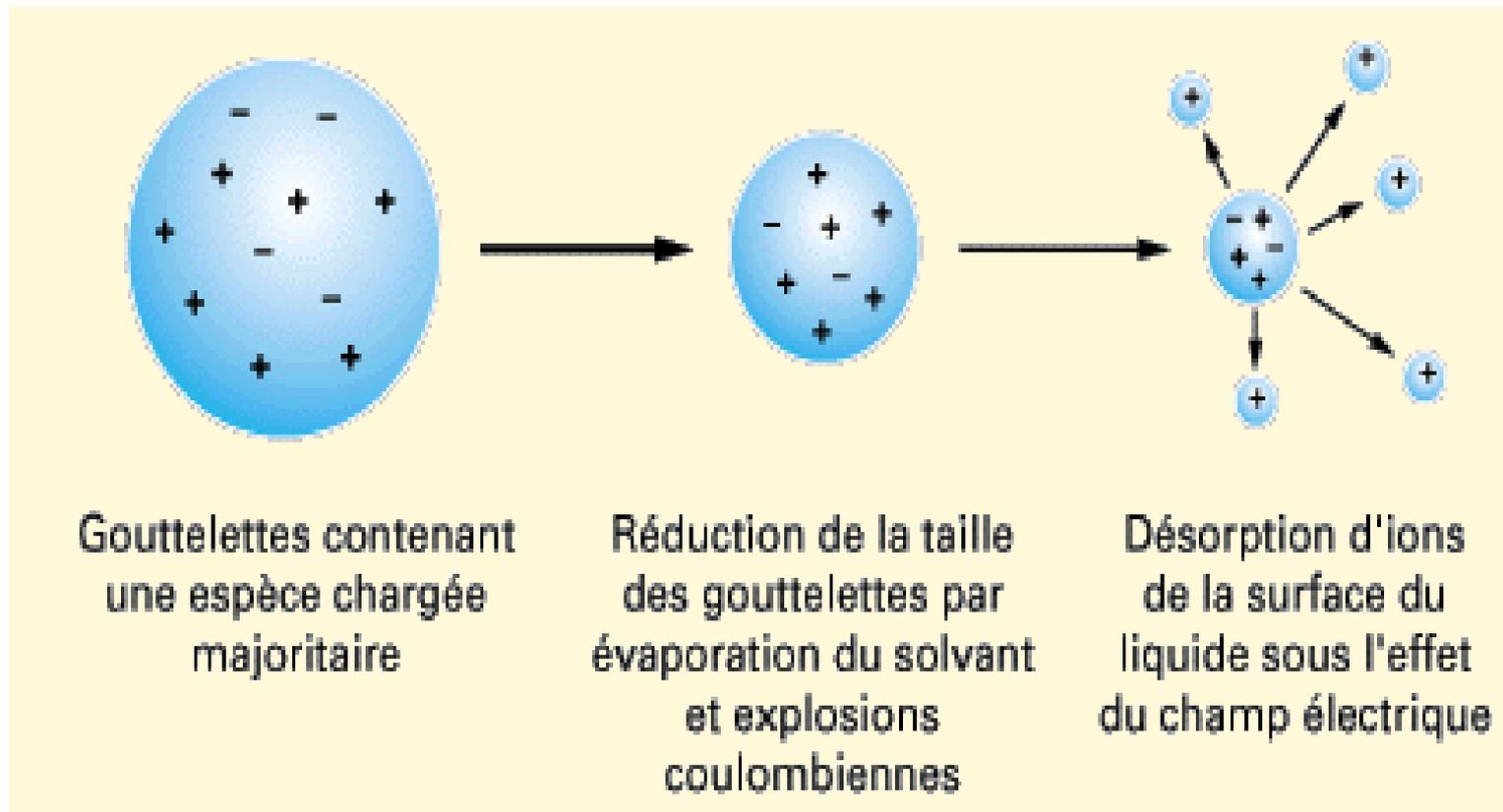
- A quelques millimètres de l'aiguille est placée une contre-électrode permet de diriger le faisceau ionique vers l'interface.



- Un flux d'azote, dirigé le plus souvent à contre-courant du trajet des ions, joue un rôle prépondérant dans le processus de désolvatation puisqu'il permet de *sécher* les solvants résiduels.

Mécanisme d'ionisation en électrospray

- La formation d'ions, sous l'action d'un champ électrique est appelé **nébulisation électrostatique**.



Mécanisme d'ionisation en électrospray

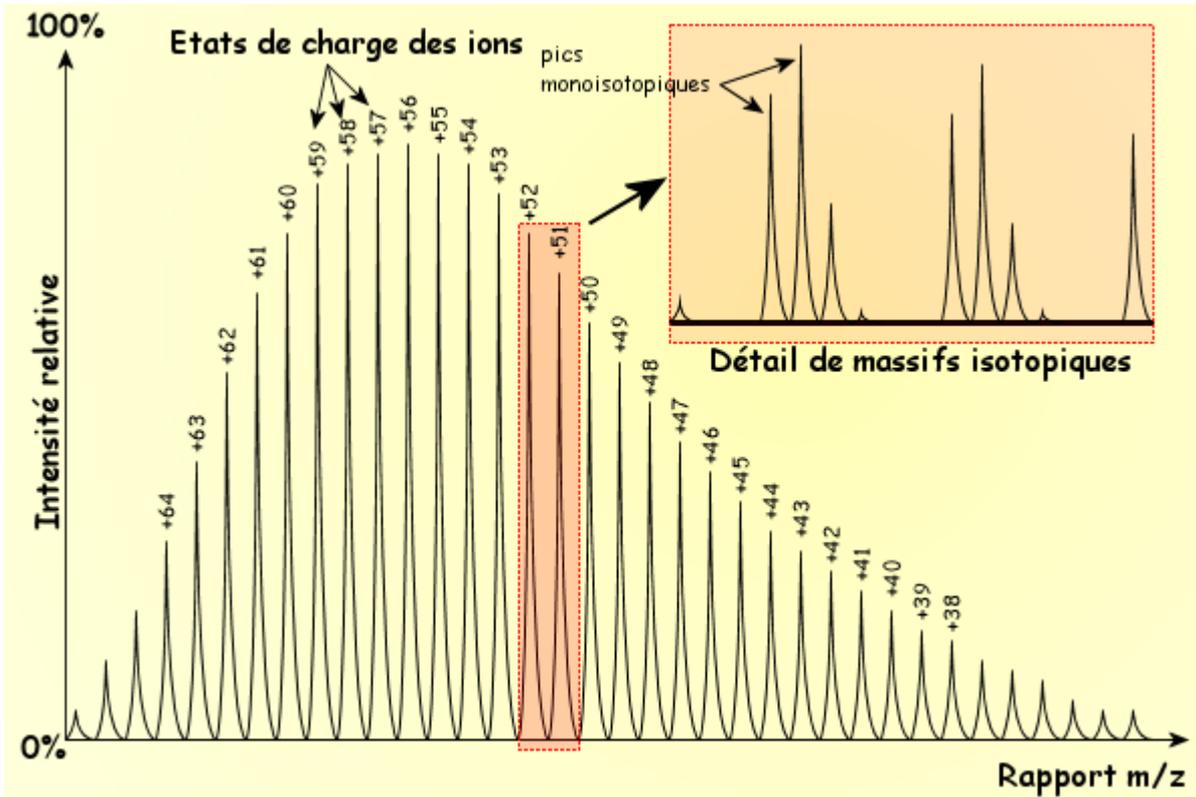
- Au fur et à mesure de l'évaporation du solvant, la taille des gouttelettes diminue jusqu'à ce que les répulsions électrostatiques entre charges de même signe à leur surface soient telles qu'il y a **explosion coulombienne**.
- Une succession d'explosions coulombiennes provoquent une diminution de la taille des gouttelettes. On obtient ainsi des ions pouvant contenir plusieurs charges.

Mécanisme d'ionisation en électrospray

La formule globale d'un ion est $[M+nH]^{n+}$

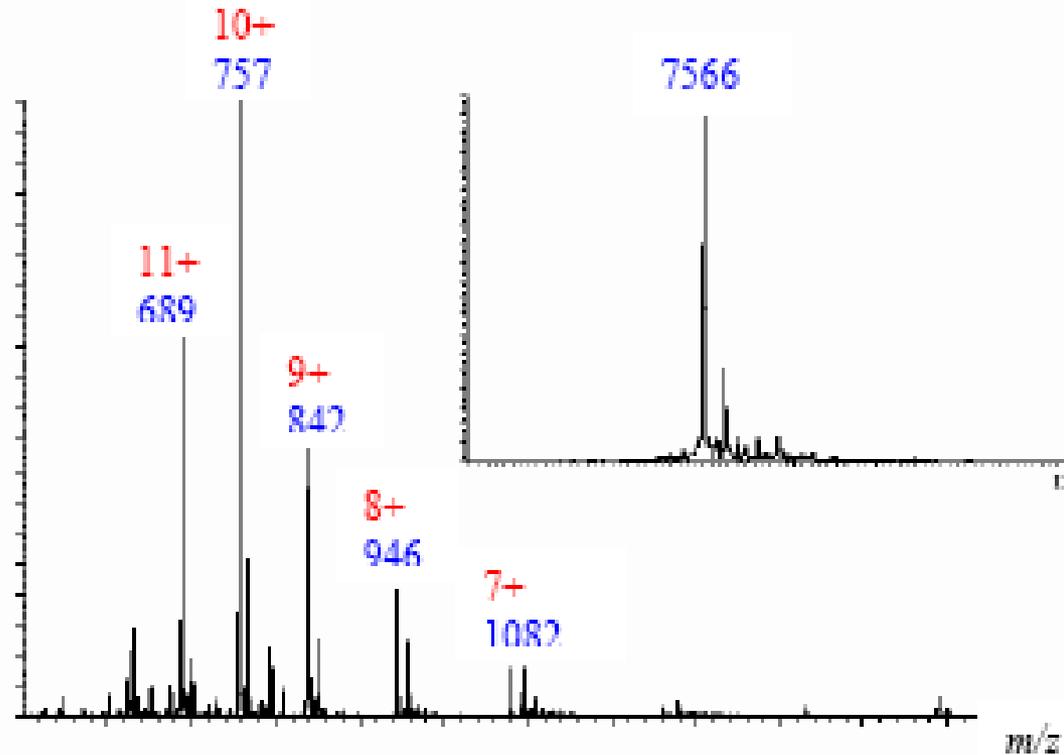
Le nombre de proton porté par chaque ion est très variable, n pouvant aller jusqu'à plusieurs dizaines.

En pratique, on observe sur un spectre de masse la présence de nombreux ions de charges différentes (par exemple $[M+3H]^{3+}$, $[M+4H]^{4+}$, $[M+5H]^{5+}$, $[M+6H]^{6+}$, $[M+7H]^{7+}$, ...) donnant une distribution d'ions multichargés (au masse $\underline{m/z} = (M+3)/3$, $(M+4)/4$, $(M+5)/5$, $(M+6)/6$, $(M+7)/7$, ...)



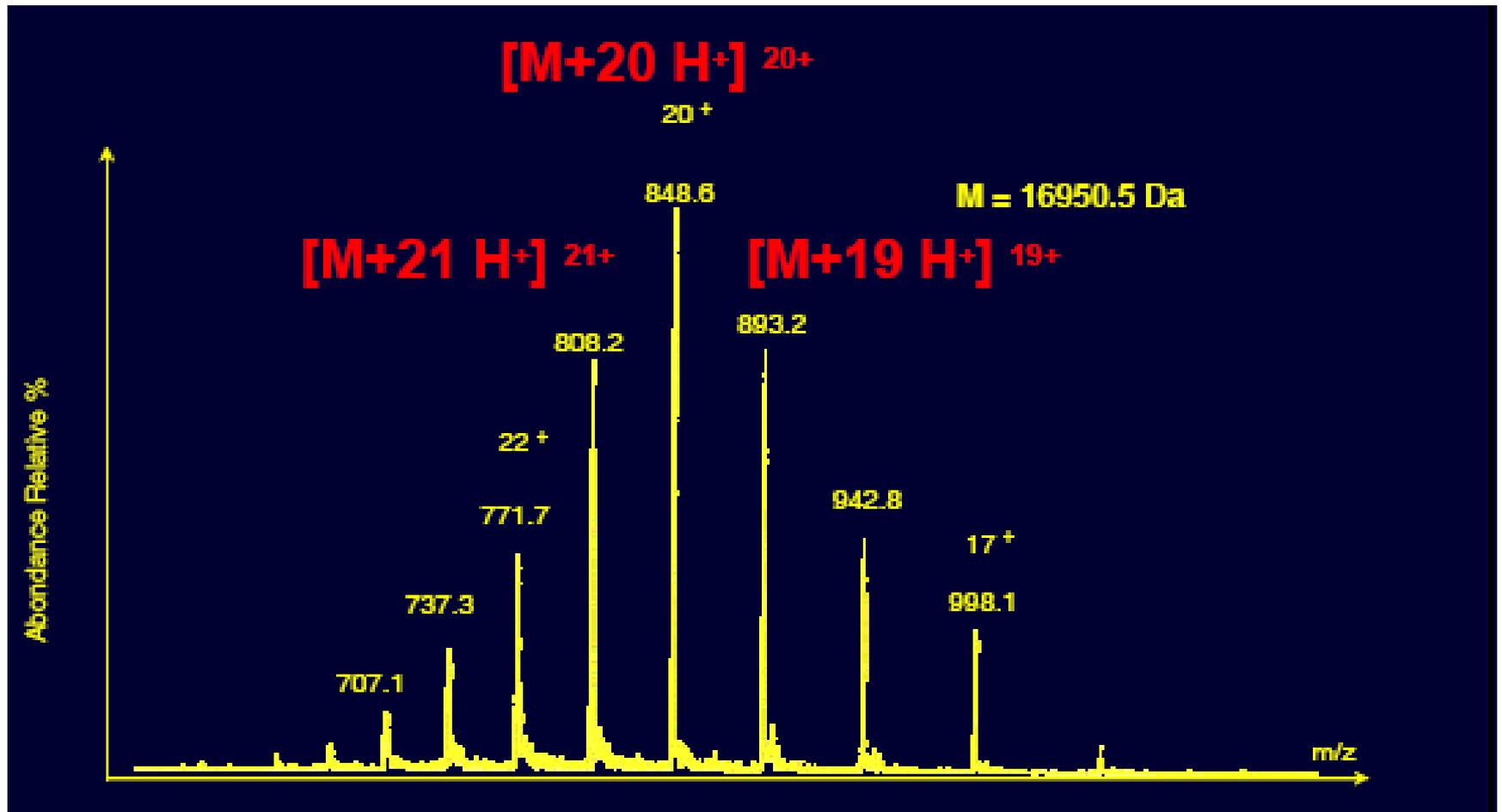
Chaque pic du spectre représente la même molécule possédant des états de charge différents, deux ions adjacents se différenciant toujours par une seule charge. Il est très facile de calculer le nombre de charges d'un pic, pour enfin calculer la moyenne statistique de la masse moléculaire à partir de chacun des états multichargés. Notons que tous les appareils sont équipés d'algorithmes qui effectuent ces calculs automatiquement.

Exemple: Spectre de déconvolution

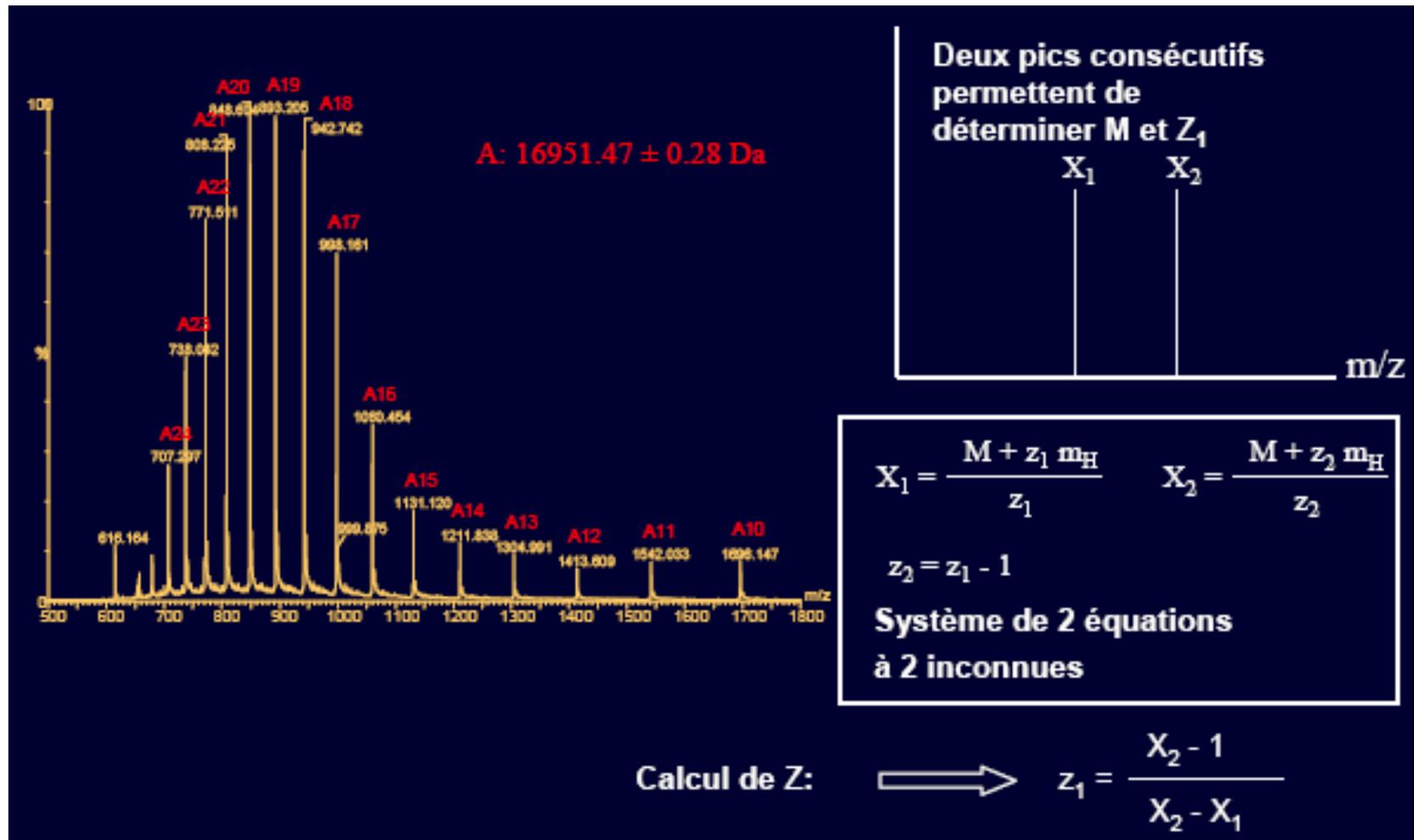


Spectre de masse electrospray d'une protéine (en rouge: nombre de charge z , en bleu: valeur de m/z , en insert, déconvolution du spectre).

Spectre ES-MS de la myoglobine de cœur de cheval



Détermination de la masse moléculaire par ESMS



Il faut d'abord déterminer les valeurs de z

Calcul de la masse moléculaire de la myoglobine à partir de la série d'ions multichargés du spectre ESI

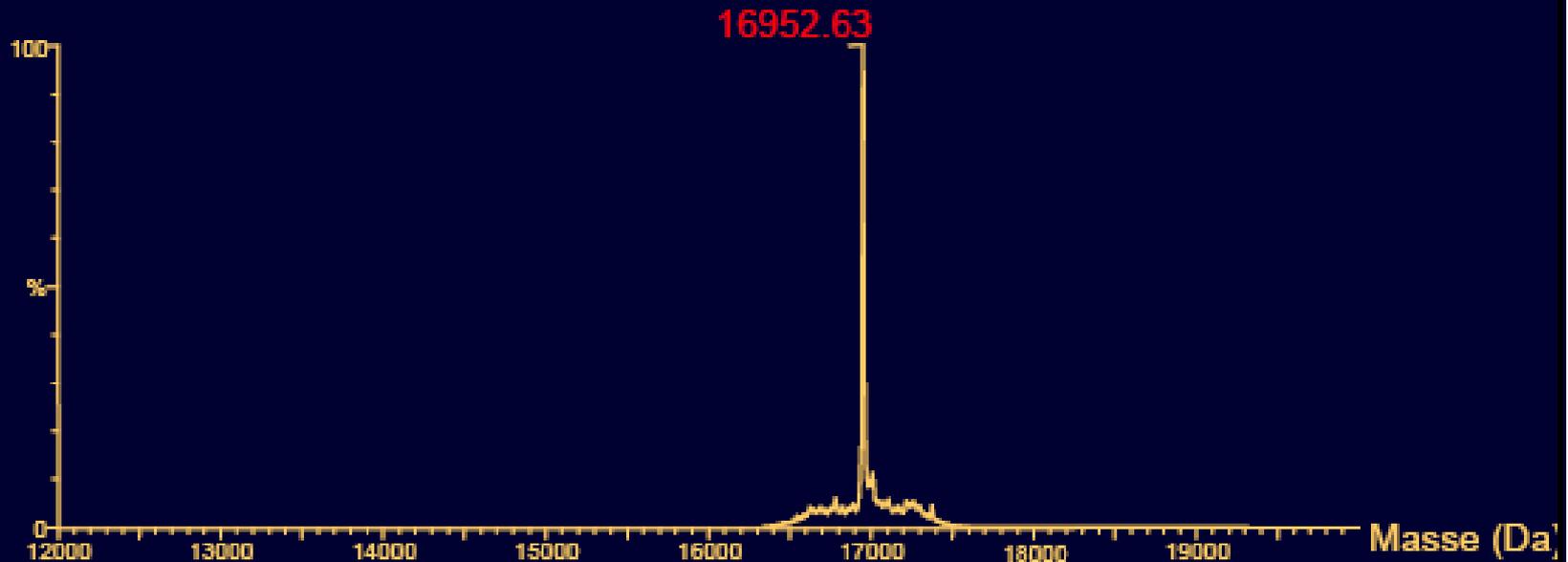
m/z	z	Masse
679,12	25	16953,00
707,31	24	16951,44
737,99	23	16950,77
721,5	22	15851,00
808,28	21	16952,88
848,53	20	16950,60
893,24	19	16952,56
942,67	18	16950,06
998,18	17	16952,06
1060,41	16	16950,56
1130,95	15	16949,25
1211,81	14	16951,34
Moyenne :		16951,65 +/- 0,17 Da

Une fois que les valeurs de z sont déterminées (en résolvant le système d'équation à 2 inconnues M et z), la masse moléculaire de la protéine est recalculée à partir de chaque pics.

La moyenne des valeurs trouvées pour la masse moléculaire est calculée avec **une déviation standard**.

