

La spectrométrie de masse : Une technique d'étude structurale des protéines

Cours 2013 L2

Régine Lebrun

rlebrun@imm.cnrs.fr

Plate-forme Protéomique de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée
FR3479 CNRS-AMU

Introduction : quelques définitions

Chapitre I : Principes

**1.1 Schéma du spectromètre de masse :
source-analyseur-détecteur**

1.2 L'ionisation dans la Source

1.2.1. l'ionisation chimique (IC)

**1.2.2. Désorption-Ionisation Laser Assistée par
Matrice (MALDI)**

1.2.3. l'électronebulisation (ESI)

1.3 Les analyseurs

1.3.1. à temps de vol (TOF)

1.3.2. quadripolaire (Q) et trappe à ions (IT)

1.4 L'analyse MS et la fragmentation MS/MS

1.5 Couplage Chromatographie - Spectromètre de masse

Chapitre II: Applications aux peptides, aux protéines et au Protéome**2.1. Caractérisation physico-chimique par la masse globale**

- 2.1.1. contrôle de l'intégrité de protéine**
- 2.1.2. interactions protéine-ligand**
- 2.1.3. modifications post-traductionnelles**
- 2.1.4. interactions protéine-protéine:
oligomérisation /stoechiométrie**

2.2. Identification de protéines : Protéomique Descriptive

- 2.2.1. quelques définitions**
- 2.2.2. principe et ex de «peptide mass fingerprint »**
- 2.2.3. exploitation de la fragmentation MS/MS**
- 2.2.4. de la protéine au Protéome**

2.3. Quantification de protéines : Protéomique Quantitative

- 2.3.1. quantification relative**
- 2.3.2. quantification absolue**
- 2.3.3. quantification « label free »**

Introduction : quelques définitions

Les molécules biologiques sont composées essentiellement de:

Carbone : C

Hydrogène : H

Oxygène : O

Azote : N

Phosphore : P

Souffre : S

A chacun de ces nucléides correspond une masse atomique.
Connaissant la formule brute d'une molécule,
on peut donc calculer une 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 :

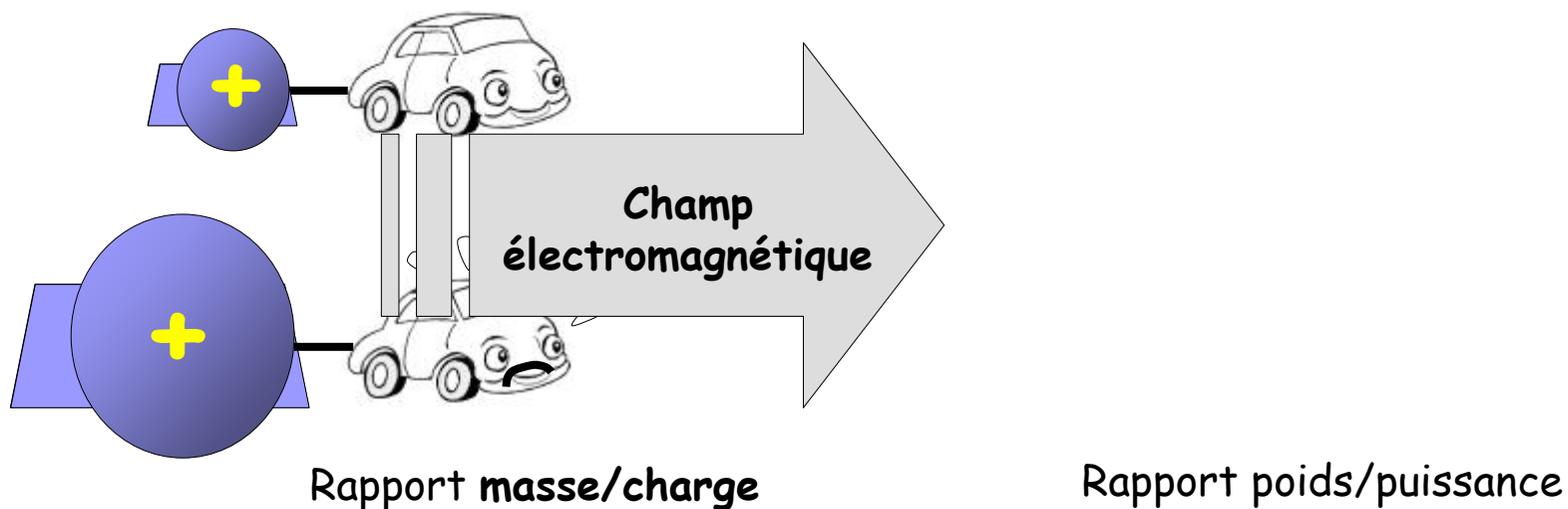
$$1\text{u} = 1\text{Da} = 1,660540 \times 10^{-27} \text{ kg}$$

Introduction : quelques définitions

La **spectrométrie de masse** est une technique d'analyse physico-chimique permettant de **détecter**, **d'identifier** et de **quantifier** des molécules d'intérêt par mesure de leur **masse**

Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (**ions**) en fonction de leur **rapport masse/charge** (m/z).

De plus, la spectrométrie de masse permet de caractériser la **structure chimique** des molécules en les **fragmentant**.