Plus il y a d'ions multichargés, plus la masse pourra être mesurée avec précision

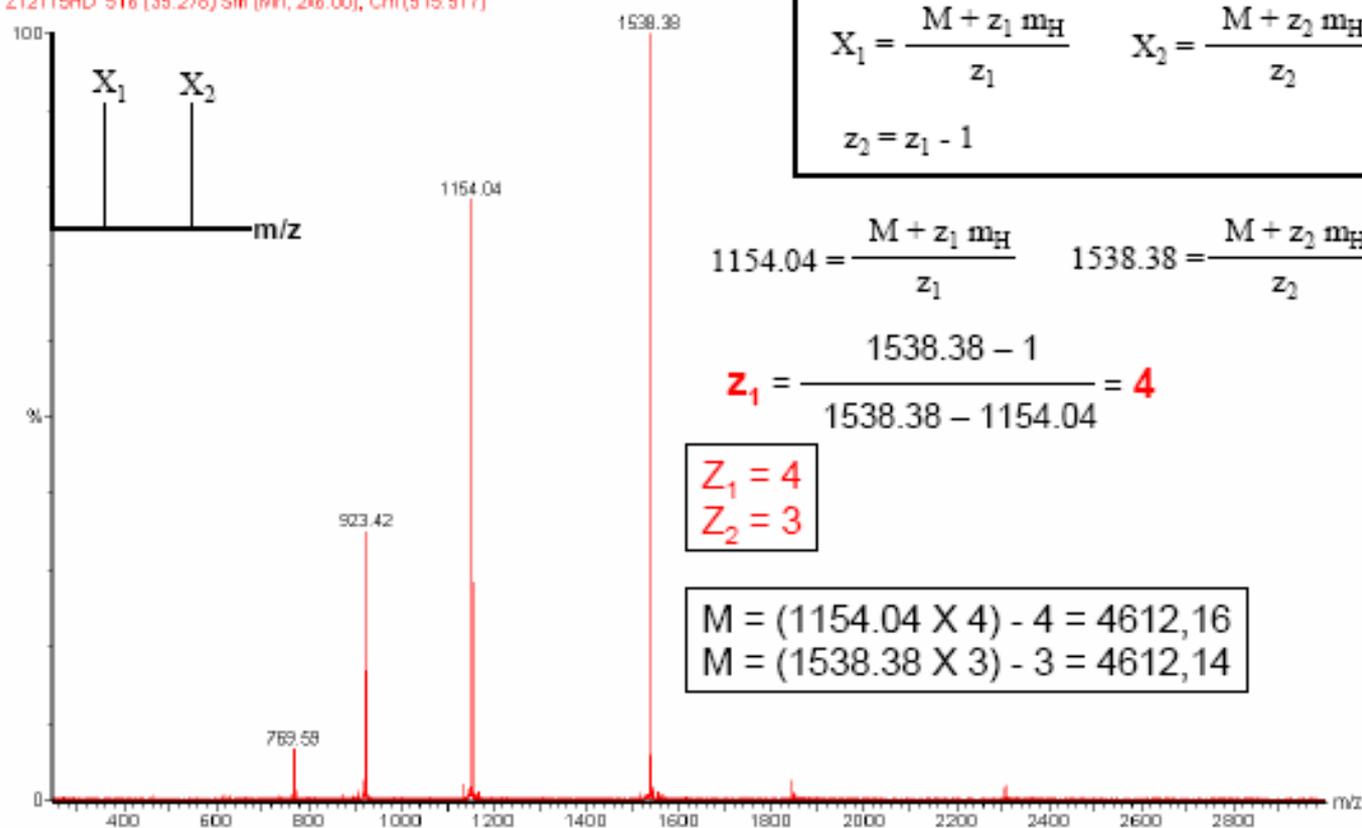
Transformation d'un spectre ESI d'ions multichargés



Les intensités absolues de tous les ions multichargés (en m/z) de la myoglobine sont additionnées pour donner le pic de masse moléculaire chimique

Calcul de la masse du peptide

Z12115HD 516 (35,278) Sm (Mn, 2x8,00); Cm (515,517)



Le couplage LC/MS ou LC/MS/MS

- Le couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse (CL/SM) est particulièrement utile pour l'analyse de composés **polaires, peu volatils ou thermiquement instables**.
- Il permet de déterminer *en ligne* la masse moléculaire des constituants d'un mélange et d'avoir des informations quant à leur structure (techniques SM/SM).

Difficulté majeure du couplage LC/MS:

- L'obtention d'ions en phase gazeuse à partir des solutés en phase liquide, nécessite des interfaces très spécifiques.
- Aussi l'électrospray, processus d'ionisation qui se produit à la fois en phase liquide, à la pression atmosphérique et à température ambiante est à l'heure actuelle la technique la mieux adaptée.

Le choix de l'éluant

Les éluants qui vont constituer la phase mobile qui va permettre l'élution des composés doivent rester compatibles avec la spectrométrie de masse et de ce fait ne pas interférer lors de l'ionisation des composés au niveau de l'interface.

Les éluants doivent remplir 3 conditions :

1. Élués l'ensemble des composés fixés sur la colonne
2. Volatils
3. Contenir peu de sels ou d'électrolytes qui perturberaient l'ionisation

Importance du débit pour la sensibilité



Le débit à une importance capitale sur la sensibilité

L'électrospray est concentration dépendant: en effet, l'intensité du courant d'ions produit dépend de la concentration de la solution et ***non pas*** du débit auquel la solution est injectée.

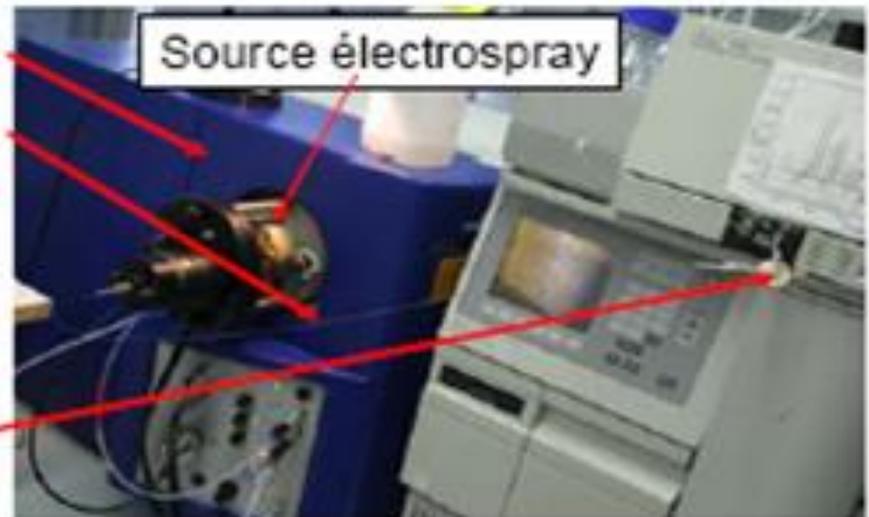
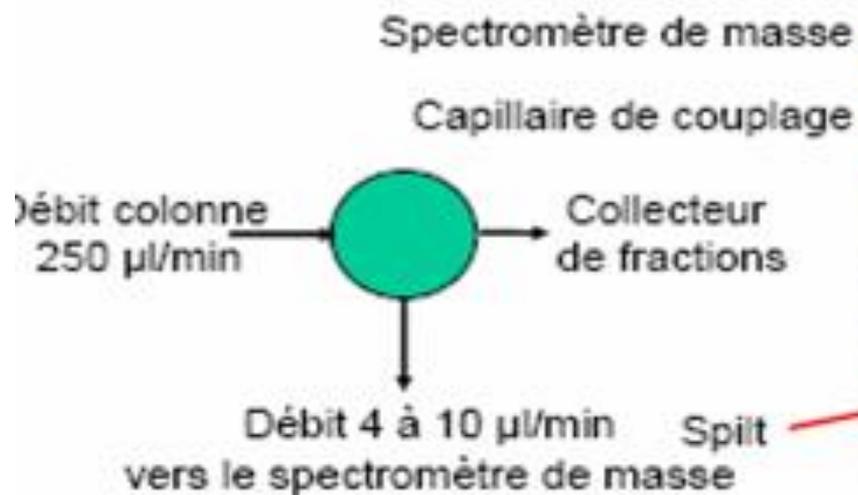
Il vaut donc mieux injecter une solution concentrée au débit la plus faible possible. Ceci permet notamment d'utiliser moins de gaz

Conditions à réunir

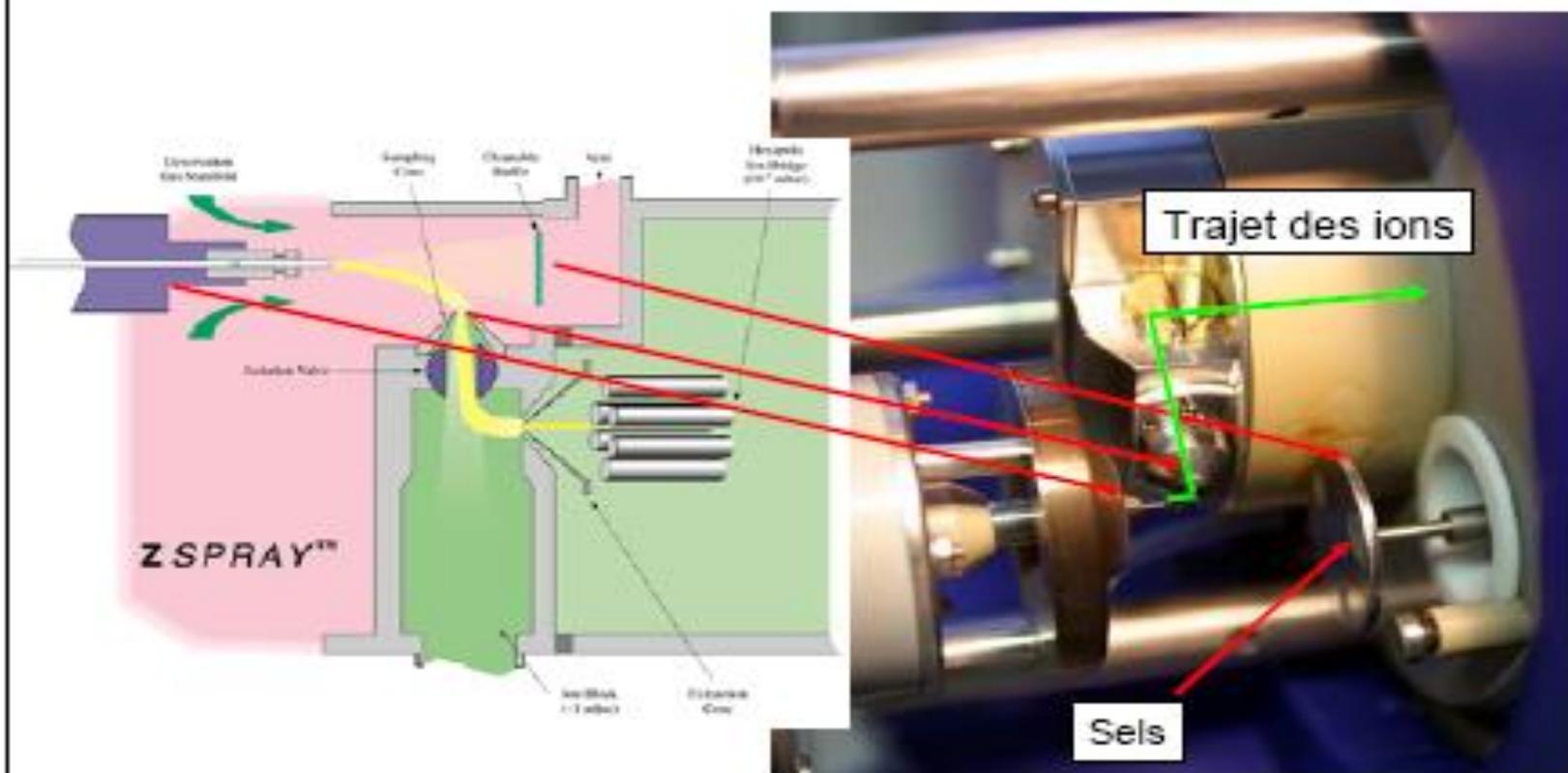
Compatibilité de débit : généralement les débits doivent être compris entre quelques microlitres et quelques centaines de microlitres par minute. L'utilisation de microcolonnes est donc particulièrement adaptée. Au-delà de 200-300 $\mu\text{L}/\text{min}$, la sensibilité diminue.

On installe en sortie de colonne un diviseur de débit.

Réduction du débit: utilisation d'un Split

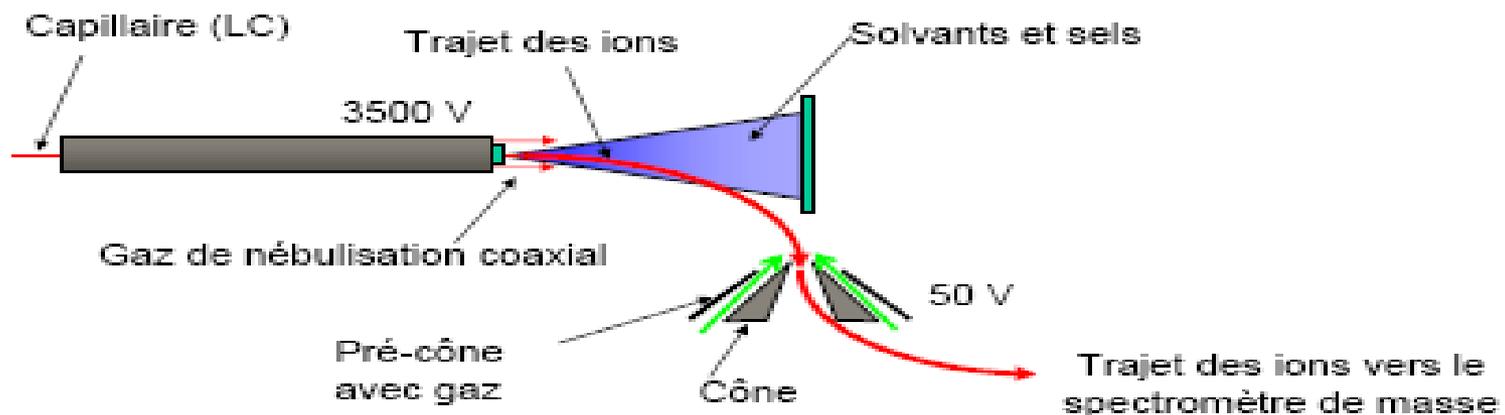


Source électrospray en Z de Micromass



De la génomique à la protéomique : l'apport de la spectrométrie de masse
Jean-Marc Strub (5-10 décembre - Roscoff)

Schéma de la source électrospray en Z de Micromass



Les sources Z-spray et orthogonal

Les sources Z-spray (Micromass) et orthogonal (Bruker) ont l'avantage d'obliger les ions formés en sortie du capillaire provenant de la LC de faire un angle sur leur trajet avant de rentrer dans le spectromètre de masse.

Cette géométrie de source à angle droit ou en Z permet une certaine tolérance aux sels et évite à la source de se salir trop rapidement et donc de perdre en sensibilité.

Choix du contre-ion pour le couplage LC-MS

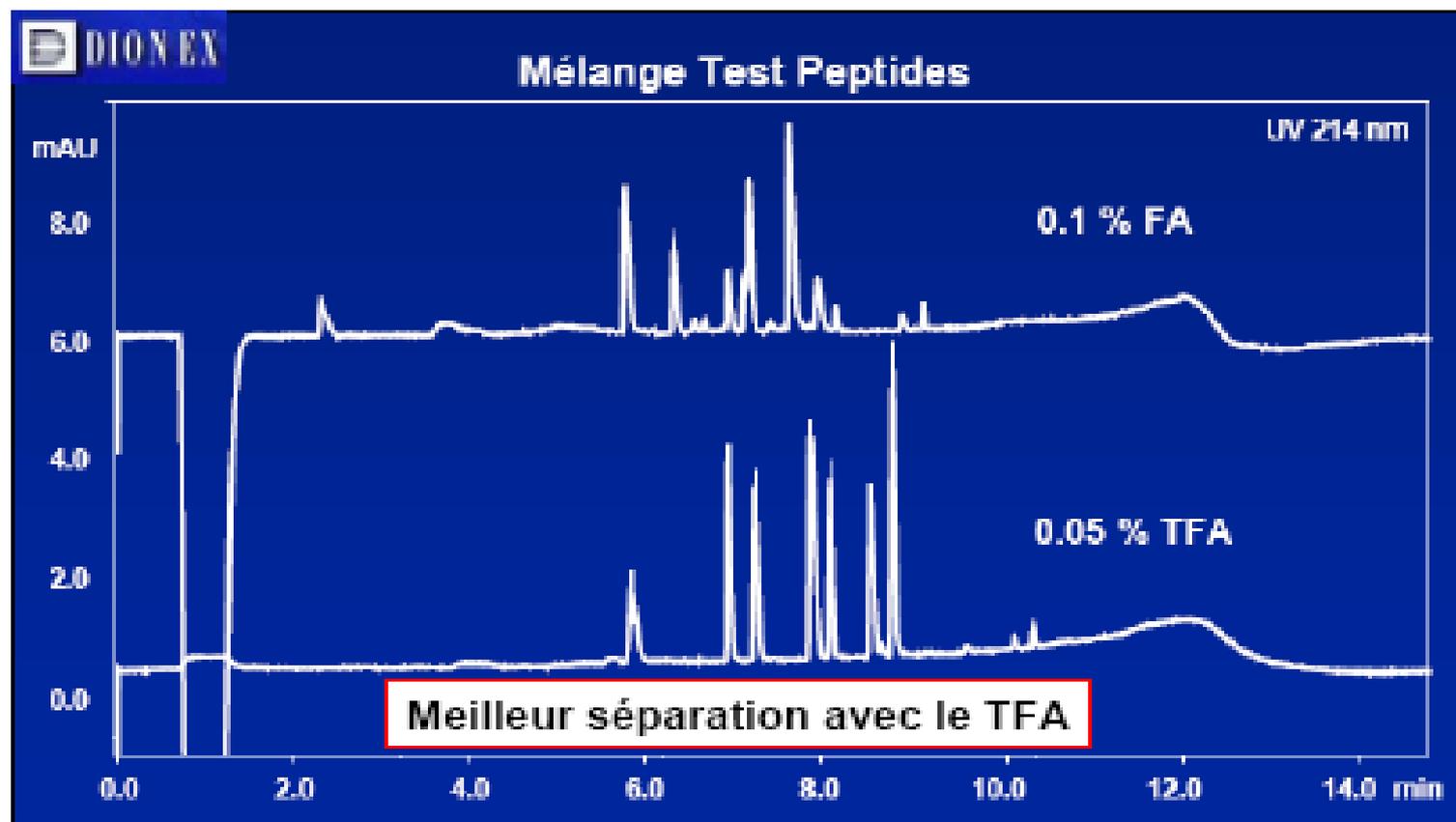
Le couplage LC-MS en mode électrospray nécessite l'utilisation d'un acide organique pour protoner l'analyte afin de pouvoir l'observer ($M+H^+$).

Des acides minéraux tels que HCl ou H_2SO_4 ne sont pas utilisés car les contre-ions peuvent former des paires d'ions très stables avec les groupements positifs (NH_3^+ ...) de l'analyte entraînant une perte de sensibilité.

Trois acides sont plus communément utilisés :

- acide trifluoroacétique (**TFA**) _ pKa : 0,30
- acide formique (**HCOOH**) _ pKa : 3,75
- acide acétique (**CH₃COOH**) _ pKa : 4,75

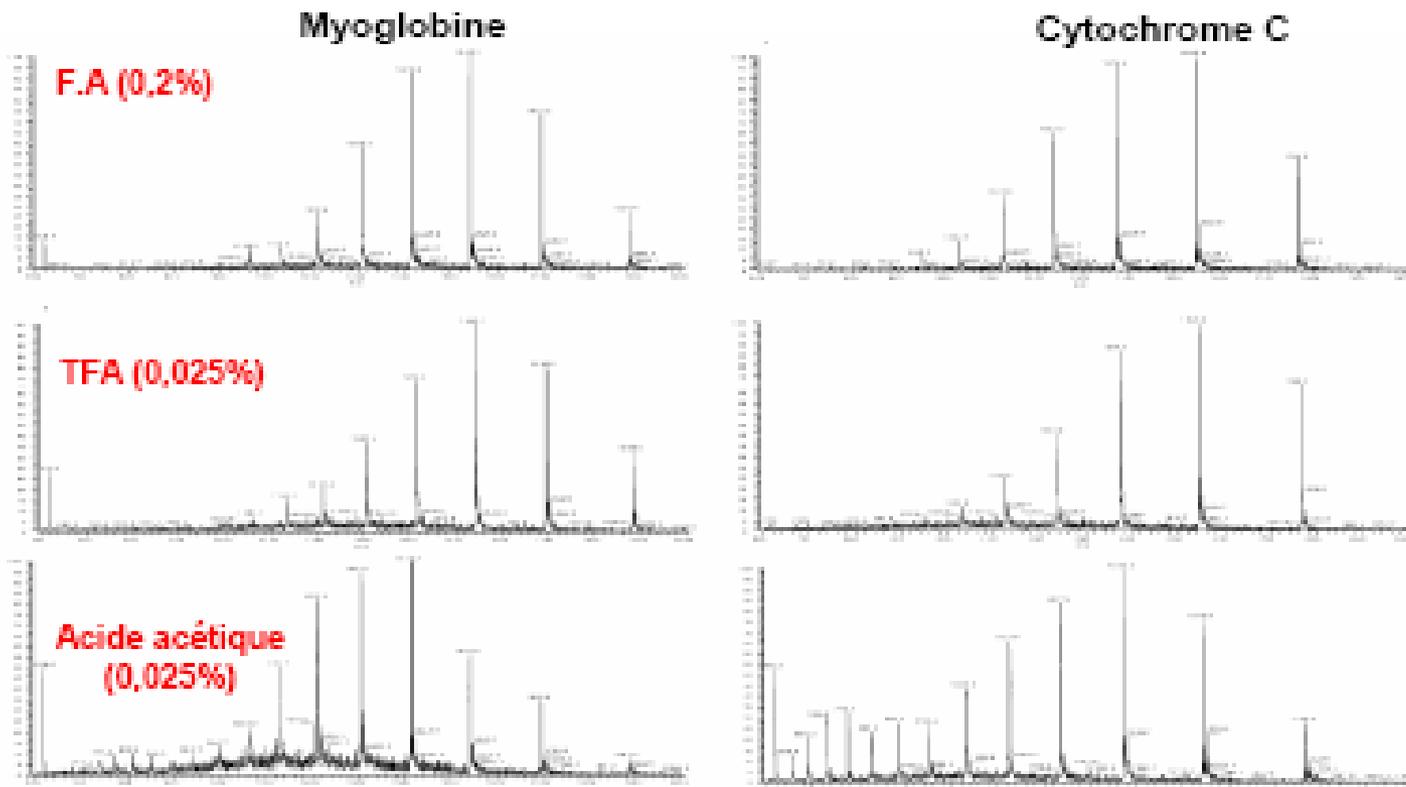
Influence du contre-ion sur la qualité de la séparation chromatographique



De la génomique à la protéomique : l'apport de la spectrométrie de masse
Jean-Marc Strub (5-10 décembre – Roscoff)

Influence du contre-ion sur la sensibilité en LC-MS électrospray (acides)

M.C. Garcia et al. J. Chromatogr. A 957 (2002) 187-197



Déplacement de l'état de charge

De la génomique à la protéomique : l'apport de la spectrométrie de masse
Jean-Marc Strub (5-10 décembre - Roscoff)

Caractéristique de l'électrospray

- génère des **ions multichargés**
- introduction des **échantillons en solution**

Couplage à des analyseurs quadripolaires (Q-TOF, IT):

- sensibilité : **10^{-14} moles**
- résolution : **5000 en routine**, précision : **50 ppm**
- MS/MS : **information de séquence**

Couplage à la chromatographie liquide (nanoLC) :

- séparation des composés en mélange : **pas de suppression de signal**

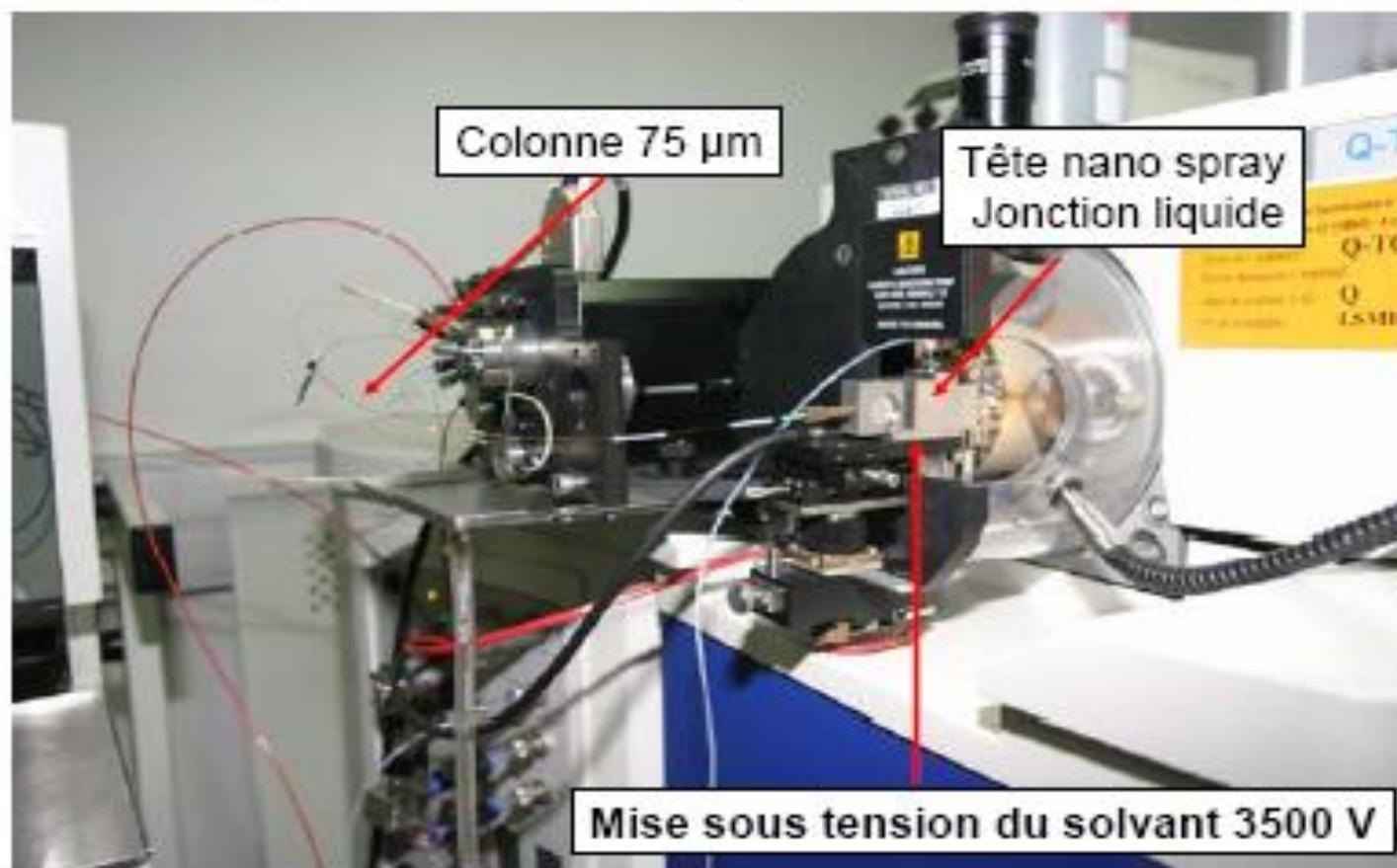
Les colonnes

Colonnes classiques, micro colonne, colonne capillaire et nano colonne



De la génomique à la protéomique : l'apport de la spectrométrie de masse
Jean-Marc Strub (5-10 décembre – Roscoff)

Couplage nanoLC-MS (source Micromass)



De la génomique à la protéomique : l'apport de la spectrométrie de masse
Jean-Marc Strub (5-10 décembre – Roscoff)

Source nanoelectrospray

- Avantage permet d'injecter de faibles volumes d'échantillon.
- Permet de travailler avec des débits inférieurs à 25nL/min.
- Rendement d'ionisation / désorption améliorés car plus petites gouttelettes, pas d'assistance pneumatique permettant de réduire la taille des gouttelettes.
- Augmente la sensibilité

Applications de l'ES pour l'étude des biomolécules dans le monde industriel

- Vérification des protéines recombinantes
(ESMS sur protéine intacte et/ou LC-MS sur digeste enzymatique)
- Vérification des sondes oligonucléotidiques
(ESMS sur oligonucléotide intact)
- Dosage des médicaments en pharmacocinétique
(LC-MS et /ou LC-MS/MS)
- Analyse protéomique
(nanoLC-MS/MS sur les peptides extraits des gels après digestion de la protéine)

Le MALDI

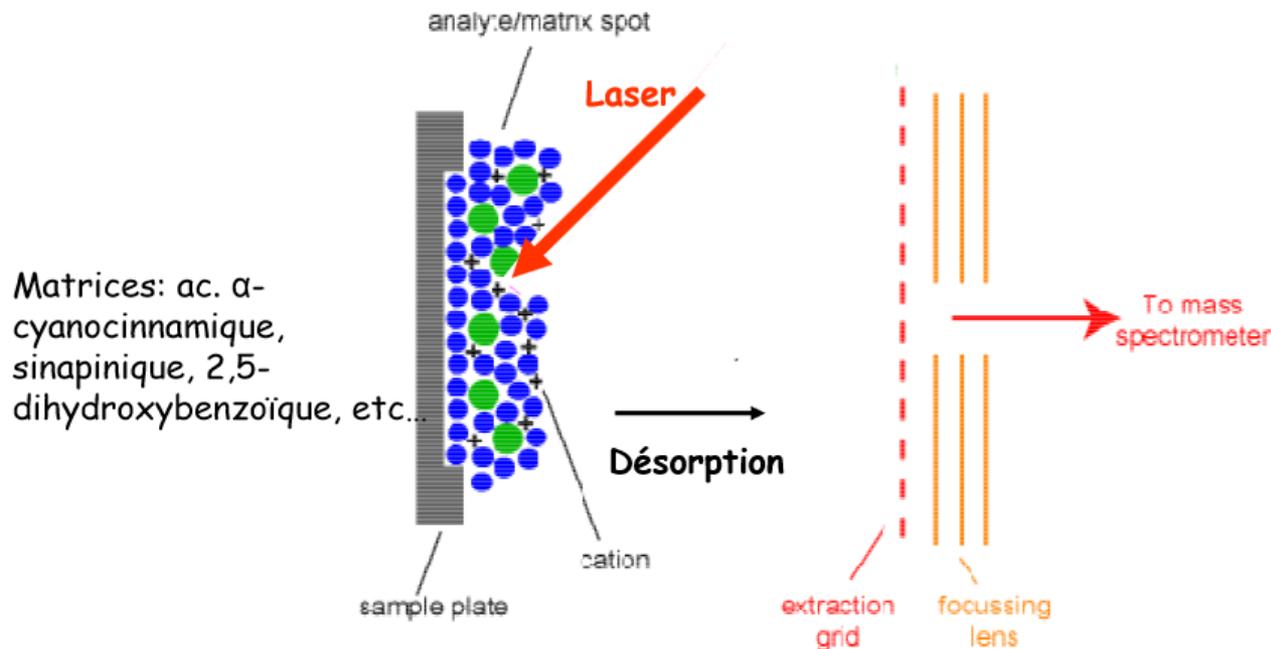
Ionisation-désorption laser assistée par matrice

On cocrystalise le composé à analyser avec une matrice solide.

Les molécules de matrice absorbent l'énergie transmise par le laser sous forme de photons UV, s'excitent et s'ionisent. Les molécules de matrice ionisées transfèrent leur charge à l'échantillon.

Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)

Méthode qui s'adresse aux molécules polaires, peu volatiles comme peptides/protéines



L'analyte M est dispersé dans une solution saturée de petites molécules aromatiques (**matrice**) et l'ensemble est co-cristallisé par évaporation du solvant. Le **dépôt solide** obtenu est irradié par un **laser** de longueur d'onde où les molécules de matrice ont une forte absorption. Il en résulte la **désorption** des ions formés par transfert de proton (H^+) entre la matrice photoexcitée et l'analyte M : $[MH]^+$.

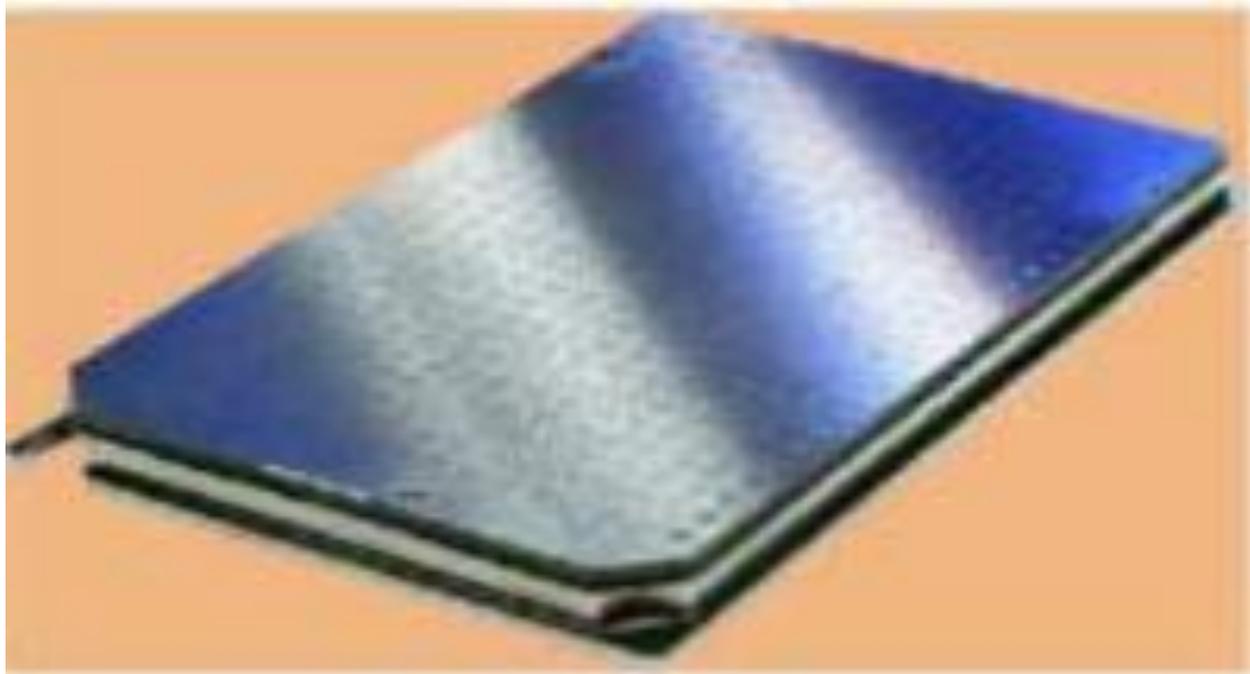
*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

Le MALDI

La matrice sert donc de vecteur d'énergie entre le faisceau laser et la molécule.

L'ionisation conduit à la formation d'ions monochargés et multichargés de type $[M+nH]n+$, avec une nette prépondérance pour les monochargés.

Une cible MALDI



Cible Maldi permettant le dépôt de 384 échantillons

Préparation MALDI-MS (goutte séchée)

solution d'échantillon (10^{-6} M)
eau 0,1 % TFA/acétonitrile (50/50)

solution de matrice saturée:
acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
dans eau 0,1 % TFA/acétonitrile (50/50)

mélange 1/1 (v/v)

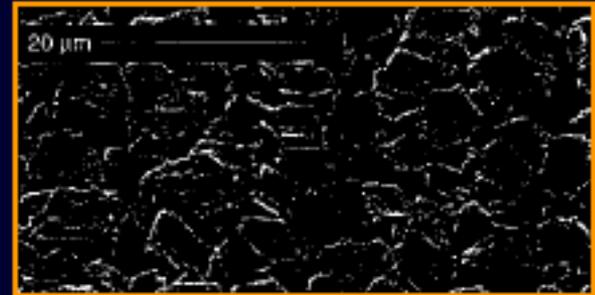


Cible

Matrice : absorbe à 337 nm
donne des protons
cristallise facilement
petit poids moléculaire
soluble dans les mêmes solvants que les biomolécules

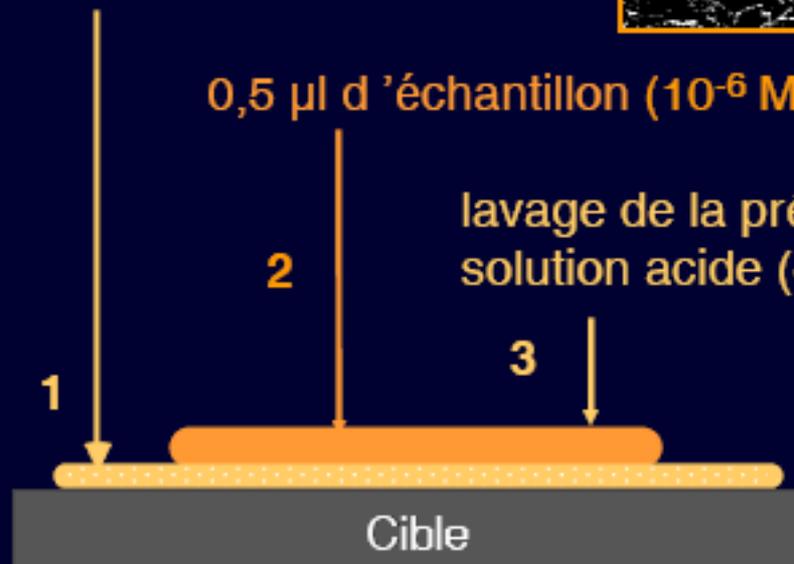
Préparation MALDI-MS (couche mince)

1 μl solution de matrice saturée:
acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
dans acétone



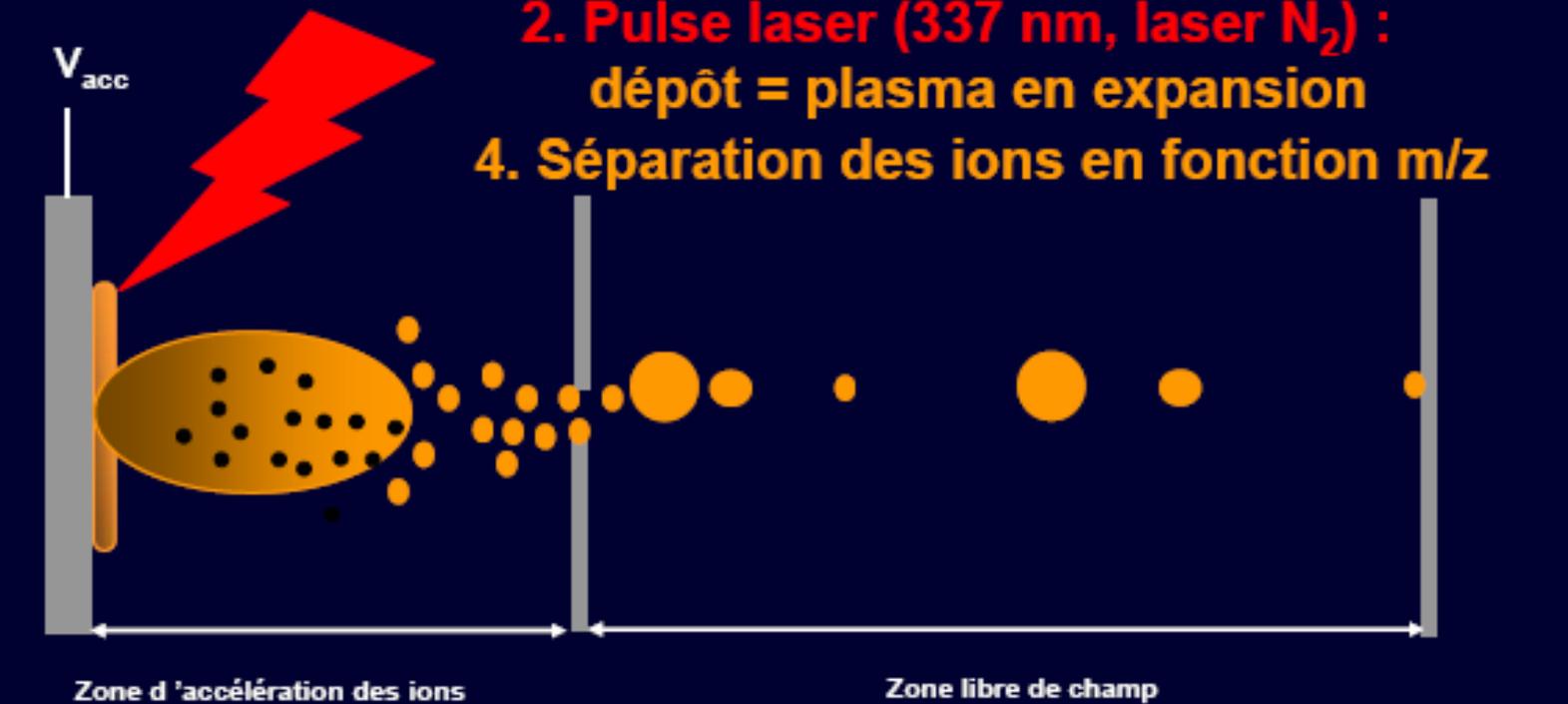
0,5 μl d'échantillon (10^{-6} M)

lavage de la préparation par une
solution acide (eau avec 0,1% TFA)



Principe de l'ionisation MALDI

K. Tanaka et F. Hillenkamp (1988)



2. Pulse laser (337 nm, laser N₂) :
dépôt = plasma en expansion

4. Séparation des ions en fonction m/z

1. Dépôt échantillon mélangé à la matrice

3. Accélération des ions

5. Détection des ions

Le MALDI

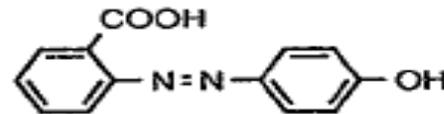
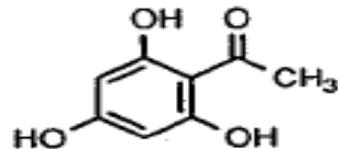
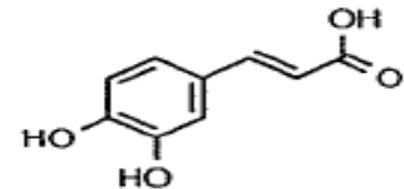
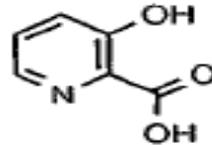
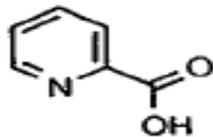
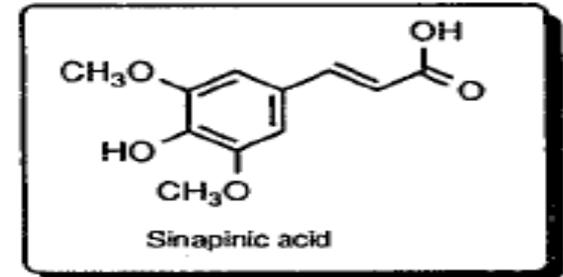
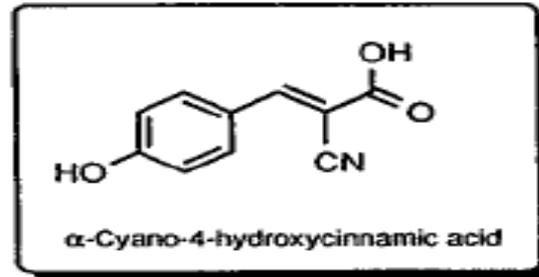
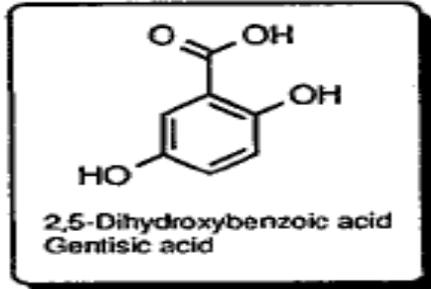
La matrice:

C'est une petite molécule, capable de former des cristaux contenant l'analyte. Elle a pour propriété de fortement absorber à la longueur d'onde du laser.

Elle assure ainsi la stabilité de l'échantillon, le préservant d'une dégradation trop importante par les photons.

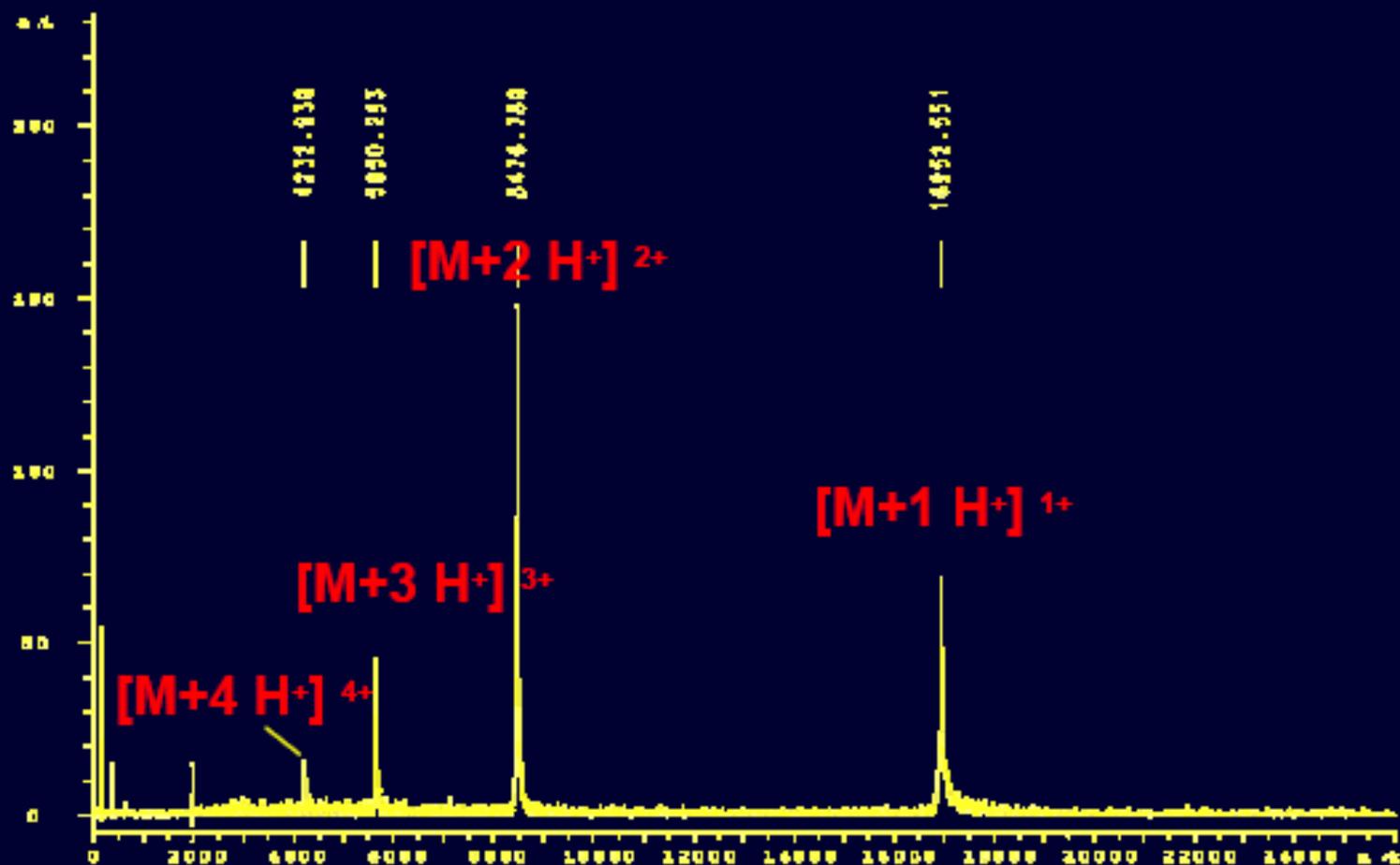
Les matrices utilisées, sont pour beaucoup dérivées de l'acide cinnamique.