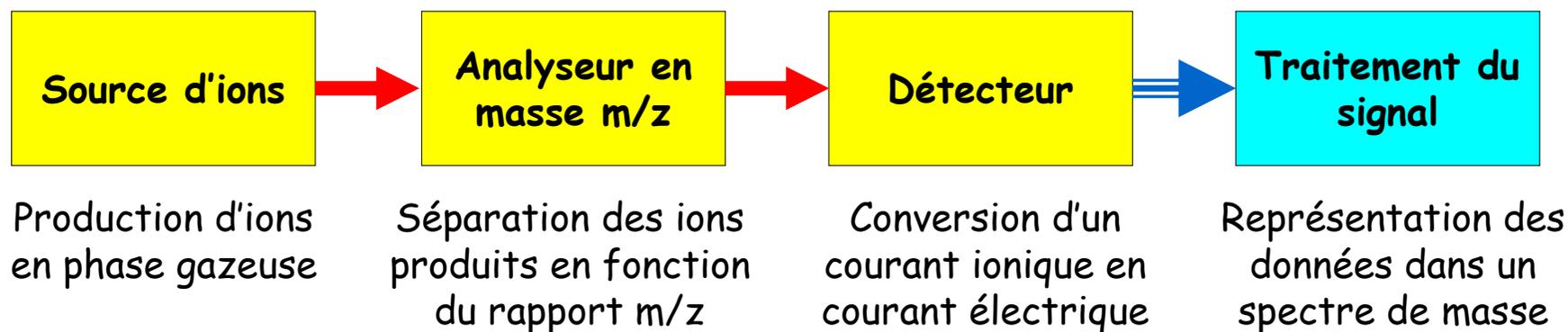




Chapitre I : Principes

1.1 Schéma du spectromètre de masse :

source-analyseur-détecteur



1.2 L'ionisation dans la Source :

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

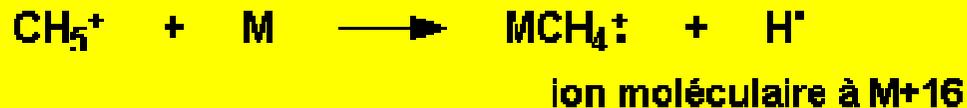
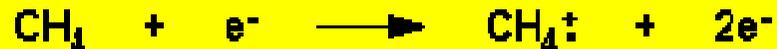
Dispersion en
microgouttelettes
sous haute tension

Electronébulisation

1.2 L'ionisation dans la source

1.2.1. 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.

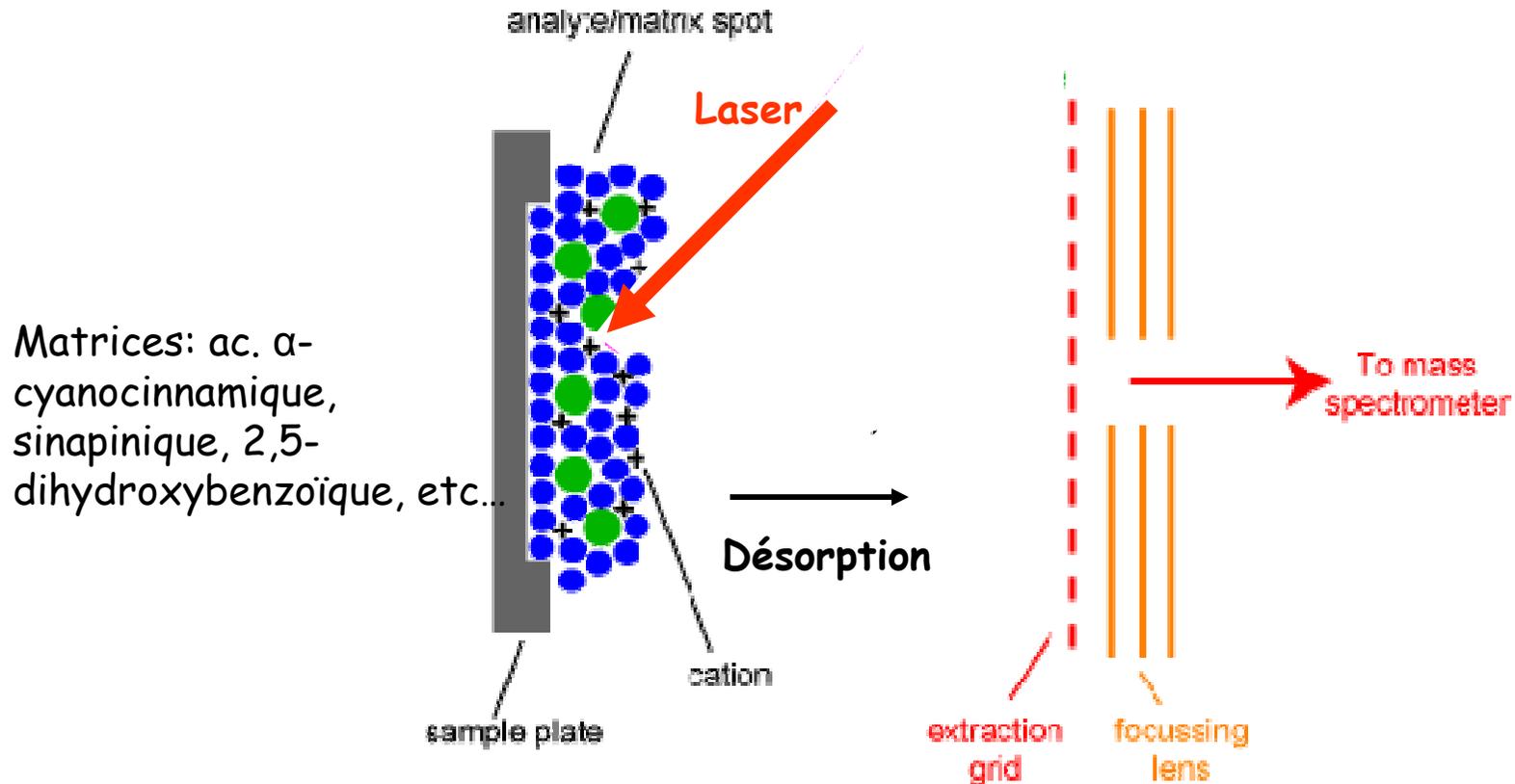
Ce type de réactions ions-molécules produit principalement des ions $[\text{MH}]^+$ et $[\text{MCH}_4]^{\cdot+}$.

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

1.2 L'ionisation

1.2.2. Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)