Matrices utilisées en Maldi



Elles absorbent à 337nm et cristallisent facilement

Spectre MALDI-MS de la myoglobine de cœur de cheval (2 pmol/ μ l dans $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 50:50 1% HCOOH)



Caractéristiques du MALDI

- génère des ions monochargés : analyse de mélanges complexes
- tolérance aux sels et détergents

Couplage au TOF:

- sensibilité : 10^{-15} - 10^{-18} moles
- résolution : 5000 - 10 000 en routine, précision : 20 ppm

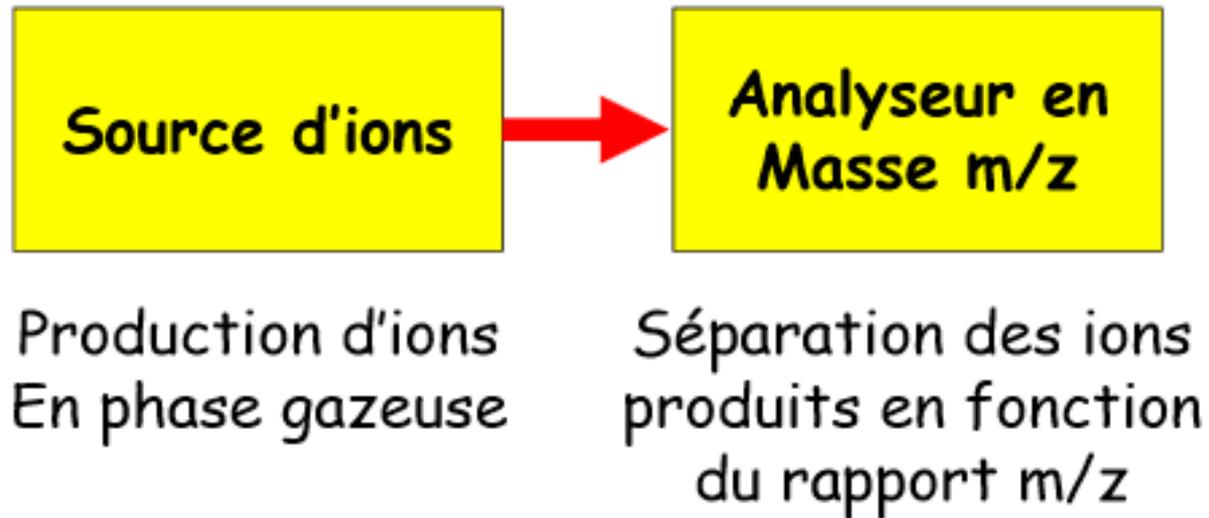
Le MALDI

Cependant aucune règle générale ne régit vraiment le choix de la matrice pour une application, même si l'acide **α -cyano-4-hydroxycinnamique** est souvent utilisé pour l'analyse de peptides, tandis que le Sinapinic Acid convient bien à l'étude des protéines.

L'ionisation dans la source: Les ions produits

<p>L'ionisation chimique</p> <p>Le MALDI</p>	<p>Molécules monochargées, essentiellement sous la forme</p> <p>$[M+H]^+$ donne le rapport m/z: $\frac{[M+H]}{1}$</p>
<p>L'électronébulisation</p>	<p>Molécules le plus souvent multichargées :</p> <p>$[M+2H]^{2+}, [M+3H]^{3+} \dots [M+nH]^{n+}$</p> <p>Ce qui donne des rapports m/z:</p> <p>$\frac{[M+2H]}{2} \quad \frac{[M+3H]}{3} \quad \dots \quad \frac{[M+nH]}{n}$</p>

L'analyseur



L'analyseur

Un analyseur permet de mesurer le rapport m/z .

Les analyseurs basse résolution:

- Quadripôle (Q)
- Trappe ionique (IT)

Les analyseurs haute résolution:

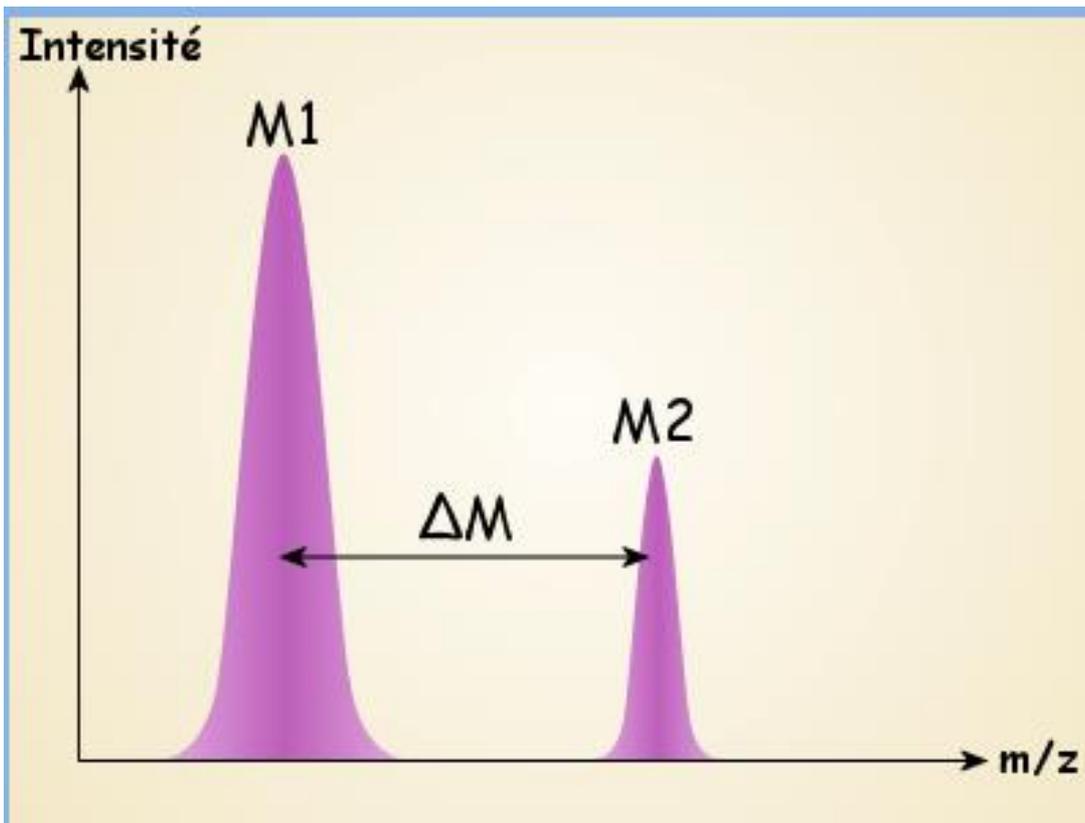
- Magnétique (EB)
- Temps de vol (TOF)
- La résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR)
- L'orbitrap

Les caractéristiques principales d'un analyseur

- 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

La résolution R_s

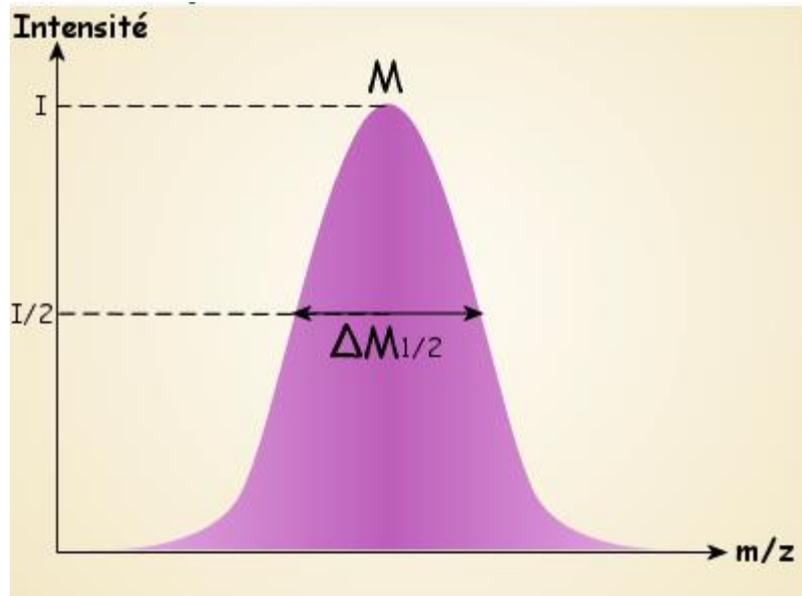
- La résolution est la capacité d'un instrument à distinguer entre eux deux signaux voisins.



Par exemple, pour un pouvoir résolutif de 5000, on pourra distinguer des peptides de masses 5000 Da et 5001 Da (ΔM de 1 Da), des masses de 500 Da et 500,1 Da (ΔM de 0,1 Da)... Résolution = $5000/1$

Autre exemple: un appareil permettant de distinguer les ions 100 et 100,1 possède une résolution de $100/0,1=1000$

La résolution Rs



- Résolution:
$$\frac{M}{\Delta M_{\frac{1}{2}}}$$
- Plus la résolution est élevée, plus le pic sera fin et plus il sera possible de distinguer des pics proches

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, EB).

La vitesse de déplacement des ions dans l'analyseur dépend de l'intensité du champ d'extraction

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

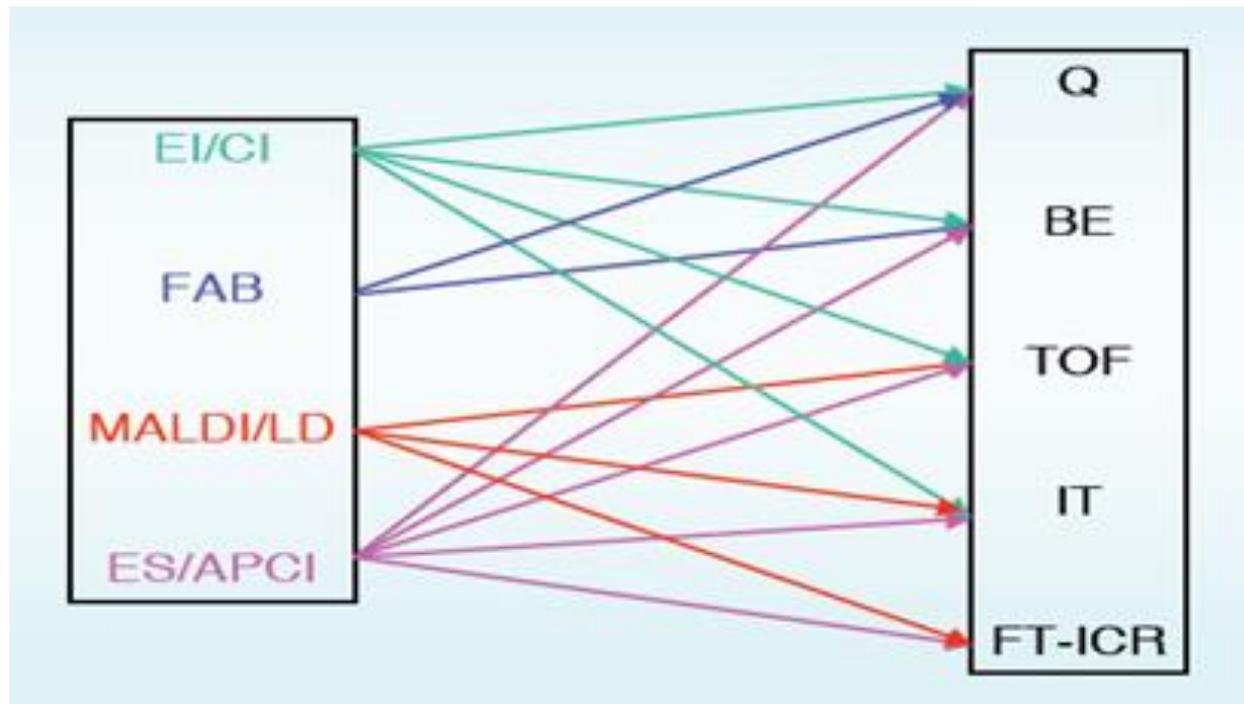
Le spectromètre de masse

L'analyseur:

L'analyseur sépare les ions produits par la source en fonction de leur rapport m/z .

Spectromètres de masse commerciaux

De nombreux couples source/analyseur sont possibles



Le spectromètre de masse

Le quadripôle:

- Il est constitué de quatre électrodes (de 12 à 20 cm de longueur) métalliques parallèles raccordées électriquement deux à deux. Dans la pratique, un quadripôle fonctionne comme un filtre à ions : à un instant donné ne sortent de l'analyseur que les ions ayant un rapport m/z donné. Les autres ions heurtent les électrodes, se déchargent et sont entraînés par le système de pompage..
- L'analyseur quadripolaire est l'analyseur le plus employé

Le spectromètre de masse

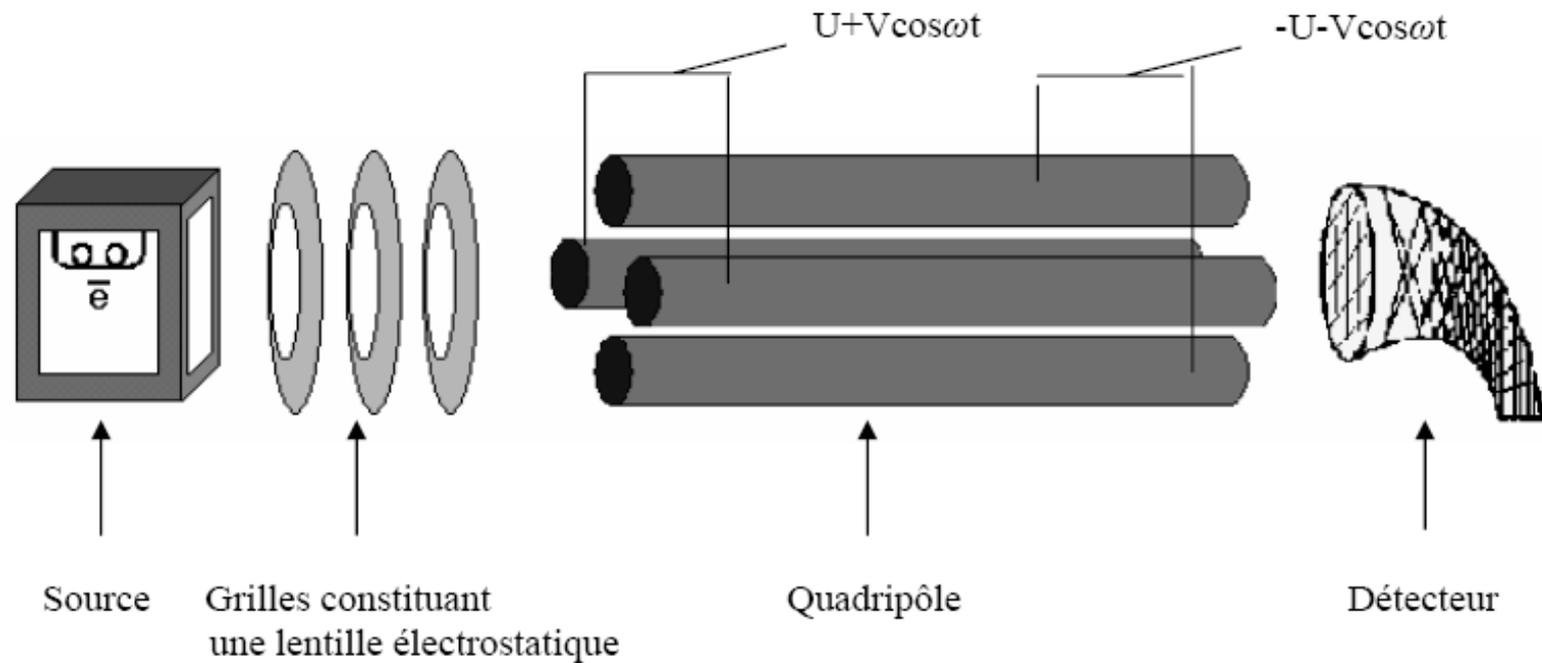


Figure 6. Représentation simplifiée d'un quadripôle

Le spectromètre de masse

- **La trappe ionique:**

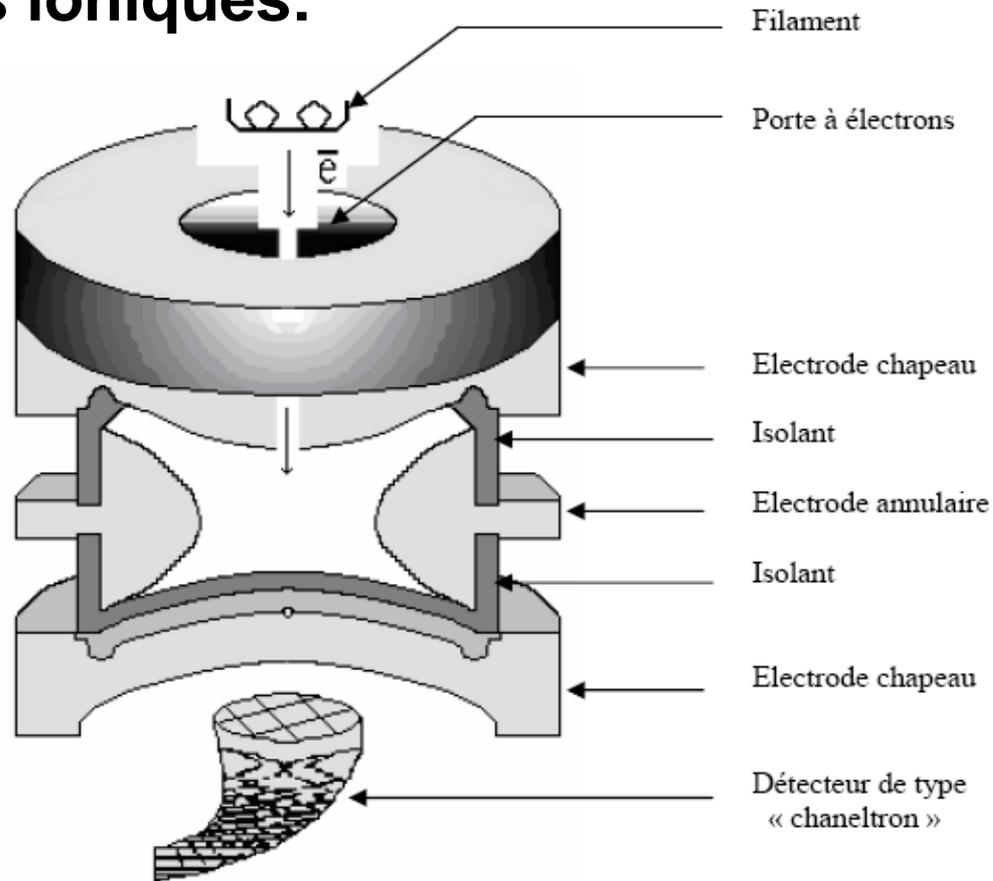
Elle fonctionne selon un autre principe qui consiste à stocker les ions et à les éjecter au cours du temps selon la valeur de leur rapport m/z .

Elle ne nécessite pas une source extérieure pour produire les ions.

La trappe ionique offre la possibilité de réaliser des analyses MS/MS.

Le spectromètre de masse

- Les trappes ioniques:



Les analyseurs à temps de vol (TOF, Time of Flight)

Energie cinétique d'un ion de charge z
soumis à une tension accélératrice V_0

$$E_c = \frac{1}{2} mv^2 = \frac{1}{2} m(l^2/t^2) = zV_0$$

$$m/z = 2V_0 t^2/l^2 \quad (V_0, l \text{ sont connus})$$

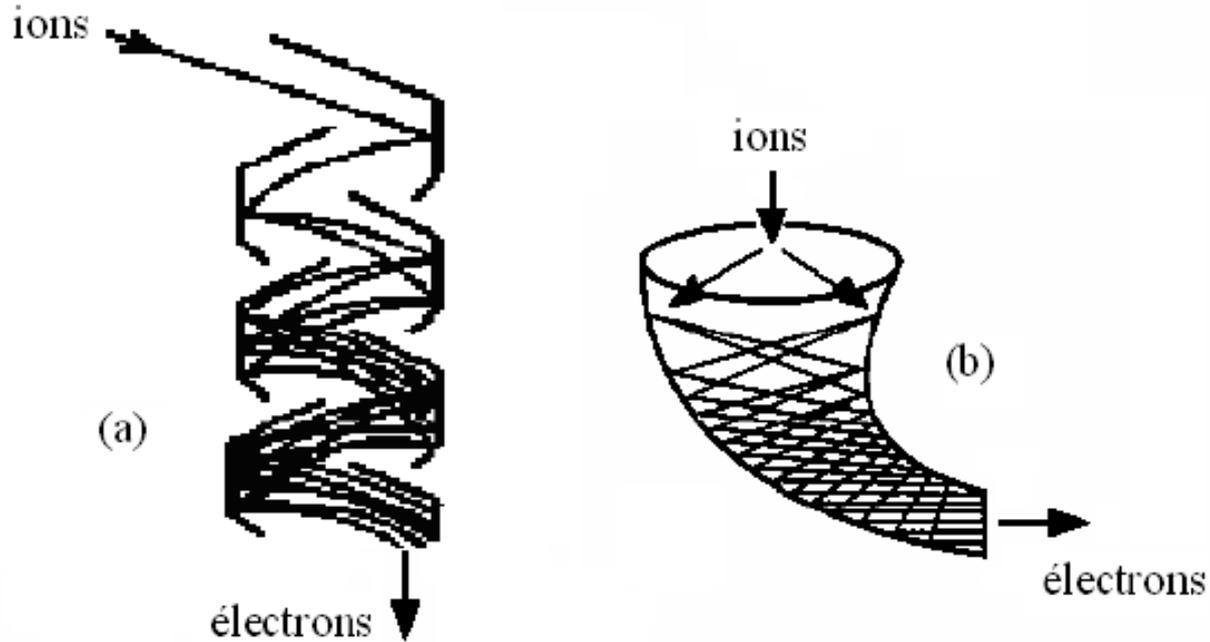
rapport m/z = fonction du temps de vol t

Le spectromètre de masse

- **Rôle du détecteur:**

- **Détecter les ions** proportionnellement à leur nombre.
- **Amplifier le courant** correspondant pour le rendre détectable
 - par l'électronique du système.
- L'intérieur du détecteur est enduit d'un alliage plomb/oxyde de plomb qui a la propriété d'émettre des électrons sous l'effet d'un choc.

Le spectromètre de masse



Lorsqu'un ion vient heurter la paroi, il y a émission d'électrons qui, accélérés par une différence de potentiel rebondissent de part et d'autre de la paroi. Chaque choc décroche de nouveaux électrons qui sont eux même accélérés (cascade électronique). L'arrivée d'un ion se traduit par un courant de 10^5 électrons.

Le spectromètre de masse

- **Les principaux modes d'analyse:**
- Analyse en balayage ou « fullscan »
- On enregistre tous les ions produits dans la source à un instant donné.
- L'identification des ions en GC se fait grâce à des bases de données qui répertorient des dizaines de milliers de spectre de masse.
- Lorsque ces molécules n'ont pas été répertoriées dans ces bases de données, l'identification doit se faire par déduction à partir des ions observés par MS/MS

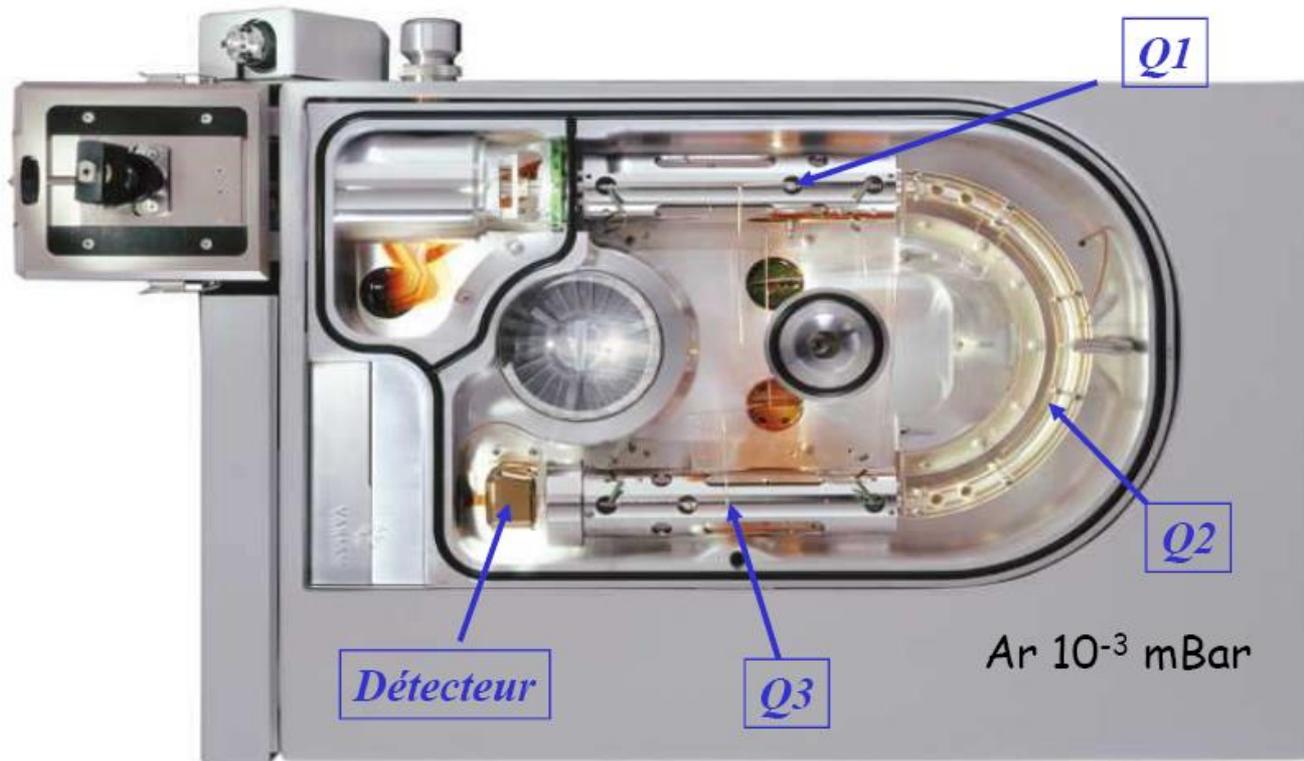
Le spectromètre de masse

- **Les principaux modes d'analyse:**
 - Analyse en « SIM, single ion monitoring » et « SIS, single ion storage »
 - **Dans le mode SIM**, le spectromètre de masse fonctionne comme un **filtre**. on ne détecte **qu'un ou quelques ions**. **Le mode SIS** (*Single ion storage*) désigne le même mode, mais avec une trappe d'ions comme analyseur.
 - Ce mode permet un gain de sensibilité très important, le temps dévolu à la détection de chaque ion est beaucoup plus grand que dans le mode « fullscan ».
 - De plus ce mode de détection permet de **réduire fortement le bruit de fond dû aux ions parasites** (provenant par exemple de la phase stationnaire ou de pollutions...), il est donc préconisé pour la mise en évidence de composés présents à l'état de traces (analyse environnementales et toxicologiques).

Analyse MS/MS (spectrométrie de masse en tandem)

Principe:

Sélectionner puis fragmenter un ion en augmentant son énergie interne par collisions avec des atomes ou des molécules de gaz



Le spectromètre de masse

- **Les principaux modes d'analyse:**
- **Analyse MS/MS (spectrométrie de masse en tandem)**

Les modes SIM et SIS fournissent des spectres de masse peu intéressants pour caractériser les analytes car pauvres en ions.

La technique MS/MS est sélective, sensible et fournit suffisamment d'ions pour caractériser un analyte sans ambiguïté.

Le spectromètre de masse

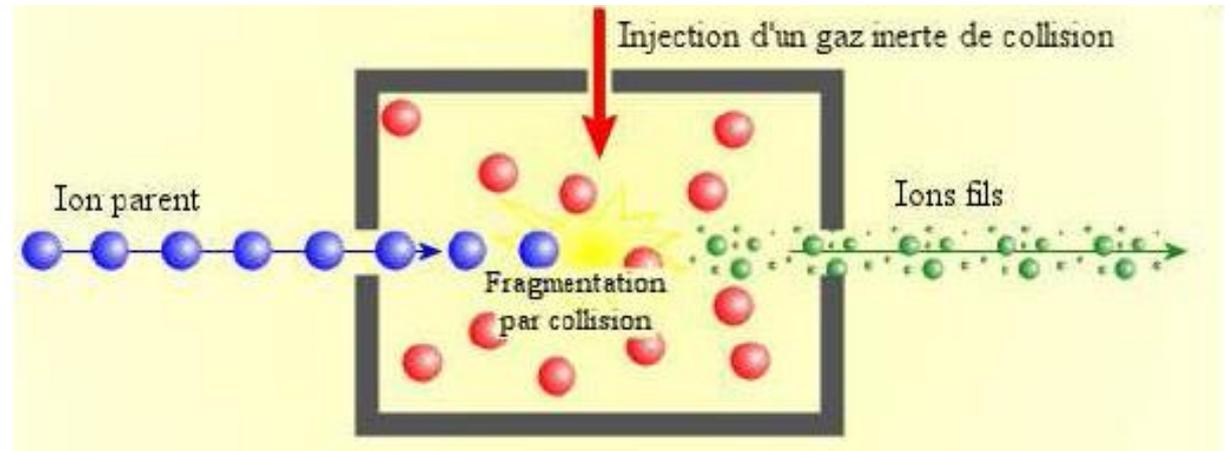
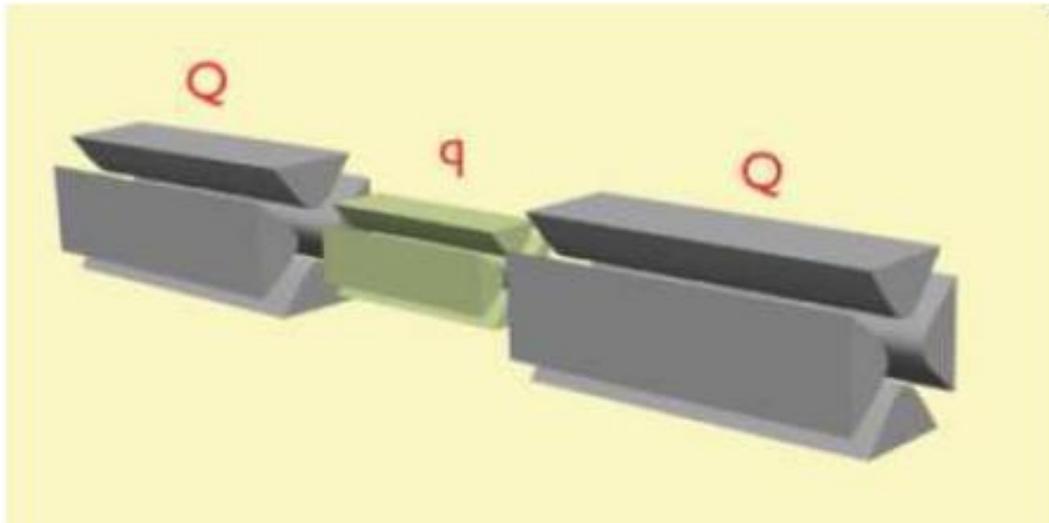
- Les principaux modes d'analyse:
- Analyse MS/MS (spectrométrie de masse en tandem)

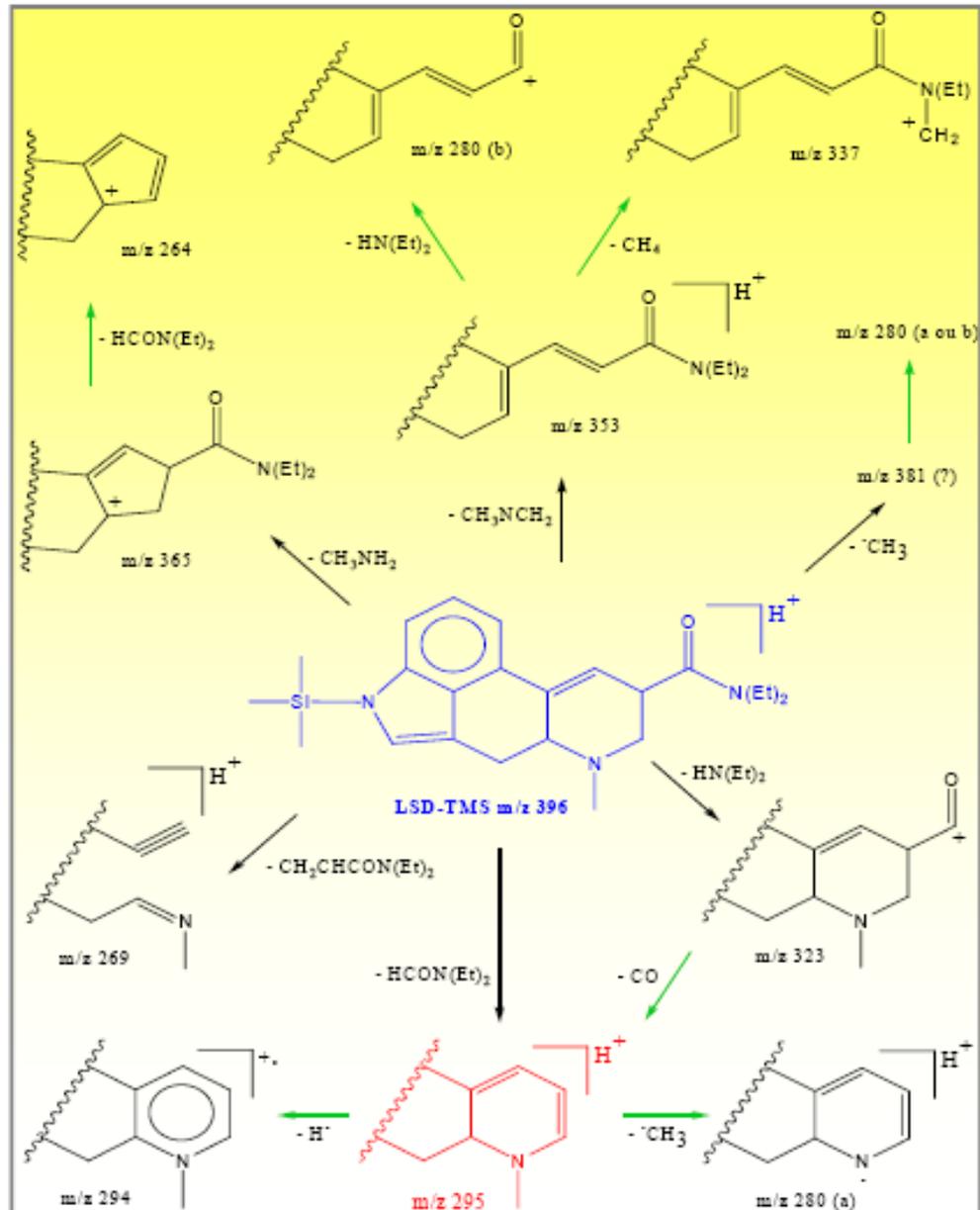
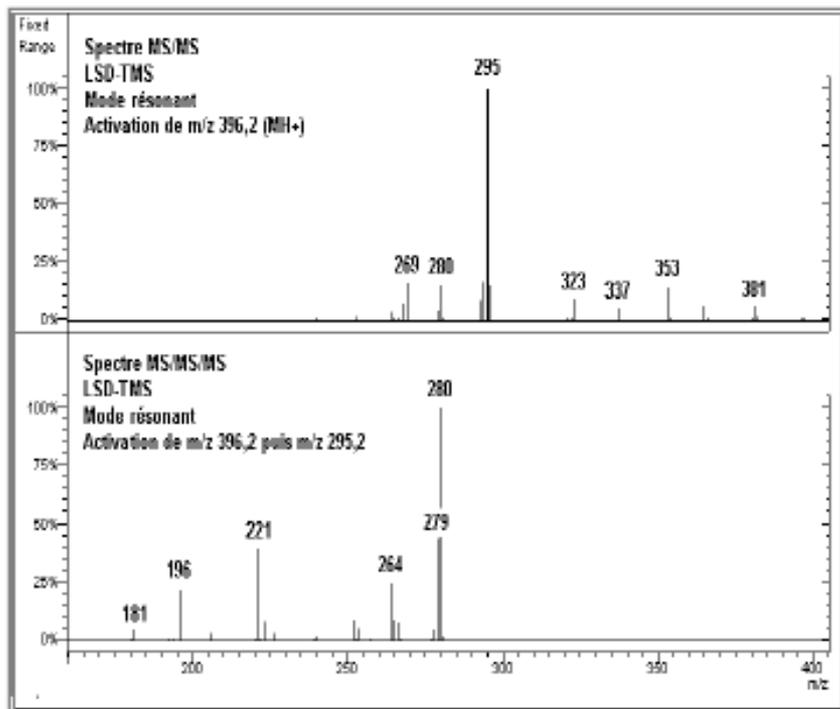
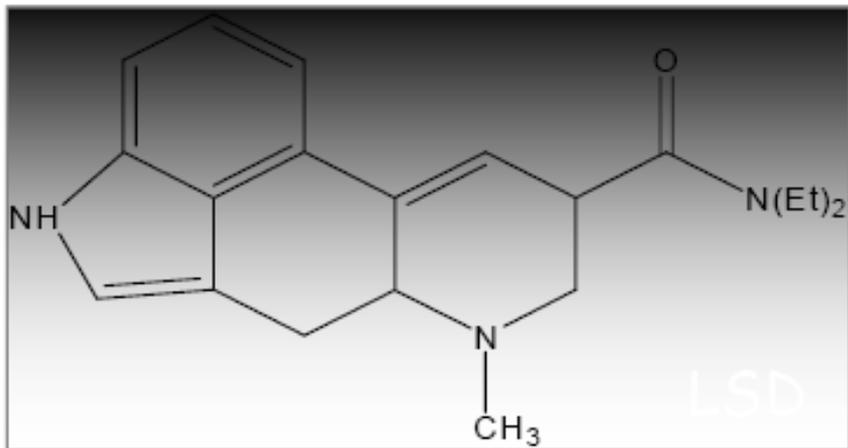
Elle nécessite soit **un triple quadripôle** ou une **trappe ionique**

Un protocole de MS/MS comporte **trois étapes**:

- isolation d'un ion caractéristique de l'analyte (ion précurseur), correspondant à un m/z donné.
- fragmentation de cet ion par collisions dans un gaz inerte (argon)
 - balayage et détection des ions fragments obtenus.

Spectromètre de masse Triple Quadripôle





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**.

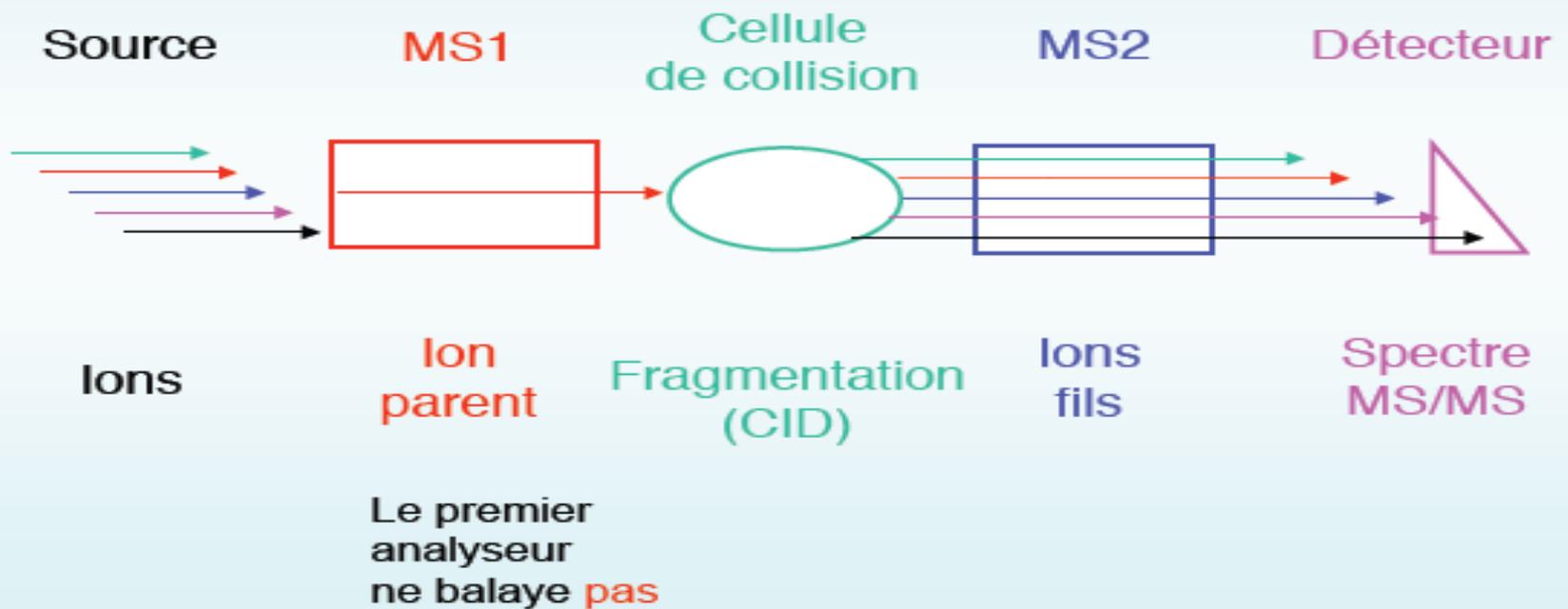
Un deuxième analyseur mesure alors les m/z des fragments.
C'est de la **MS-MS** (spectrométrie de masse en tandem)

Si on répète l'opération, on fait de la MS-MS-MS ou MS³
Certains appareils permettent de faire de la MS¹⁰

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

La spectrométrie de masse MS-MS

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



Les analyseurs MSⁿ

La MS-MS peut être réalisée par :

Deux quadropôles	Q-Q
Un quadropôle 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

- Dans les analyseurs magnétiques, la collision de l'ion parent se fait à haute énergie (plusieurs keV) alors que dans les autres analyseurs (quadripolaire ou ion trap), la collision se fait à basse énergie (au maximum 100 eV).
- Cette différence influe le processus de fragmentation.
- Les spectres de fragmentation pris à haute énergie présentent une plus grande variété de fragmentations (plus d'informations, mais complexité des spectres, interprétation difficile)

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

L'analyse MS/MS peut être menée selon quatre modes différents (triple quadripôle):

- le mode descendant (le plus utilisé)
- mode ascendant (usage plus restreint)
- mode perte de neutre (usage plus restreint)
- mode MRM (quantification)

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Mode descendant:

L'ion à étudier est sélectionné en focalisant le premier analyseur sur son rapport m/z . Les fragments formés dans la cellule de collision sont séparés par le deuxième analyseur et analysés. Le spectre obtenu présente l'ion précurseur (ou ion parent) et ses ions fragments.

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Mode ascendant:

Le premier analyseur balaie une gamme de masse tandis que le deuxième est focalisé sur un seul rapport m/z . Tous les ions générés en source et capables de donner un fragment de même rapport m/z seront donc ainsi détectés.

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Mode perte de neutre:

les deux analyseurs balayent une gamme de masse simultanément et avec un décalage de masse constant. Le spectre établi présentera alors tous les ions parents capables de se fragmenter en générant un neutre de masse égale au décalage imposé.

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

- ***Mode MRM***

l'ion parent à étudier est sélectionné par le premier analyseur et fragmenté dans la cellule de collision, comme en mode descendant. En revanche, le second analyseur est focalisé sur l'ion produit. Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité, au niveau des sélections de l'ion parent et de l'ion produit.

La sensibilité de détection est améliorée par rapport à d'autres modes de balayage, faisant de la MRM un mode de choix pour la quantification.

Couplage LC/MS/MS

Applications



Analyses structurales et quantitative

Chimie organique et inorganique: applications en chimie analytique (industrie des parfums, pétrochimie, chimie des polymères, ...)

Applications biomédicales : pharmacologie, toxicologie ...

Contrôle de l'environnement : analyse élémentaire et bactériologique de l'air et de l'eau ; suivi de la pollution par des pesticides ou des processus industriels



Couplage LC/MS/MS

Applications



- En agroalimentaire, contrôle de fraudes alimentaires...
- Caractérisation des drogues, contrôle anti-dopage, La détection des β bloquants dans le sang, le screening des benzodiazépines dans l'urine et le sang,...

**Domaine d'application:
Protéomique**

Définitions

- 1- Définitions
- Le **protéome**: les protéines exprimées par le génome
- La **protéomique**: étude du protéome, l'étude des protéines et plus particulièrement, l'étude:
 - de leurs niveaux d'expression
 - de leurs modifications
 - de leurs interactions

- Etude du Protéome :

Caractérisation et quantification des protéines exprimées par :

- ✓ une cellule
- ✓ un micro-organisme
- ✓ un tissu
- ✓ un prélèvement biologique

à un instant donné, dans un état donné, et dans un environnement donné.

Contrairement au génome, le protéome est une **image dynamique** qui reflète **l'état fonctionnel** d'un organisme.

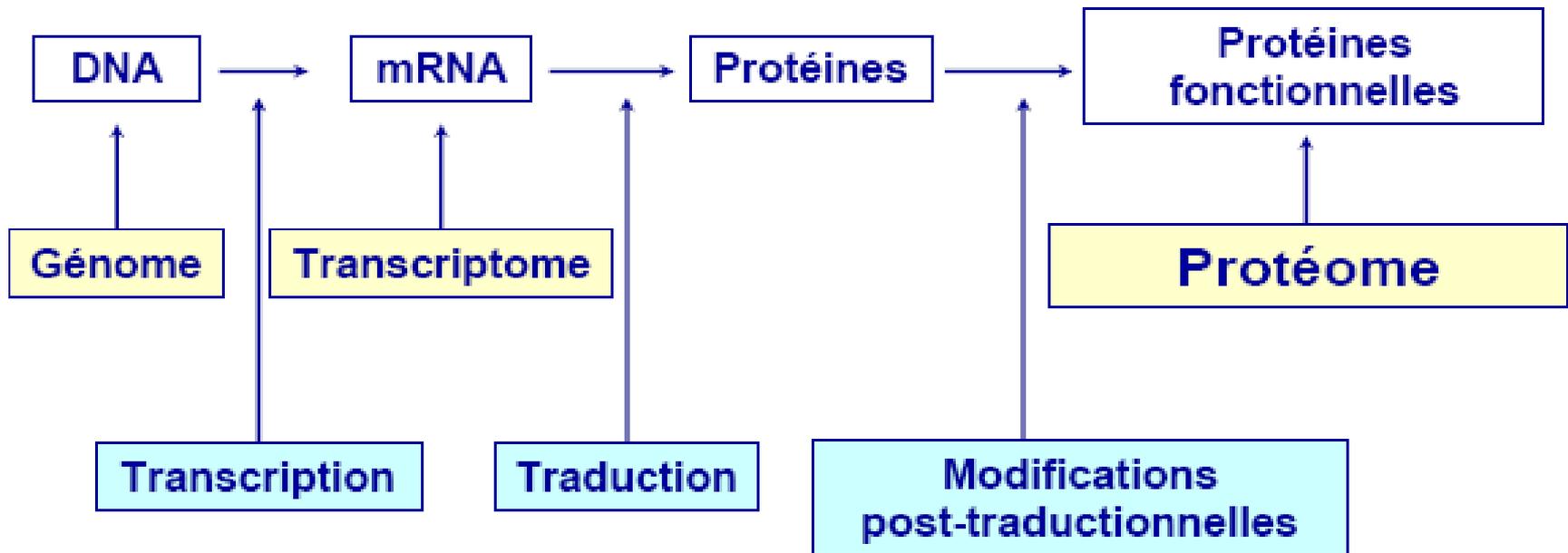
Protéomique

- Le protéome est une entité dynamique et complexe. Au sein de chaque cellule, le contenu des protéines se modifie en permanence en fonction des conditions intra et extracellulaires.
- Un même gène peut donner naissance à plusieurs protéines.
- Le protéomes contient donc un nombre beaucoup plus important de protéines que le génome ne contient de gènes.

Objectifs de la protéomique

- Identifier et quantifier des protéines présentes dans un échantillon biologique à un instant T.
- Mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les grandes fonctions cellulaires.
- En comparant les échantillons de personnes en bonne santé et de personnes malades, la protéomique permet de découvrir et valider l'utilisation de biomarqueurs protéiques utiles au dépistage des maladies, au suivi de leur évolution et à l'évaluation de l'efficacité d'un traitement.

Pourquoi l'étude du protéome ?



Humain :

~30.000 gènes → ~ 300.000 transcripts → ~ 3.000.000 protéines

La complexité du protéome

Same genome...