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



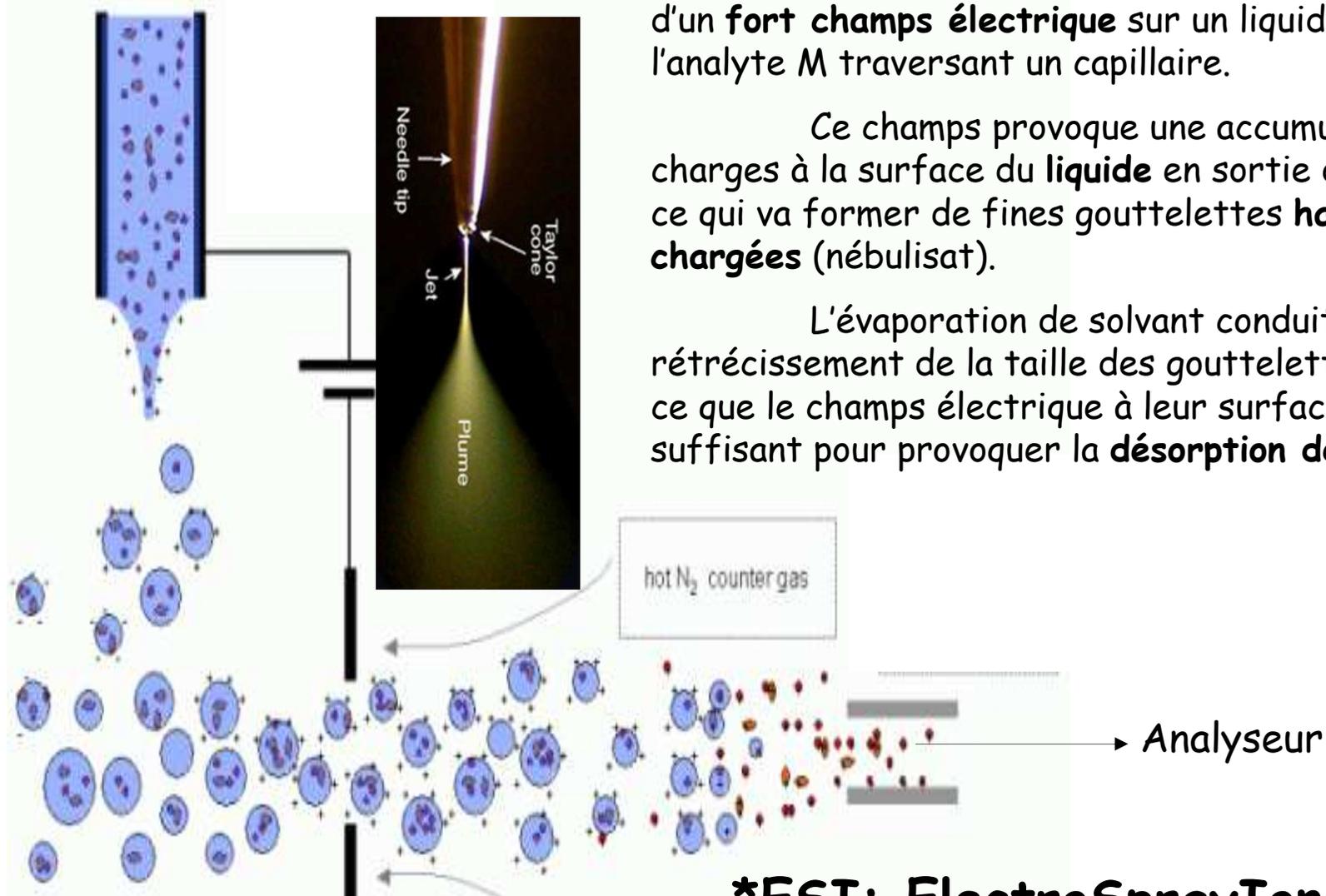
L'analyte M est dispersé dans une solution saturée de petites molécules aromatiques (**matrice**) et l'ensemble est co-cristallisé par évaporation du solvant. Le **dépôt solide** obtenu est irradié par un **laser** de longueur d'onde où les molécules de matrice ont une forte absorption. Il en résulte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

*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

1.2 L'ionisation

1.2.3. Electronébulisation (ESI)

Débits 1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$ à 300nl/min



L'électrospray est produit par application d'un **fort champ électrique** sur un liquide contenant l'analyte M traversant un capillaire.

Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du **liquide** en sortie du capillaire, ce qui va former de fines gouttelettes **hautement chargées** (nébulisat).

L'évaporation de solvant conduit au rétrécissement de la taille des gouttelettes jusqu'à ce que le champ électrique à leur surface soit suffisant pour provoquer la **désorption des ions**.