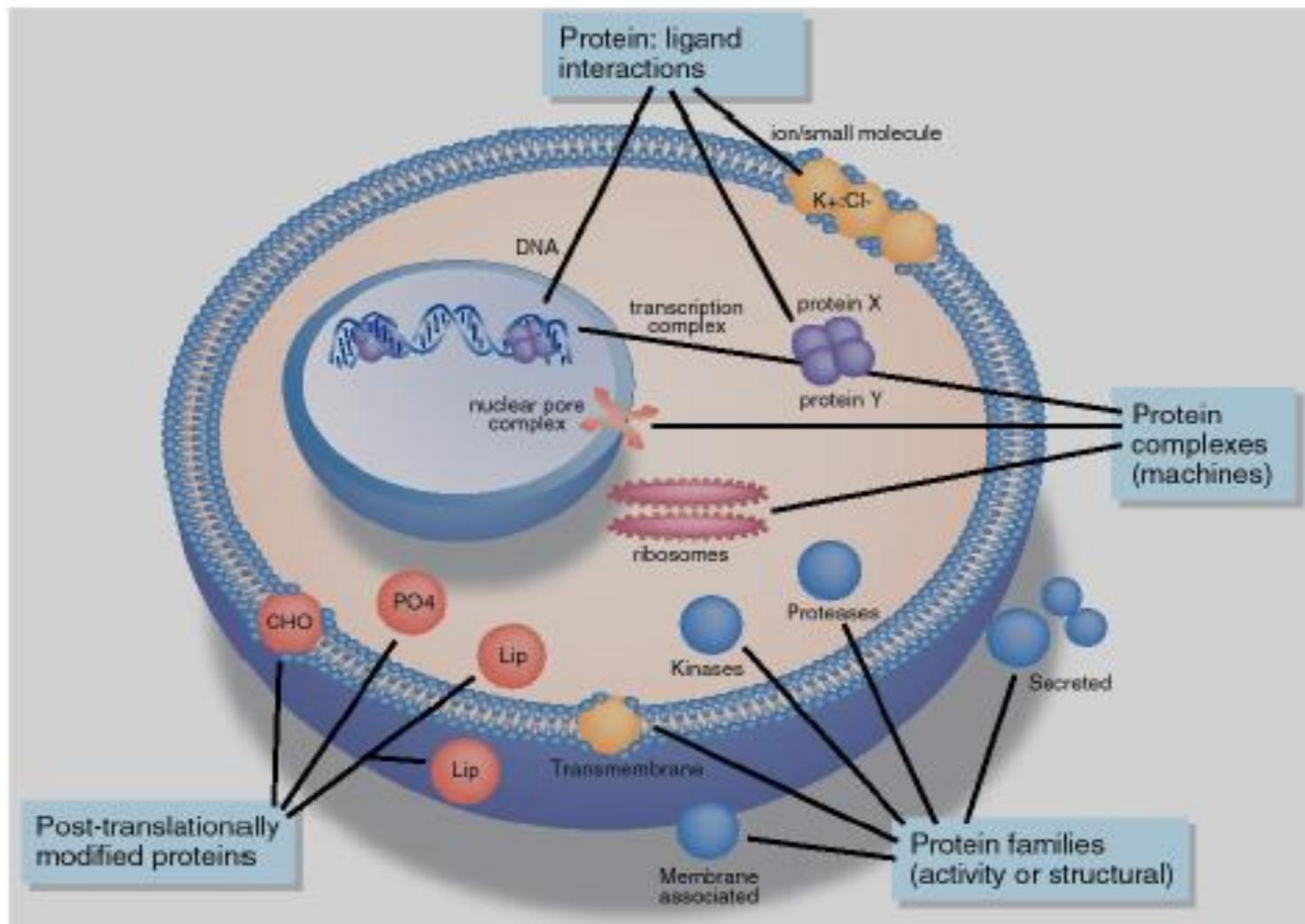


Different proteomes !!!

La chenille et le papillon

- Ces deux organismes apparemment si différents ont exactement le même génome. Ce qui les différencie, ce sont les produits finaux d'expression de leur gènes, c'est-à-dire les protéines.

Les protéines sont les acteurs des différentes fonctions cellulaires



Applications de la protéomique

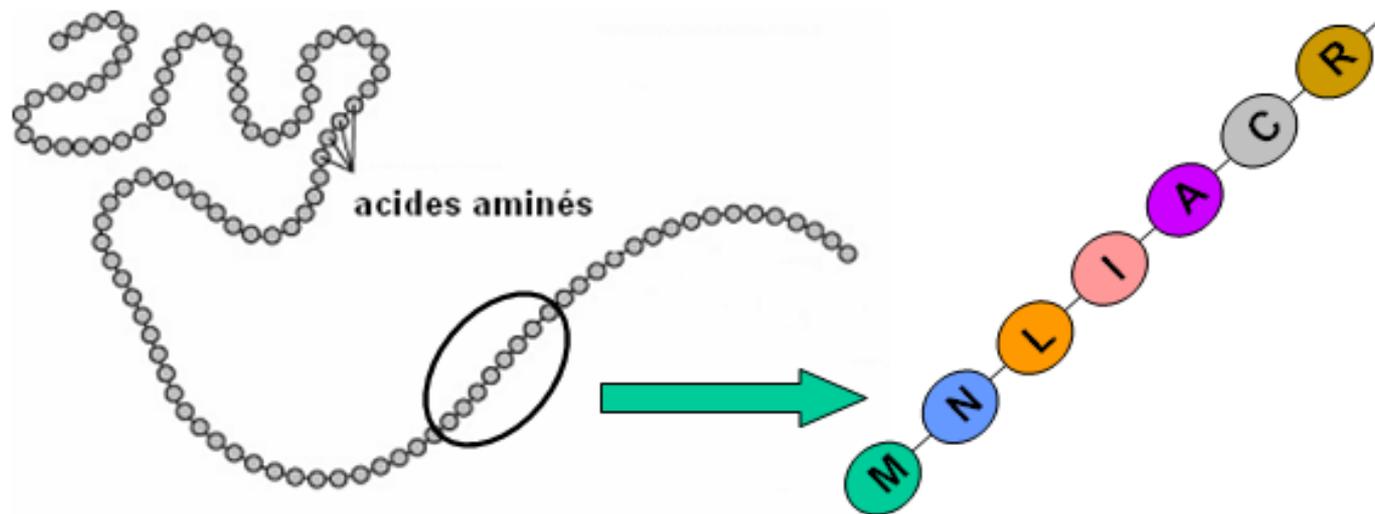
- Comprendre les processus cellulaires normaux ou responsables de maladies (cancers, maladies neurodégénératives,)
- Identifier de nouvelles protéines
- identifier des protéines indicatrices de maladies (biomarqueurs)

La structure des protéines

Chaque protéine est élaborée à partir de 20 “briques élémentaires” : les acides aminés.

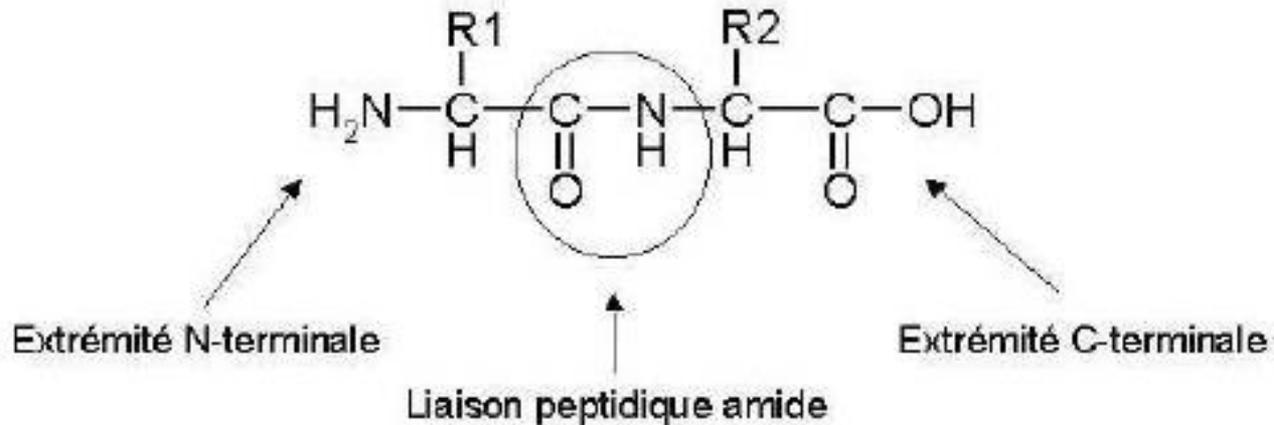
Une protéine est une combinaison, sous la forme d'une chaîne plus au moins longue et orientée, de ces 20 acides aminés (100 à 200 acides aminés). On représente chacun des acides aminés par une lettre.

La séquence des acides aminés d'une protéine constitue la structure primaire de la protéine.



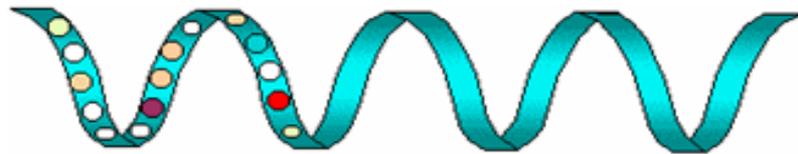
Protéines et peptides

- Les protéines et peptides sont des polymères constitués de 20 aa liés entre eux par des liaisons peptidiques.

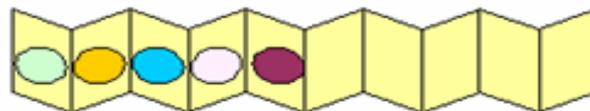


La structure des protéines

Des régions de la protéines peuvent adopter 2 formes particulières : hélices ou feuillets. On parle de structure secondaire. La structure tridimensionnelle finale qu'adopte la chaîne d'acides aminés, constitue la structure tertiaire de la protéine.



Une hélice α (alpha) © Georges Dolisi



Un feuillet plissé β (bêta)



et sa représentation schématique

© Georges Dolisi

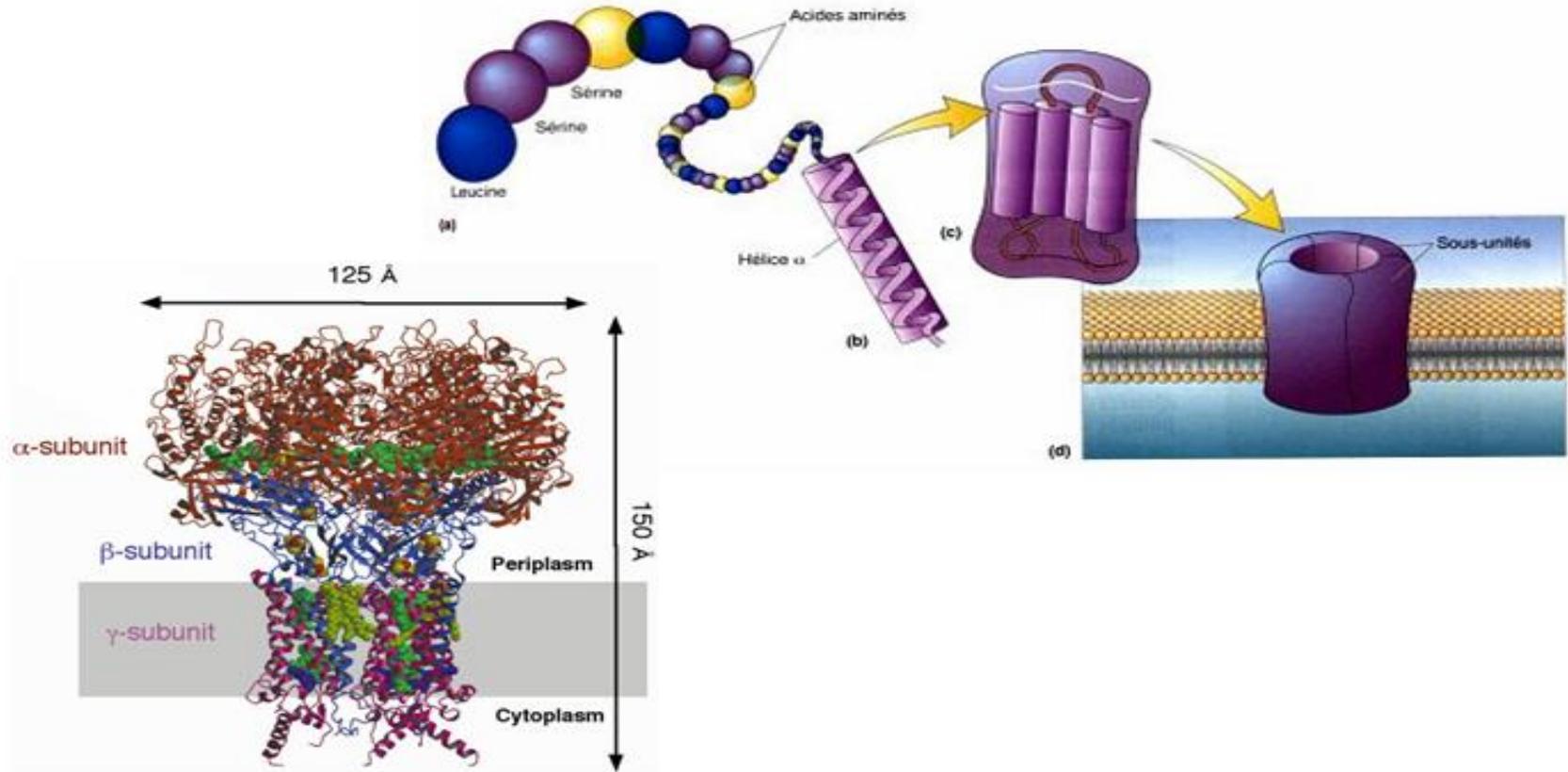
Structures secondaires



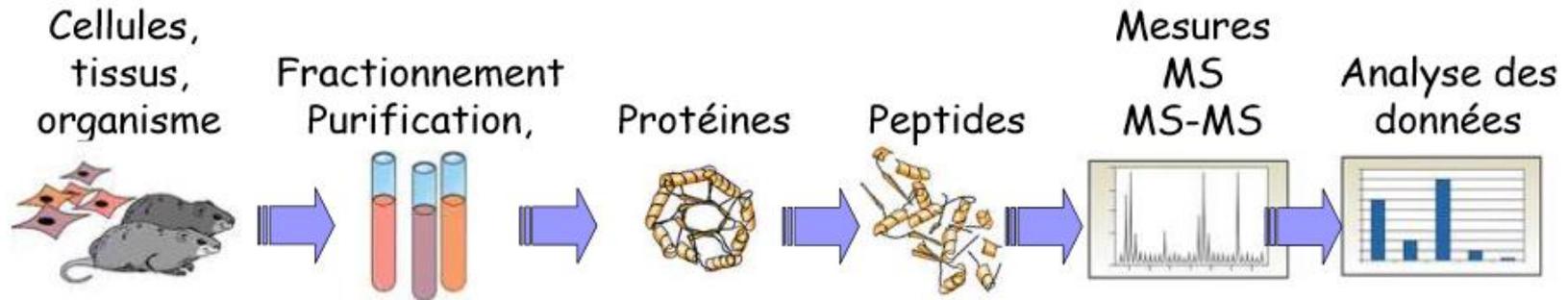
Structure tertiaire d'une protéine

La structure des protéines

Plusieurs protéines peuvent s'associer pour former des ensembles complexes. On parle de structure quaternaire.



2- Les grandes étapes de l'analyse protéomique



1- Extraction des protéines (cellules, tissus, organisme)

2- Séparation des protéines (l'électrophorèse bidimensionnelle 2D ou chromatographie)

3- Dénaturation de la protéine. En milieu acide, la protéine est « déroulée », les liaisons intramoléculaires (ponts disulfure S-S) sont coupées.

4- A l'aide d'enzyme (trypsine) la protéine est fragmentée en des points précis et donne des peptides (M voisins de 1000 Da)

5- Identification des séquences des peptides par SM.

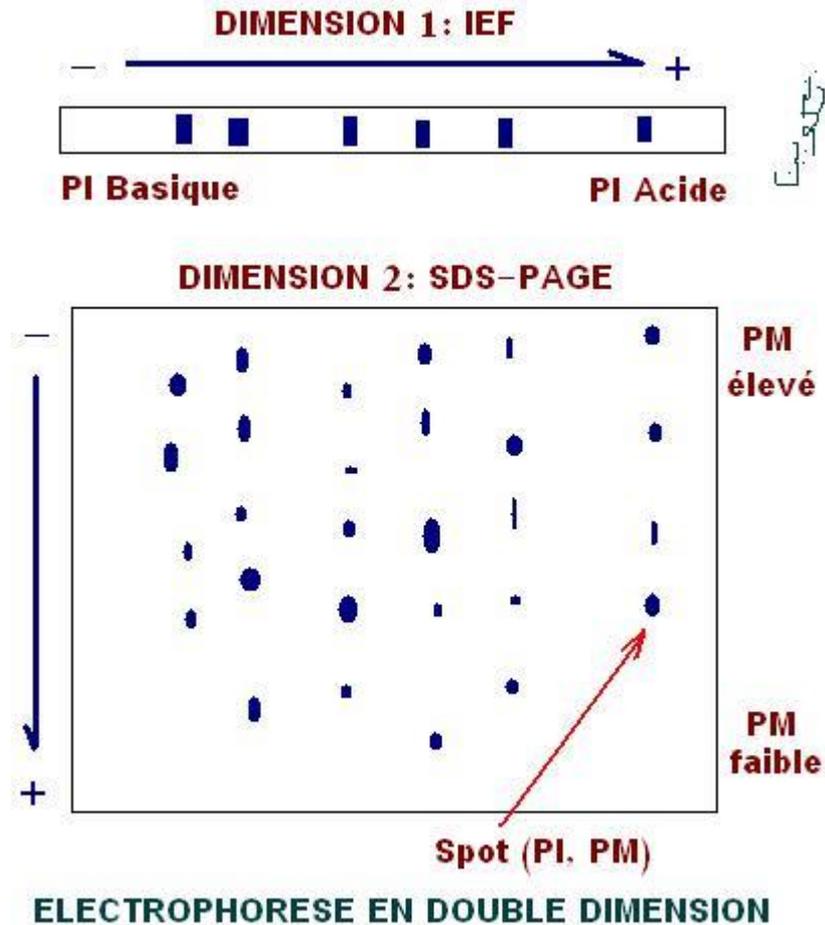
6- A l'aide des banques de données, la protéine est identifiée à partir de ses peptides

2.1- Extraction des protéines et préparation des échantillons

- L'extraction de protéines à partir de tissus, de cellules isolées ou de liquides physiologiques est réalisée à l'aide de tampons appropriés, choisis en considérant la nature des protéines à étudier (protéines cytosoliques, membranaires, nucléaires...).
- Les tampons d'extraction à pH bien déterminé, sont constitués dans des proportions variables, de mélanges d'agents réducteurs, de détergents, voire de solvants organiques. Ils sont généralement supplémentés d'inhibiteurs de protéases.

Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2D)

- L'électrophorèse 2D est la méthode de choix pour séparer les protéines puisqu'elle permet de séparer des mélanges complexes en fonction de deux propriétés différentes : la charge électrique et le poids moléculaire.

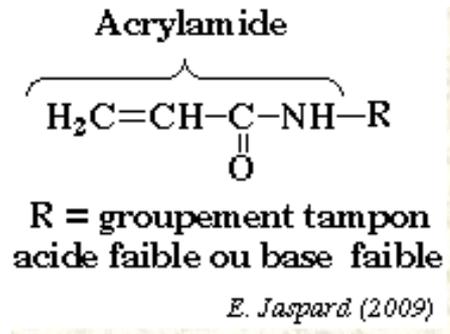


Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2D)

- Dans la première dimension, les protéines sont soumises à une électrophorèse dans un gel présentant un gradient de pH continu. Au cours de cette étape, appelée isoélectrofocalisation (IEF), elles migrent dans le gel jusqu'à une position où la valeur du pH est égale à celle de leur point isoélectrique (pI) où leur charge globale devient nulle.
- Cette première séparation est délicate et dépend beaucoup de la préparation des échantillons biologiques qui doit permettre une solubilisation maximale des protéines et empêcher leur agrégation et leur dégradation.

Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2D)

On utilise des gradients de pH immobilisés (IPG), formés avec des immobilines.



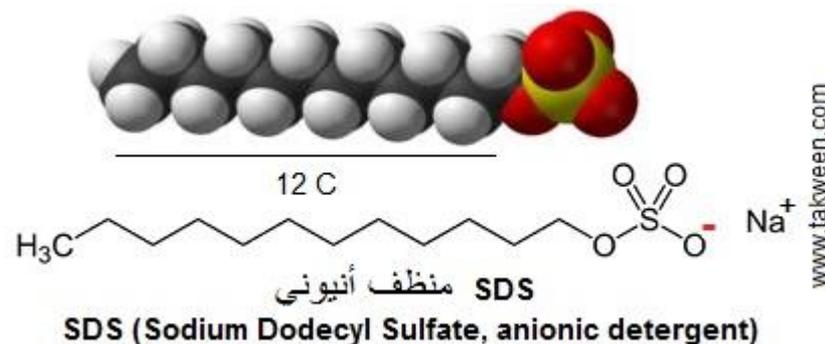
Les immobilines sont des dérivés de l'acrylamide, R correspond à un groupement carboxyle (acide) ou à une amine tertiaire (base) qui forment une série de molécules tampon avec différentes valeurs de pKa d'ionisation (exemples : 3,6 - 4,4 - 4,6 - 6,2 - 7,0 - 8,5 - 9,3).

Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2D)

- Les immobilines co-polymérisent avec les molécules d'acrylamide dans le gel d'IEF.
- Cette technique permet d'obtenir des gradients de pH reproductibles et très étroits : On peut séparer un mélange de protéines avec une différence de pI de 0.001 unité pH !

Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2D)

- Dans la deuxième dimension, les protéines sont séparées par la technique SDS-Page (sodium-dodécyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). La résolution s'effectue sur un gel réticulé constitué de polyacrylamide en présence d'un agent dénaturant, le sodium-dodécyl sulfate (SDS).



Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2D)

Grâce à la réticulation plus ou moins importante du gel de polyacrylamide, les protéines sont séparées par tamisage moléculaire, leur vitesse de migration dans le gel étant inversement corrélée à leur taille. Comme pour l'IEF, plus le gel de deuxième dimension est grand, plus la résolution (et donc le nombre de spots séparés) augmente.

Détection et quantification des protéines

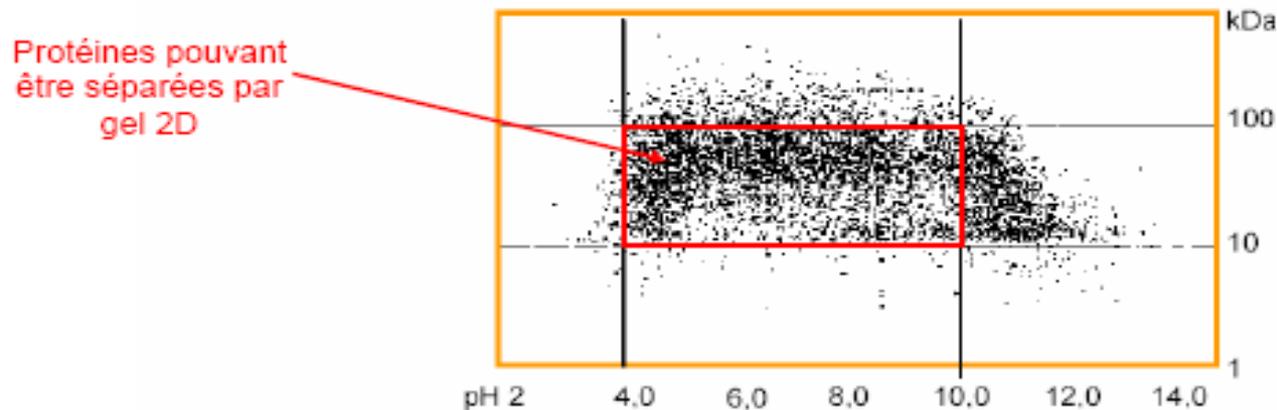
- Après électrophorèse bidimensionnelle, les protéines séparées sont détectées par **coloration des gels**.
- **le bleu de coomassie** permet de détecter un minimum de 100 ng de protéine par spot et présente l'avantage de donner une intensité de coloration proportionnelle à la quantité de protéines.
- la coloration au nitrate d'argent (mille fois plus sensible que le bleu de coomassie), permet de détecter des spots contenant 0,1 ng de protéines. Elle présente néanmoins certains inconvénients : la stœchiométrie de la coloration n'est pas totalement linéaire, la reproductibilité est difficile à obtenir et certaines protéines sont peu ou pas colorées par cette méthode.

Détection et quantification des protéines

- Plus récemment, la détection des spots par fluorescence (Sypro Orange, Sypro Red, Sypro Ruby) a été développée, avec une sensibilité et une linéarité d'intensité de coloration équivalente à celle de l'argent, mais avec une reproductibilité, une facilité et une rapidité meilleures que celles de la coloration au nitrate d'argent.
- Depuis les années 1970, les méthodes d'analyse des gels ont évolué grâce aux progrès combinés de l'informatique et de l'analyse d'images. La digitalisation des gels consiste en une transformation de l'image expérimentale en une information numérique utilisable par l'ordinateur.

Protéines totales séparées par gel 2D

Carte théorique de levure



pI et masse calculés à partir des données de séquence des ORF du génome

Wildburger et al. Electrophoresis 2000, 21, 2610-2616

- ⇒ La grande majorité des protéines peuvent être analysées par gel 2D
- ⇒ Perte la plus importante pour les protéines basiques ($pI > 10$) et de hauts poids moléculaires ($PM > 100$ kDa)

Electrophorèse bidimensionnelle

Le gel de polyacrylamide est incubé dans une solution qui colore les protéines.

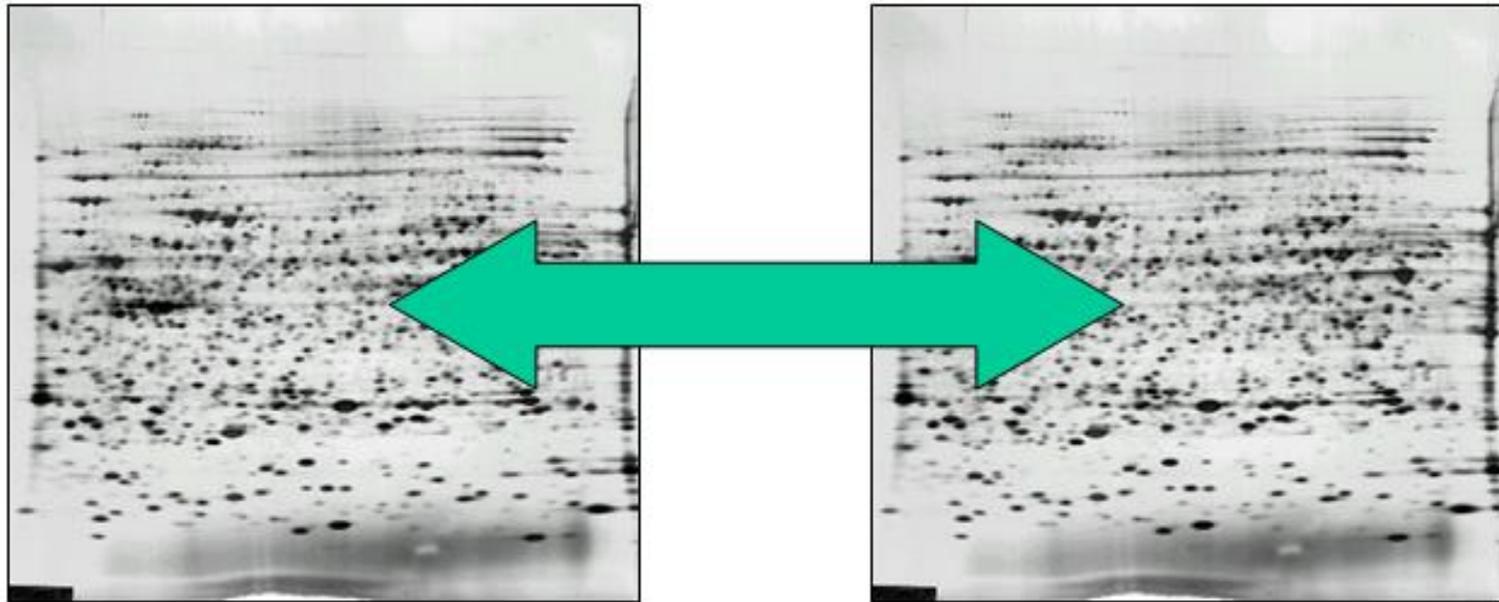


Chaque « tache » sur le gel représente une protéine.

Plus la « tache » est grosse et foncée, plus la protéine est abondante.

Electrophorèse bidimensionnelle

Application : comparer les gels dans différentes conditions (cellules normales vs cellules cancéreuses par exemple) pour trouver des différences de quantité de protéine et/ou des absences de protéines.

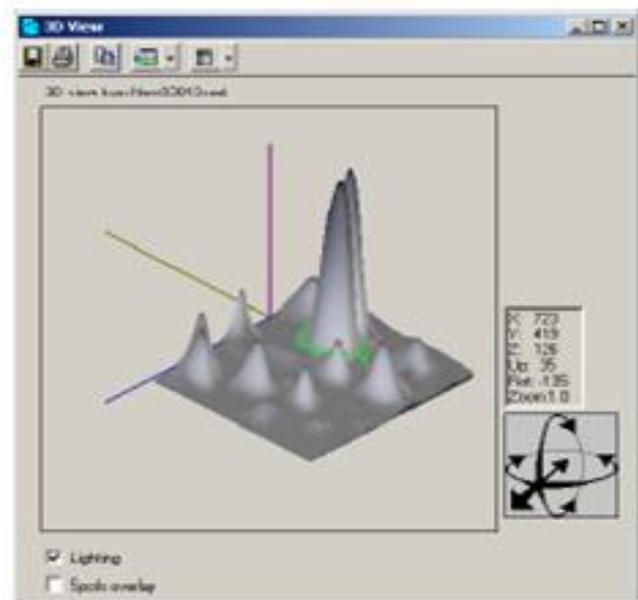
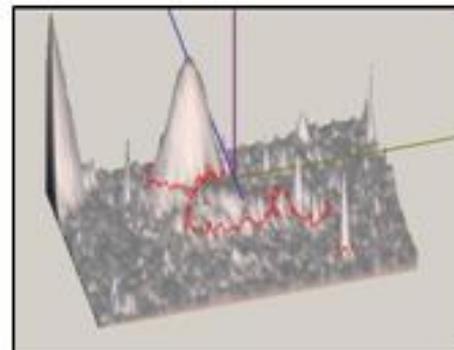
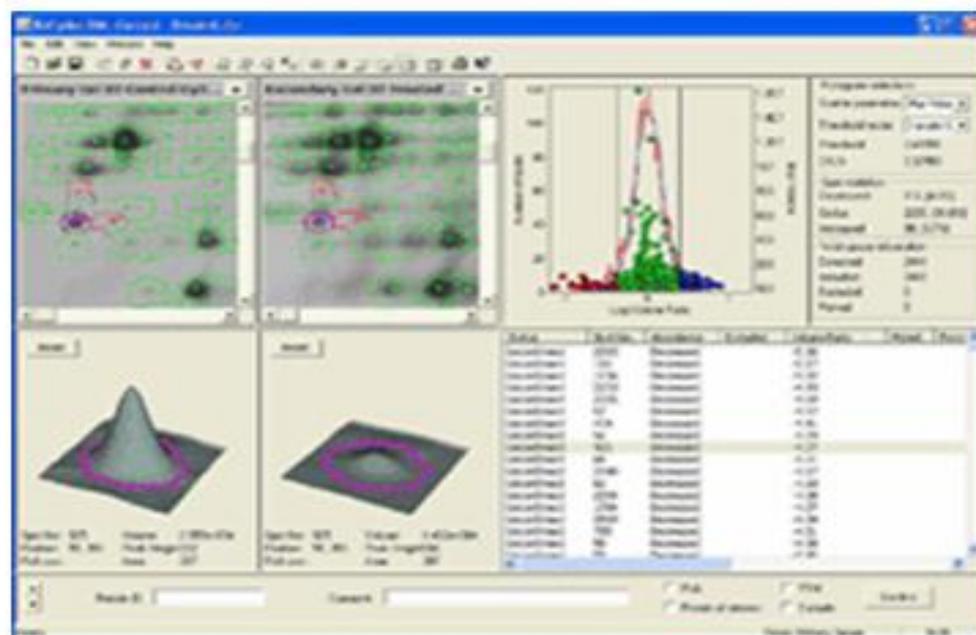


cellules normales

cellules cancéreuses

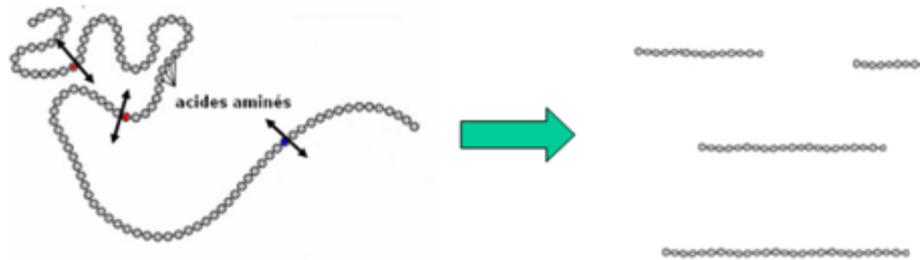
Logiciel d'analyse d'images

Outils de visualisation 3D pour mieux voir les « taches »
Aide pour vérifier la détection faite par le logiciel



L'hydrolyse des protéines par la trypsine

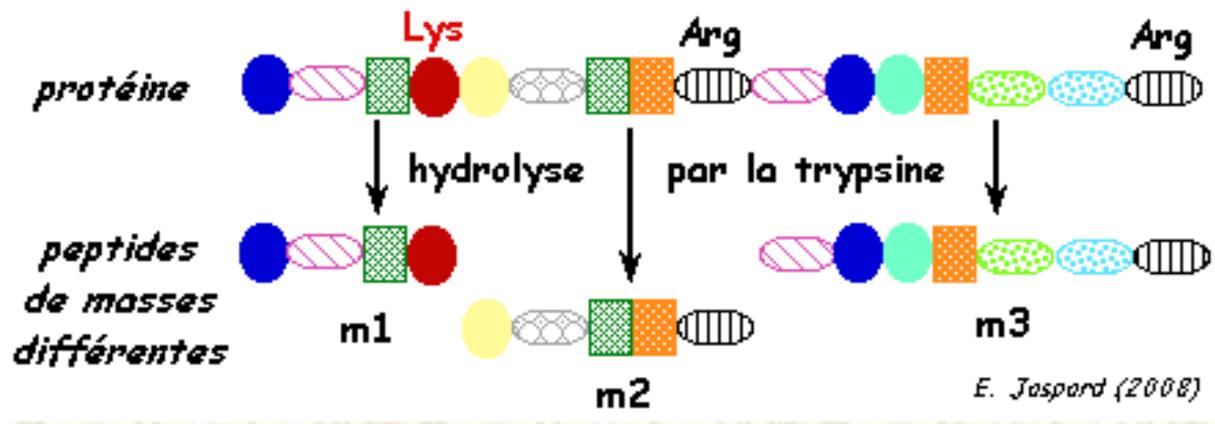
- La ou les protéines contenue(s) dans un spots de l'électrophorèse bi-dimensionnelles est (sont) hydrolysée(s) en fragments peptidiques par une protéase à sérine (essentiellement endopeptidase).



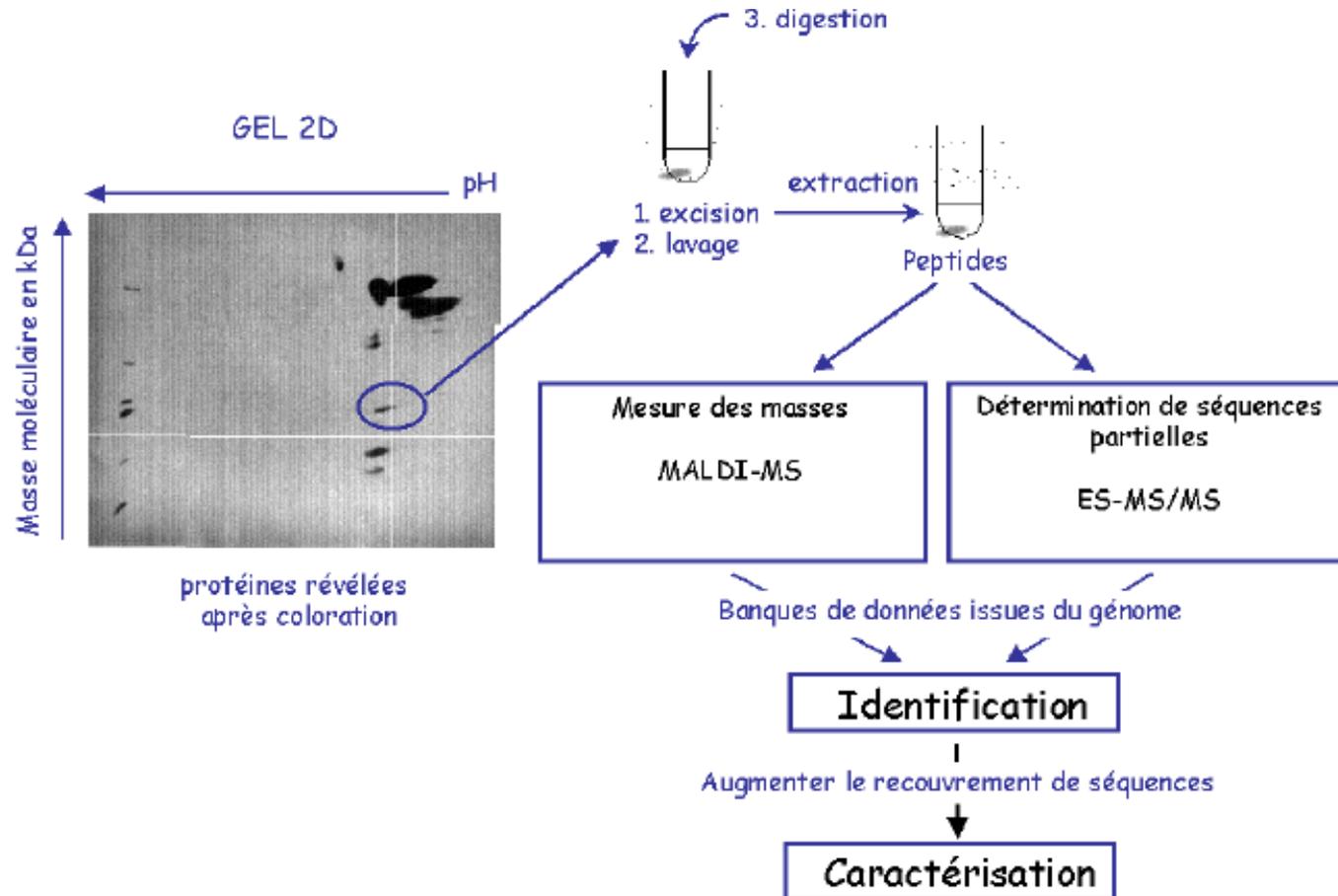
- En général, on utilise la trypsine
- La trypsine hydrolyse la liaison peptidique après (côté C-terminal) les acides aminés lysine et arginine sauf si ces acides aminés sont suivis par une proline. Cependant elle peut avoir une spécificité plus complexe.

L'hydrolyse des protéines par la trypsine

- Ces peptides ont des masses différentes car leur séquence en acides aminés sont différentes .



Détection et quantification des protéines



Méthodes d'ionisation pour l'analyse des peptides

Les méthodes d'ionisation le plus souvent rencontrées pour l'étude des protéines et des peptides sont:

- L'électrospray (ESI)
- La désorption ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

Protéines et peptides

- La spectrométrie de masse va permettre de déterminer le poids moléculaire des peptides ou des protéines mais également leurs séquences.

- Détection de mutations au sein des protéines
- Mise en évidence de modifications post-traductionnelles
- Vérification de la structure et de la pureté des peptides synthétiques ou des protéines produites par génie génétique

Identification des protéines

Identifier une protéine, connaissant son origine, revient à lui attribuer une séquence en acides aminés

Expérimentation

Mesure de la masse
d'une protéine à identifier

Banques de données

Calculs « *in silico* »

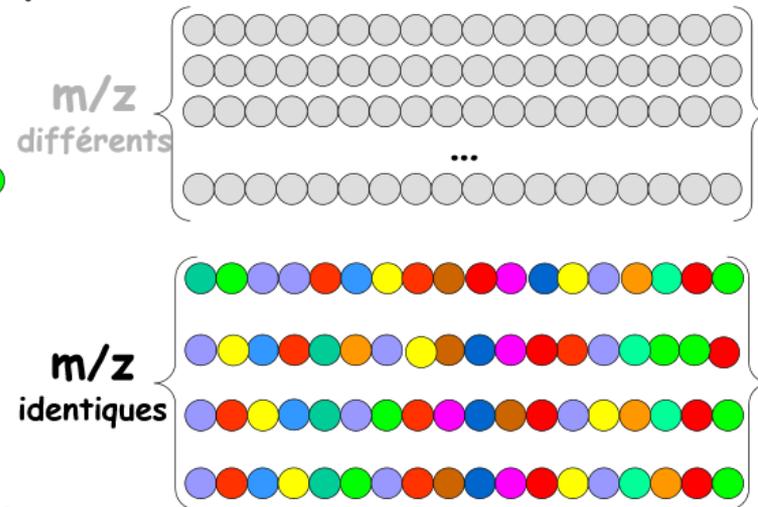
Comparaison



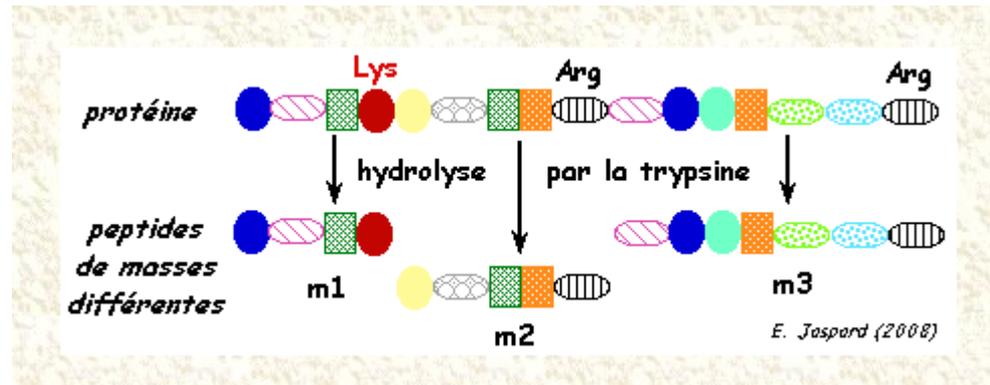
Résultat : masses identiques mais
séquences différentes :

m/z de protéine peu précis

Identification de protéine impossible



Identification des protéines

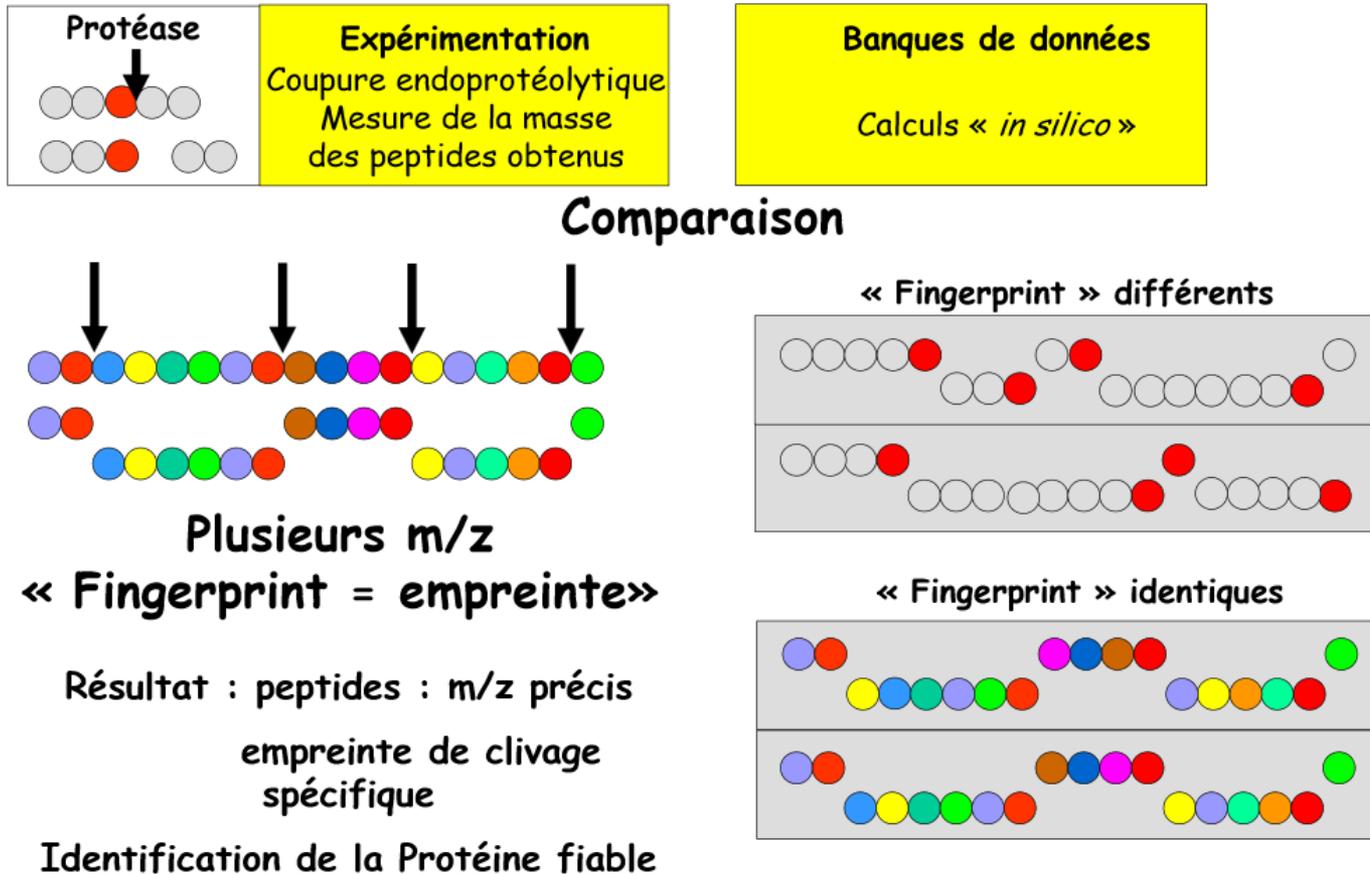


Hydrolyse des protéines par la trypsine (protéase)

La trypsine hydrolyse la liaison peptidique après (côté C-terminal) les acides aminés lysine et arginine sauf si ces acides aminés sont suivis par une proline. Cependant elle peut avoir une spécificité plus complexe.