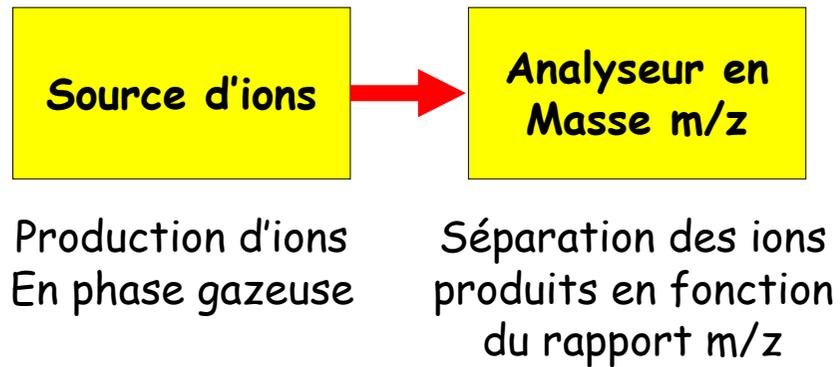
***ESI: ElectroSprayIonisation**

1.2 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>

1.3 Les analyseurs

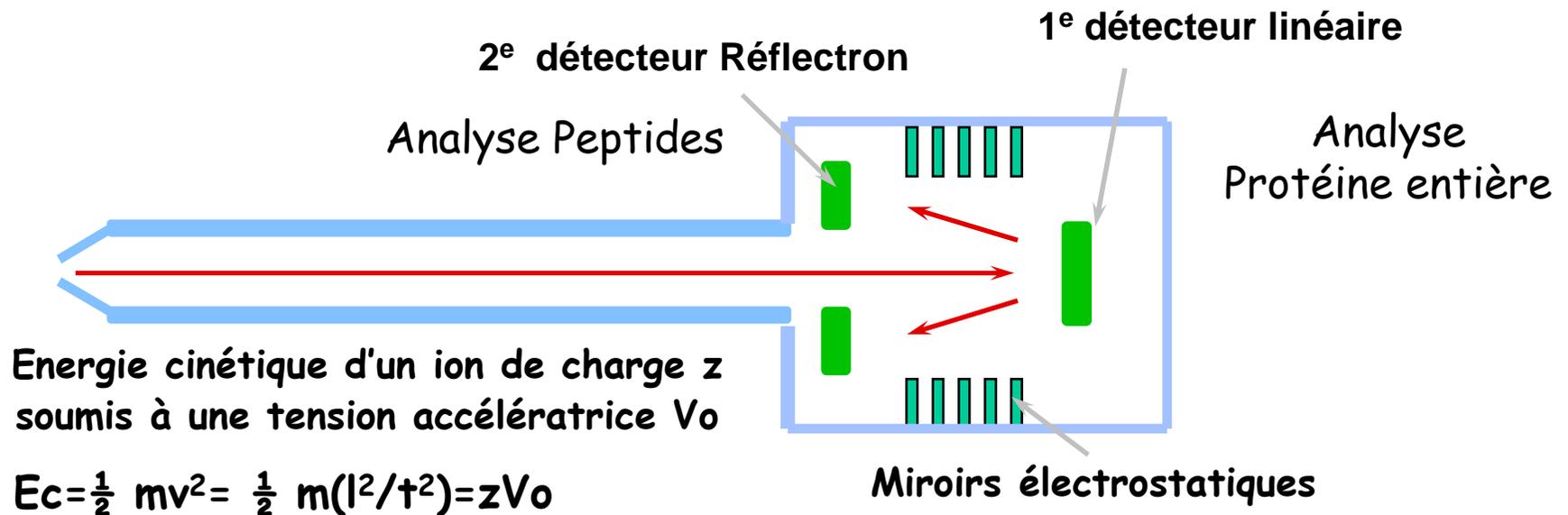


1.3 Les analyseurs

1.3.1. à temps de vol (TOF)

L'Analyseur :
Tube de Vol de longueur l

Le Détecteur :
Scintillateur/Photomultiplicateur



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

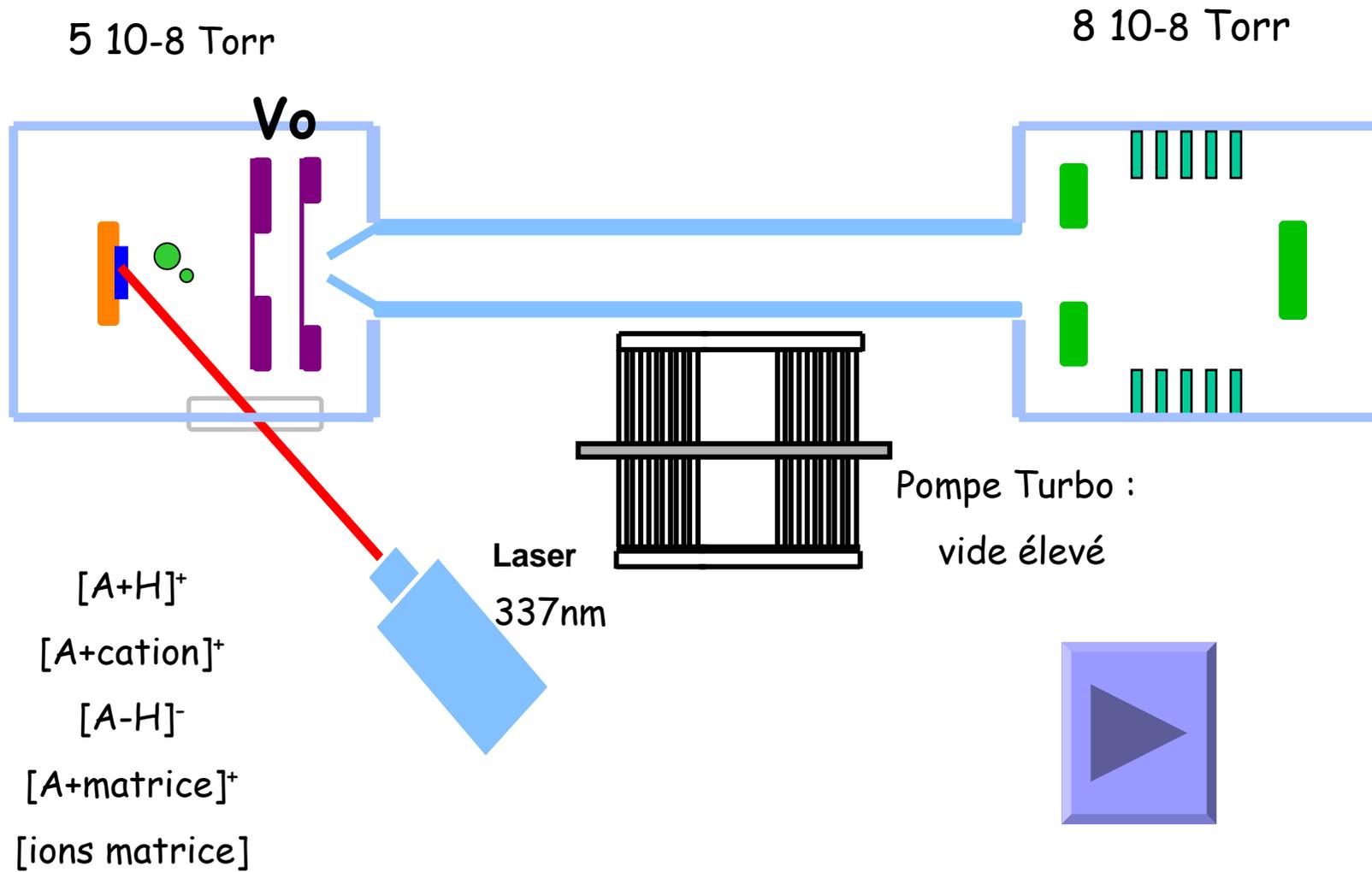
$$E_c = \frac{1}{2} m v^2 = \frac{1}{2} m (l^2 / t^2) = z V_0$$

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

rapport m/z = fonction du temps de vol t

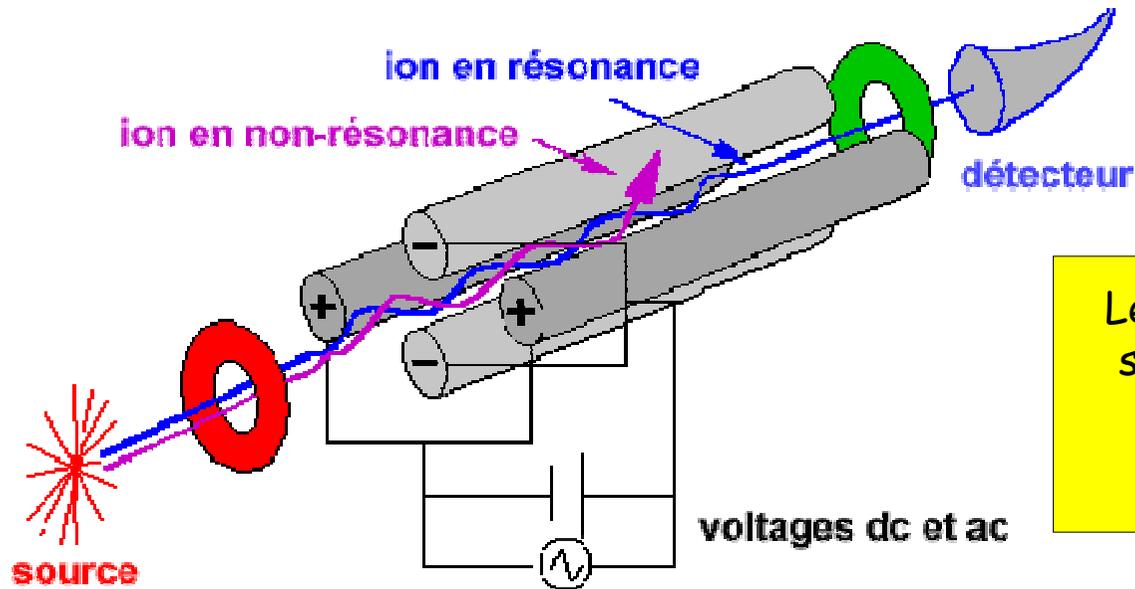
* TOF: Time of Flight

Couplage MALDI-TOF



1.3 Les analyseurs

1.3.2. quadripolaire (Q)



Les ions émanant de la source sont soumis à une tension continue (U) et une tension alternative (V) appliquées entre 4 électrodes.

Le trajet des ions dans le quadripole est **oscillant**.

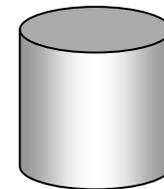
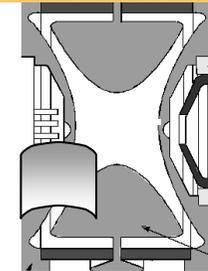
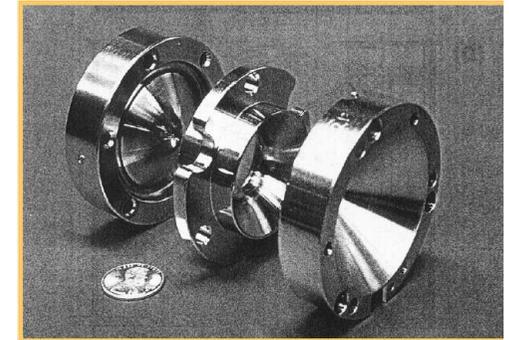
Si l'amplitude des oscillations est trop grande, les ions sont collectés par les barres du quadripole et ils ne seront pas détectés.

On règle U et V de sorte que seul un ion de rapport m/z choisi puisse se frayer un chemin jusqu'au détecteur (trajectoire stable). Pour obtenir des mesures sur une gamme de rapports masse/charge, on modifie les réglages de l'appareil à haute fréquence.

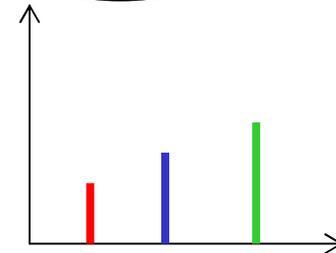
1.3 Les analyseurs

1.3.2. Trappe à ions (Ion Trap)

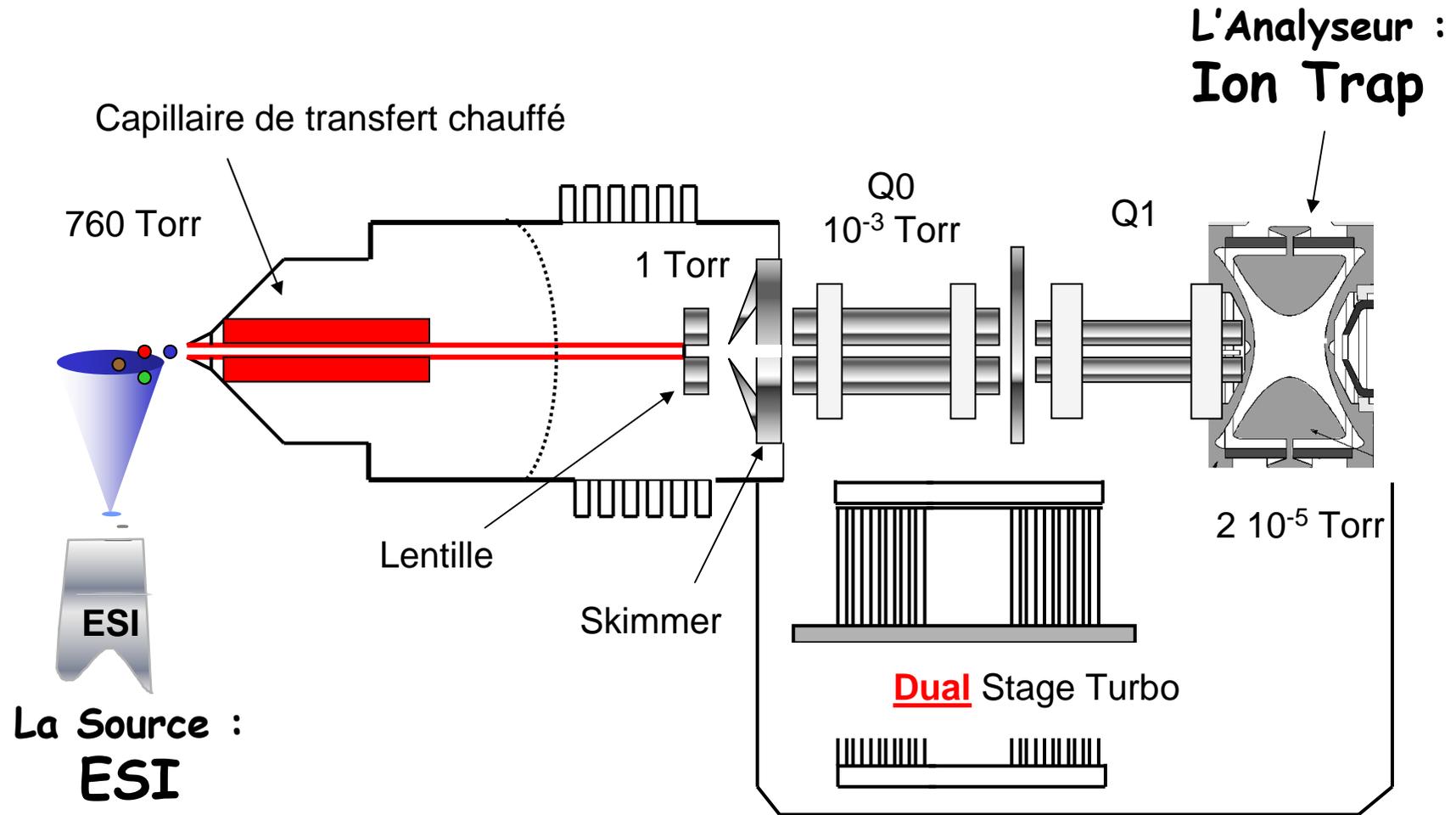
Les ions décrivent
des mouvements
oscillatoires stables
au centre de la trappe.
Par application
d'une rampe de Radiofréquences
au niveau de l'électrode annulaire,
les ions vont avoir
une trajectoire déstabilisée
et vont être éjectés
de la trappe
en fonction de leur m/z croissant.