Ces peptides ont des masses différentes car leur

Identification des protéines



Modifications post-traductionnelles

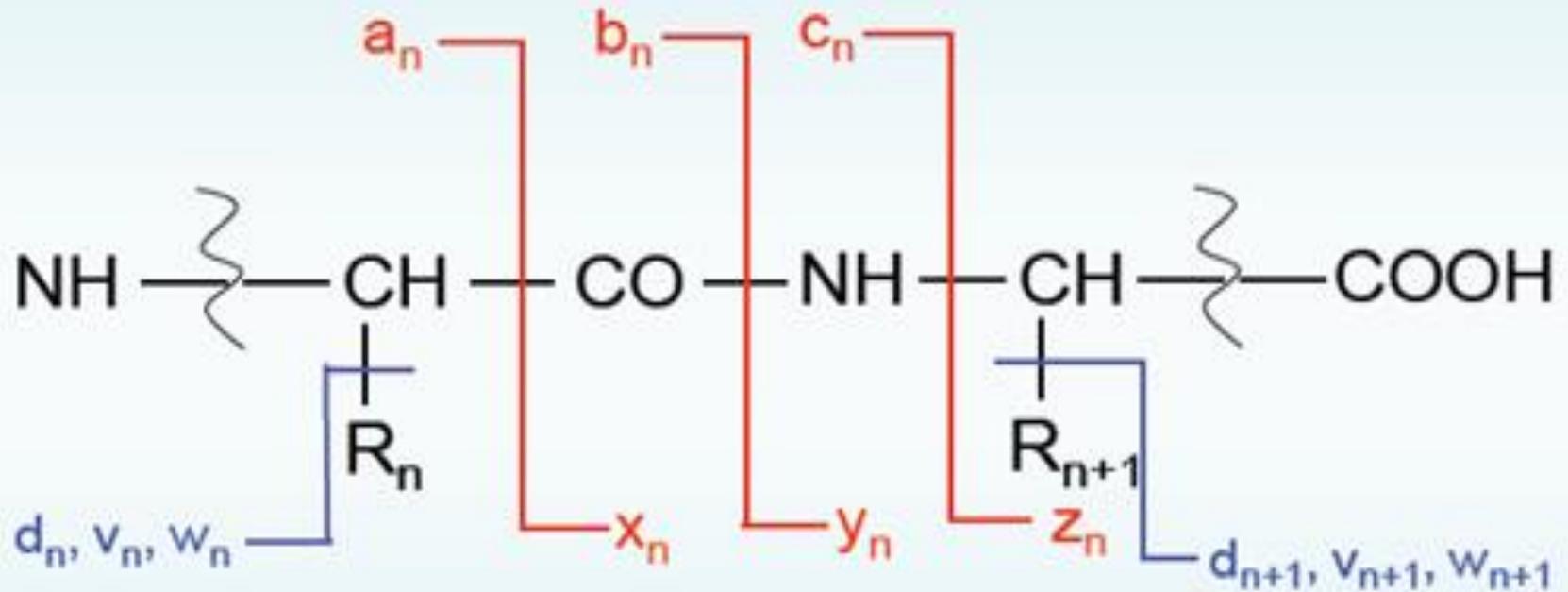
Type	Δm (Da)
Phosphorylation	
pTyr	+80
pSer, pThr	+80
Acetylation	+42
Methylation	+14
Acylation, fatty acid modification	
Farnesyl	+204
Myristoyl	+210
Palmitoyl	+238
etc.	
Glycosylation	
N-linked	>800
O-linked	203, >800
GPI anchor	>1,000
Hydroxyproline	+16
Sulfation (sTyr)	+80
Disulfide bond formation	-2
Deamidation	+1
Pyroglutamic acid	-17
Ubiquitination	>1,000
Nitration of tyrosine	+45

Tout incrément de masse Δm (modification chimique ou mutation d'AA) peut être mesuré par spectrométrie de masse.

Cette détection Δm dépend de la **Résolution** de l'appareil.

Sera d'autant plus notable sur des peptides où les m/z sont bien résolus.

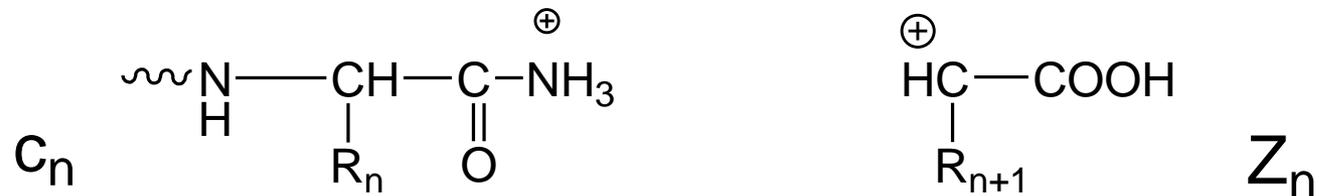
Nomenclature des fragments peptidiques



Fragments observés en haute et basse énergie

Fragments observés seulement en haute énergie

Nomenclature des fragments peptidiques



Nomenclature des fragments peptidiques

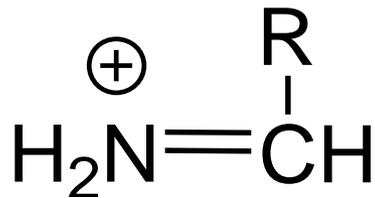
- La différence de masse entre des ions consécutifs d'une même série permet de déterminer les acides aminés consécutifs et donc de déduire la séquence du peptide.

Tableau 7.2 : Incréments de masses des différents acides aminés

Acides aminés	code 3 lettres	code 1 lettre	Masse monoisotopique (u)	Masse chimique (Da)
Glycine	Gly	G	57,021 47	57,052
Alanine	Ala	A	71,037 12	71,079
Sérine	Ser	S	87,032 03	87,078
Proline	Pro	P	97,052 77	97,117
Valine	Val	V	99,068 42	99,133
Thréonine	Thr	T	101,047 68	101,105
Cystéine	Cys	C	103,009 19	103,144
Isoleucine	Ile	I	113,08 407	113,160
Leucine	Leu	L	113,084 07	113,160
Asparagine	Asn	N	114,042 93	114,104
Aspartate	Asp	D	115,026 95	115,089
Glutamine	Gln	Q	128,058 58	128,131
Lysine	Lys	K	128,094 97	128,174
Glutamate	Glu	E	129,042 60	129,116
Méthionine	Met	M	131,040 49	131,198
Histidine	His	H	137,058 91	137,142
Phénylalanine	Phe	F	147,068 42	147,177
Arginine	Arg	R	156,101 12	156,188
Tyrosine	Tyr	Y	163,063 33	163,17
Tryptophane	Try	W	186,079 32	186,213

Nomenclature des fragments peptidiques

- Autres fragments pouvant être observés: les ions immoniums, notés P, V, L ...



Acides aminés	Masse caractéristique
Proline (P)	70
Valine (V)	72
Leucine (L)	86
Isoleucine (I)	86
Méthionine (M)	104
Histidine (H)	110
Phénylalanine (F)	120
Tyrosine (Y)	136
Tryptophane (W)	159

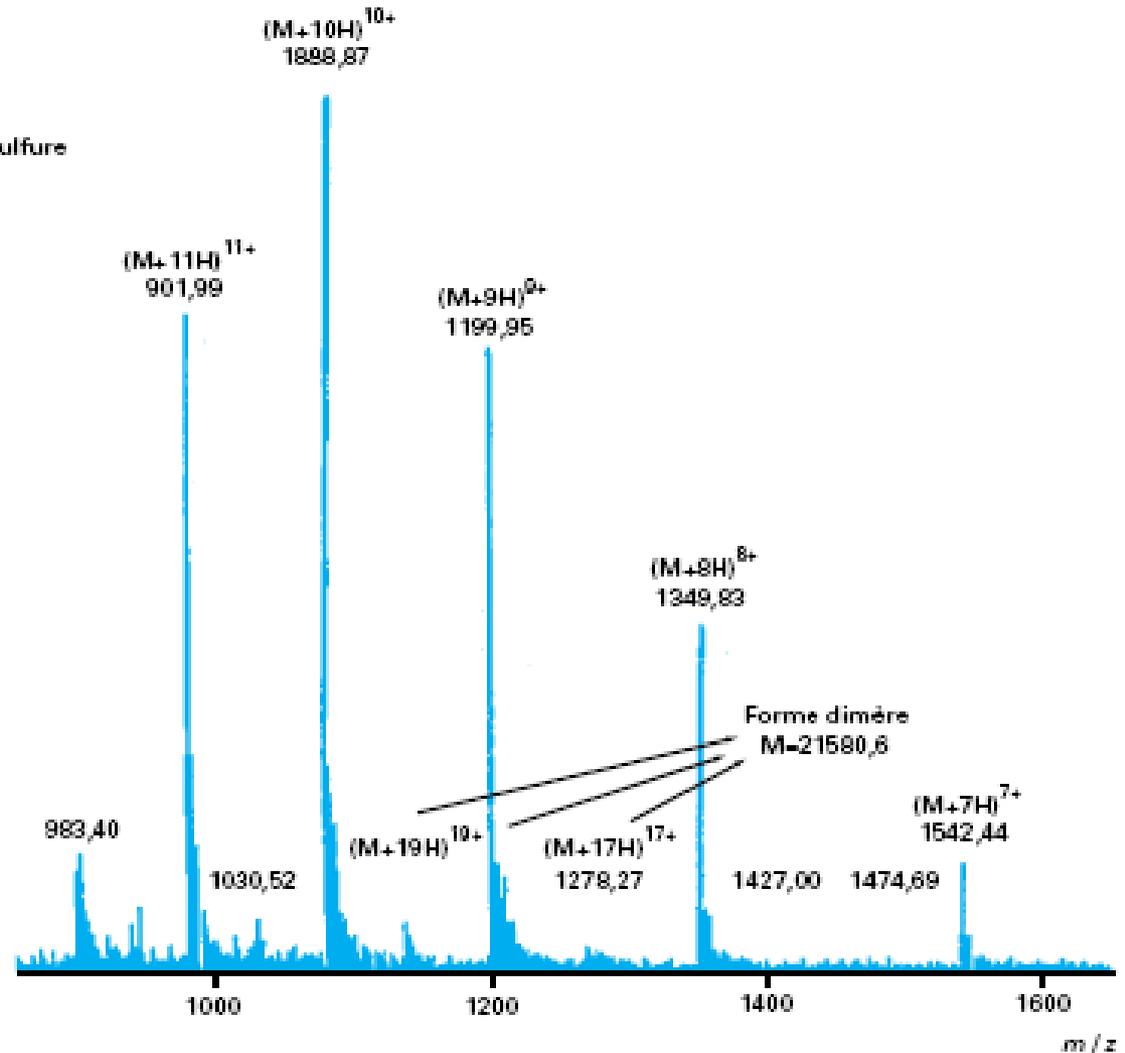
Spectre de l'angiogénine

masse théorique = 10792,8

masse mesurée = 10790,6

$\Delta = 2$, d'où l'existence probable d'un pont disulfure entre les deux cystéines de la séquence

(a) spectre électrospray de l'angiogénine

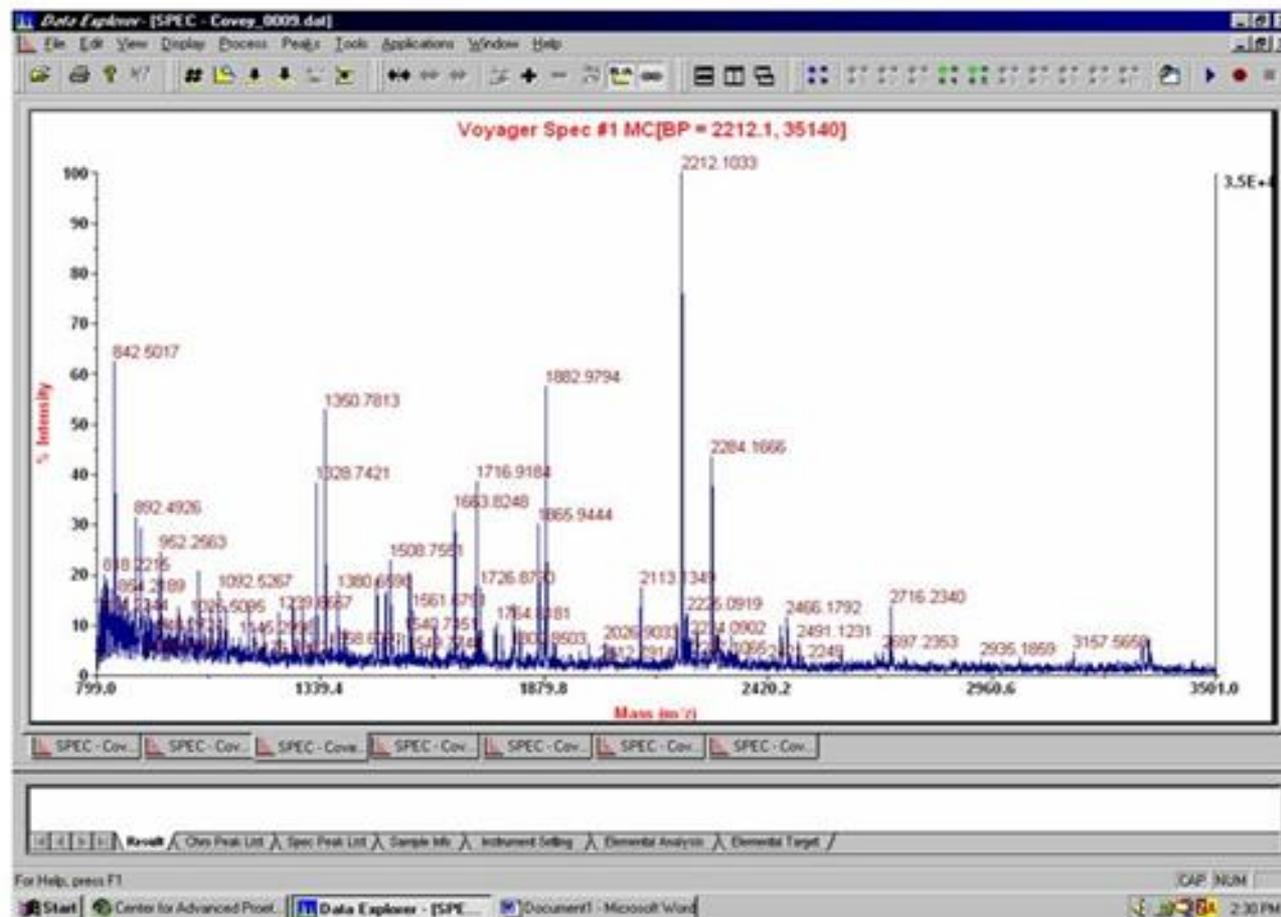


Spectrométrie de masse

Résultat : spectre de masse des fragments de la protéine

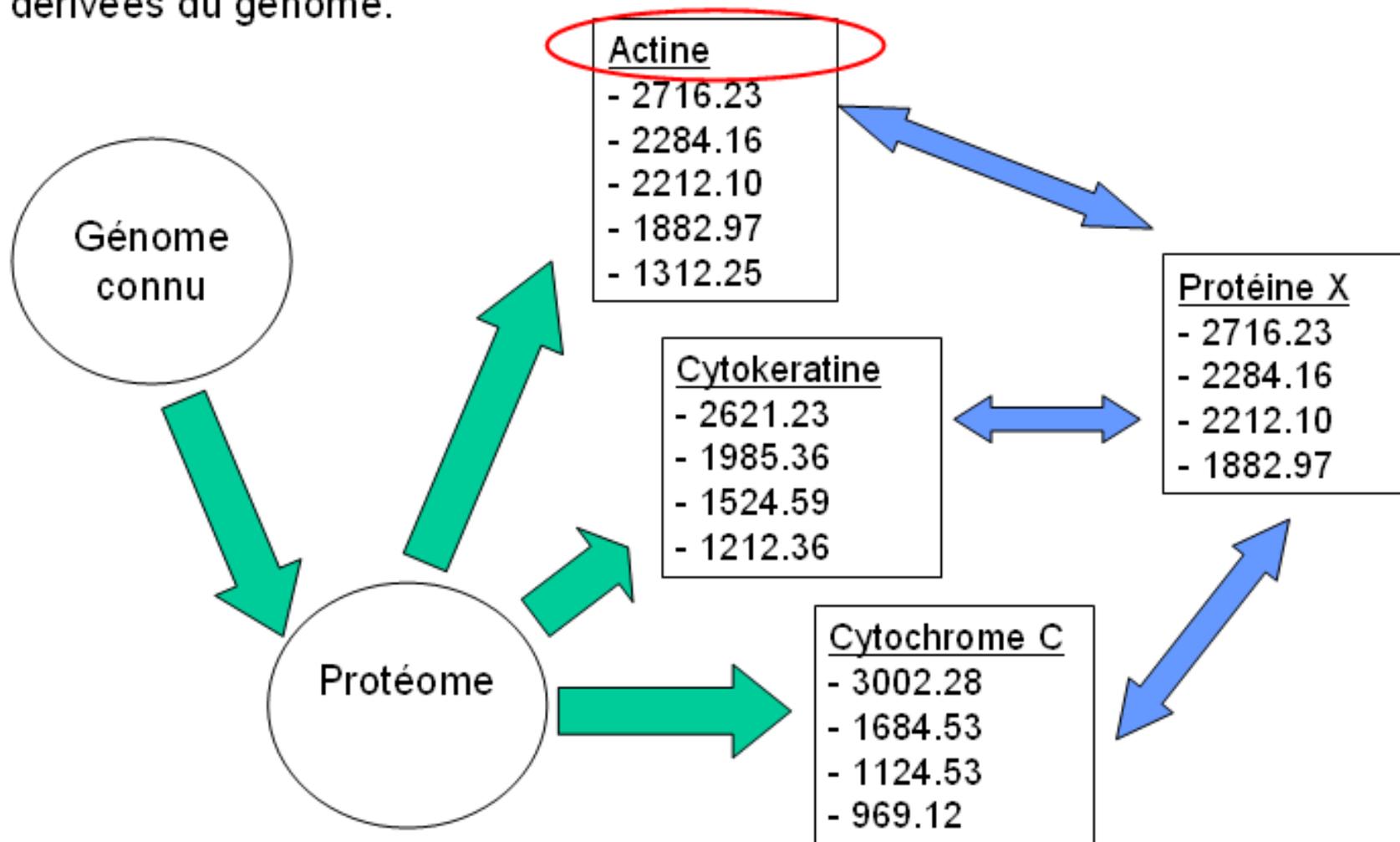
Liste de masses

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



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.



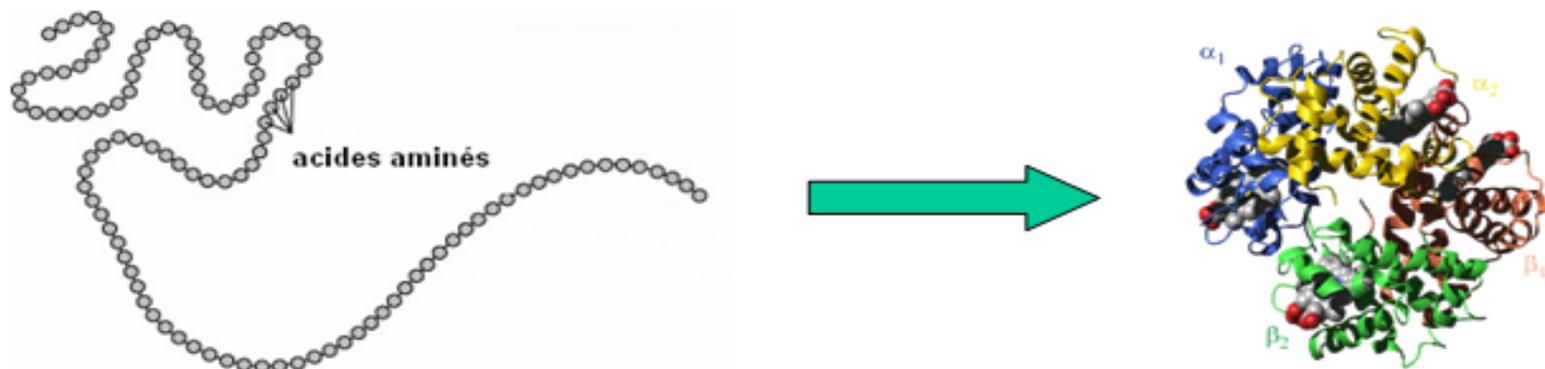
Outils informatiques pour l'étude des protéines

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.

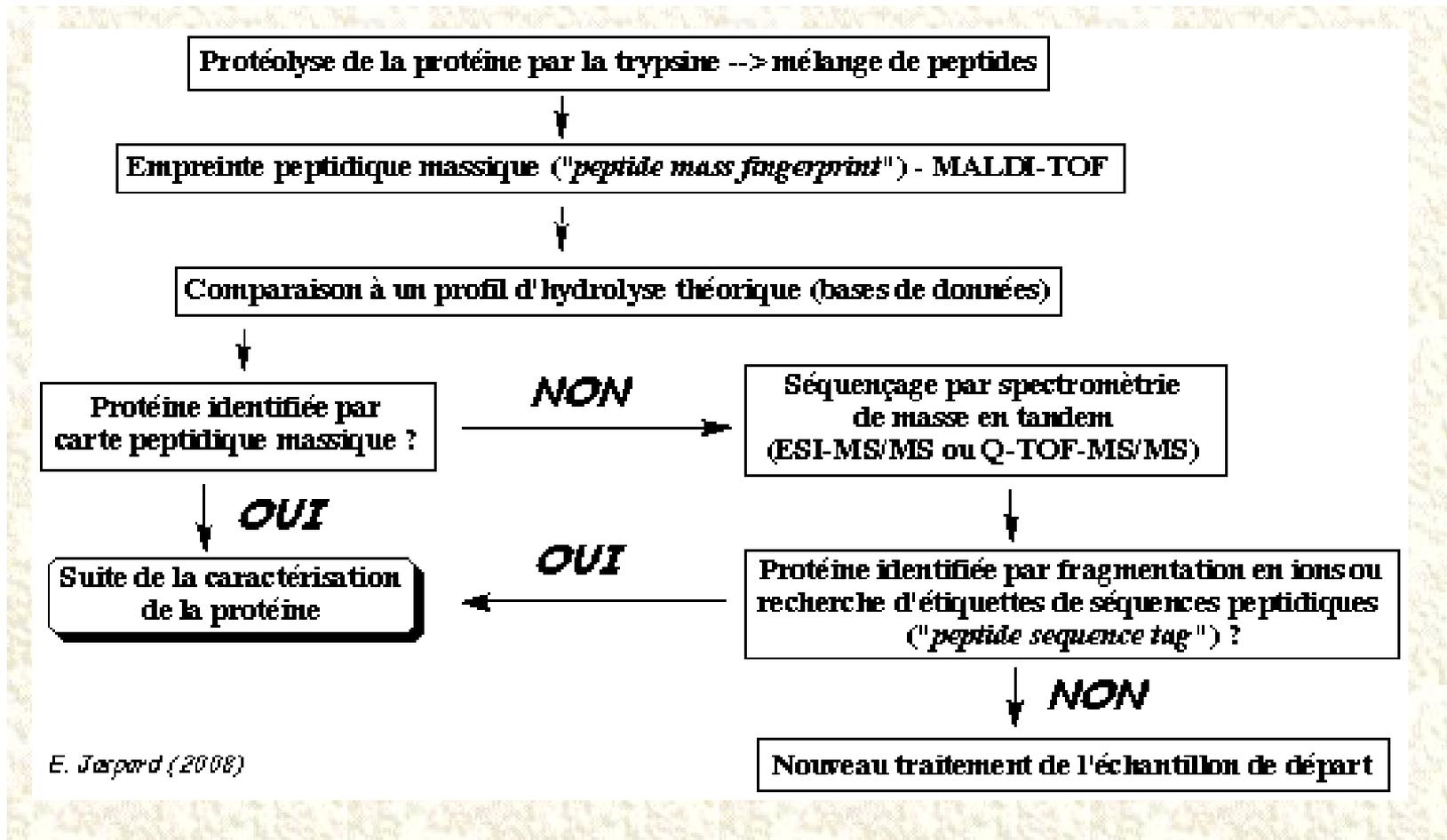
Souvent les programmes se basent sur des modèles de structures de protéines connues (détermination de la structure par homologie).



Outils informatiques pour l'étude des protéines

- Plusieurs algorithmes ont été développés pour interpréter les spectres de fragmentations des peptides à haute et basse énergie. Exemple: algorithme nommé SEQUEST
- Les différentes informations récoltées sur les protéines (masse apparente, point isoélectrique, taille des fragments après digestion enzymatique...) sont comparées aux bases de données génomiques ou protéomiques. Les logiciels fournissent une liste de protéines et leurs probabilités.

Principe de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse



Conclusions

- Protéomique: Domaine d'avenir
- Domaine pluridisciplinaire faisant intervenir des biologistes, des chimistes, des physiciens, des bioinformaticiens