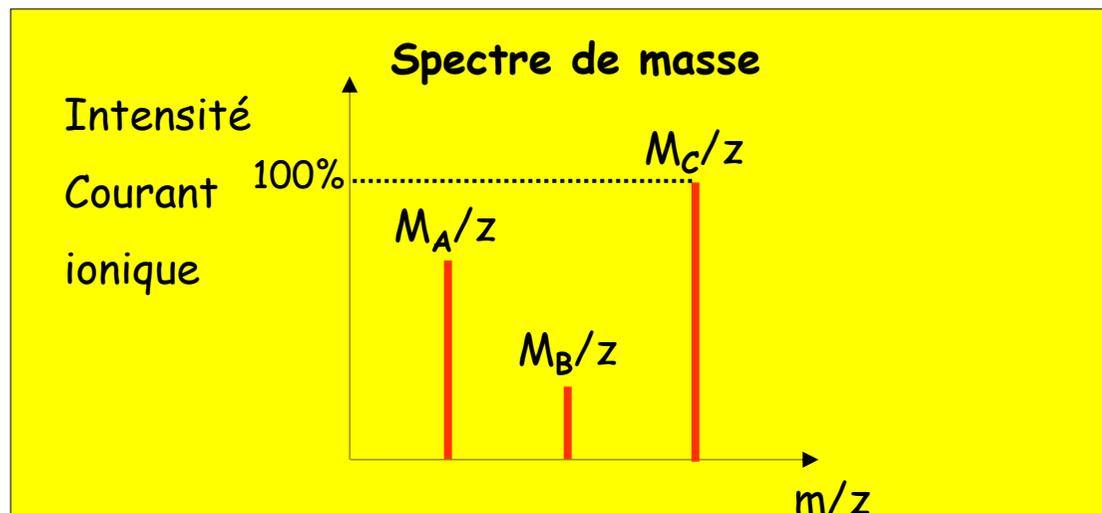
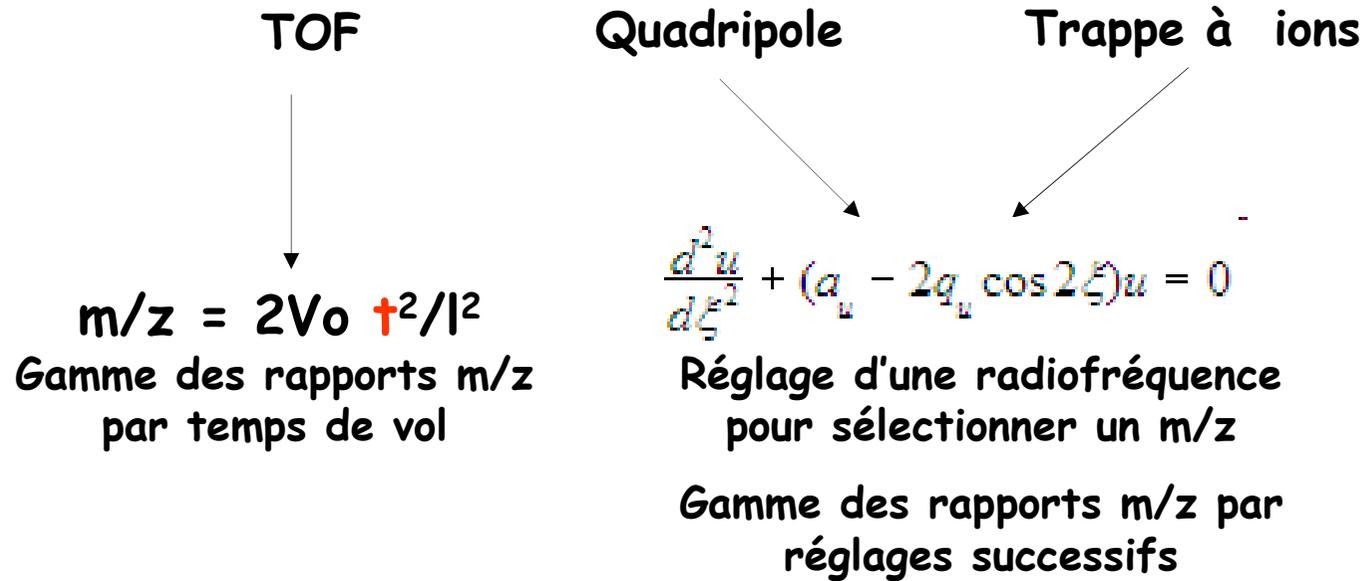
Spectre MS



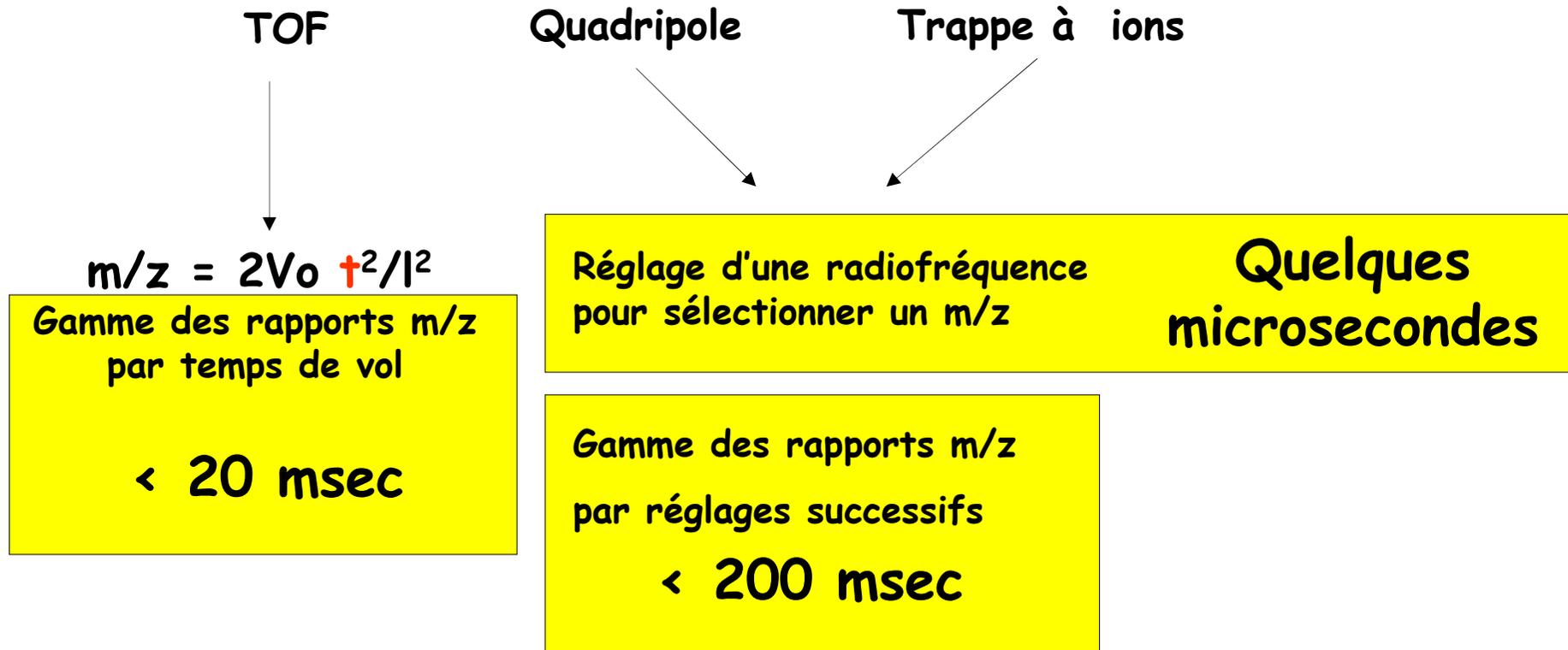
Couplage ESI-Trappe à ions (IT)



1.4. l'analyse MS



Temps d'acquisition en spectrométrie de masse



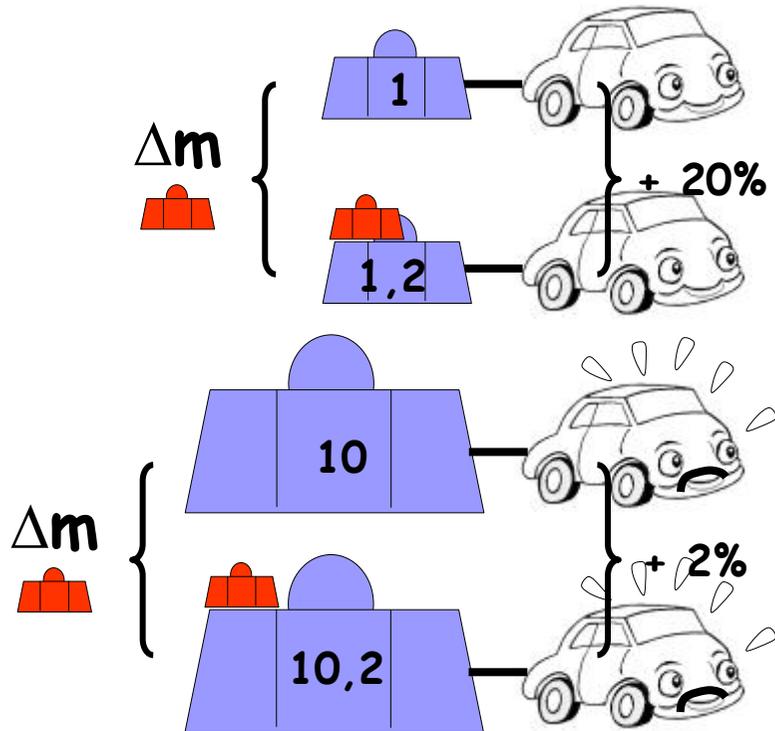
Sensibilité de la spectrométrie de masse

De l'ordre de l'**attomole**

1 mole		$\mathcal{N} = 6,03 \cdot 10^{23}$
milli mole	10^{-3}	
micro	10^{-6}	
nano	10^{-9}	
pico	10^{-12}	
femto	10^{-15}	
atto	10^{-18}	$6,03 \cdot 10^5$
		soit 600 000 molécules !!!

Résolution de la spectrométrie de masse

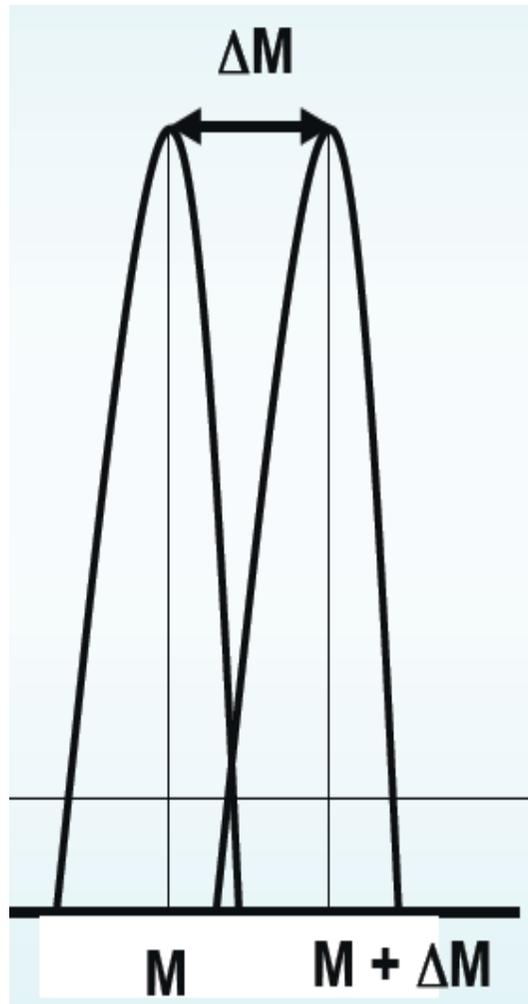
Dépend de la qualité de l'appareil
Fonction du rapport masse/charge



Rapport poids/puissance

Résolution de la spectrométrie de masse

Dépend de la qualité de l'appareil
Fonction du rapport masse/charge



La résolution mesure l'aptitude d'un analyseur
à séparer l'ion M de l'ion $M + \Delta M$

$$\text{Résolution} = M / \Delta M$$

Dès lors, un spectromètre dont la **résolution** est de

2000

peut séparer des pics situés à des valeurs m/z de

2000 et 2001

200 et 200,1

20,00 et 20,01

Isotopes naturels

Élément	Masse atomique	Nucléide	Masse exacte	Abondance relative (%)
H	1,00797	^1H	1,00783	99,985
		D (ou ^2H)	2,01410	0,0151
C	12,01115	^{12}C	12,00000	98,90
		^{13}C	13,00336	1,10
N	14,0067	^{14}N	14,0031	99,63
		^{15}N	15,0001	0,37
O	15,9994	^{16}O	15,9949	99,76
		^{17}O	16,9991	0,04
		^{18}O	17,9992	0,20
P	30,974	^{31}P	30,974	100
S	32,064	^{32}S	31,9721	95,03
		^{33}S	32,9715	0,75
		^{34}S	33,9679	4,22
		^{36}S	35,9671	0,02

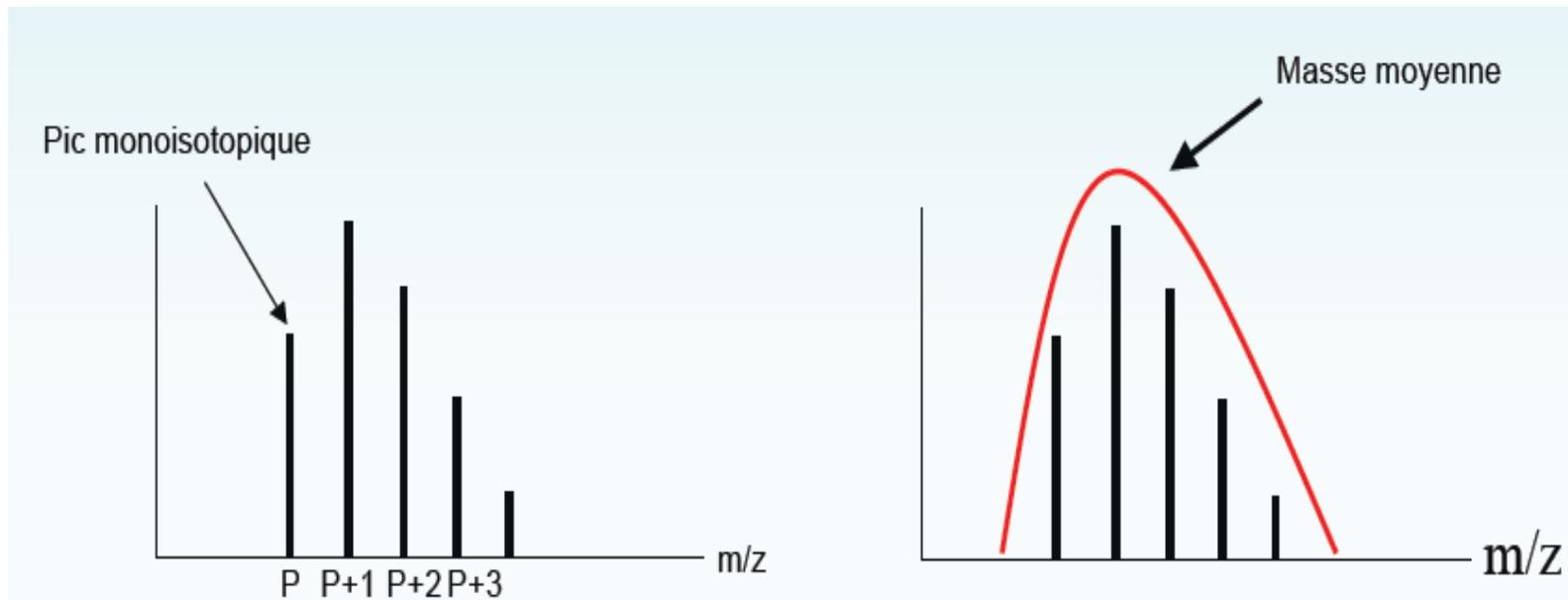
Isotopes naturels

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 ($C=12,011$).

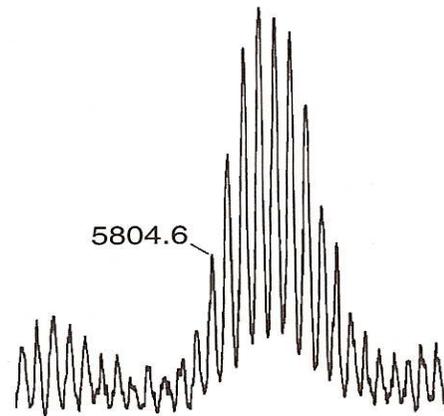


Isotopes naturels et résolution

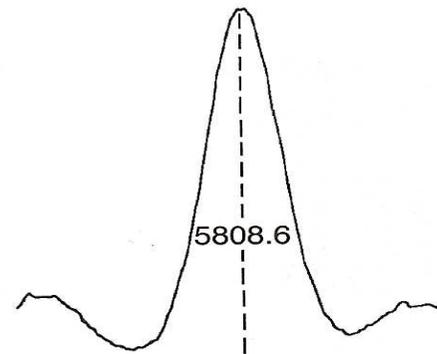
Exemple : Spectre de l'insuline (Masse moyenne : 5807,22)

Résolution:

6000



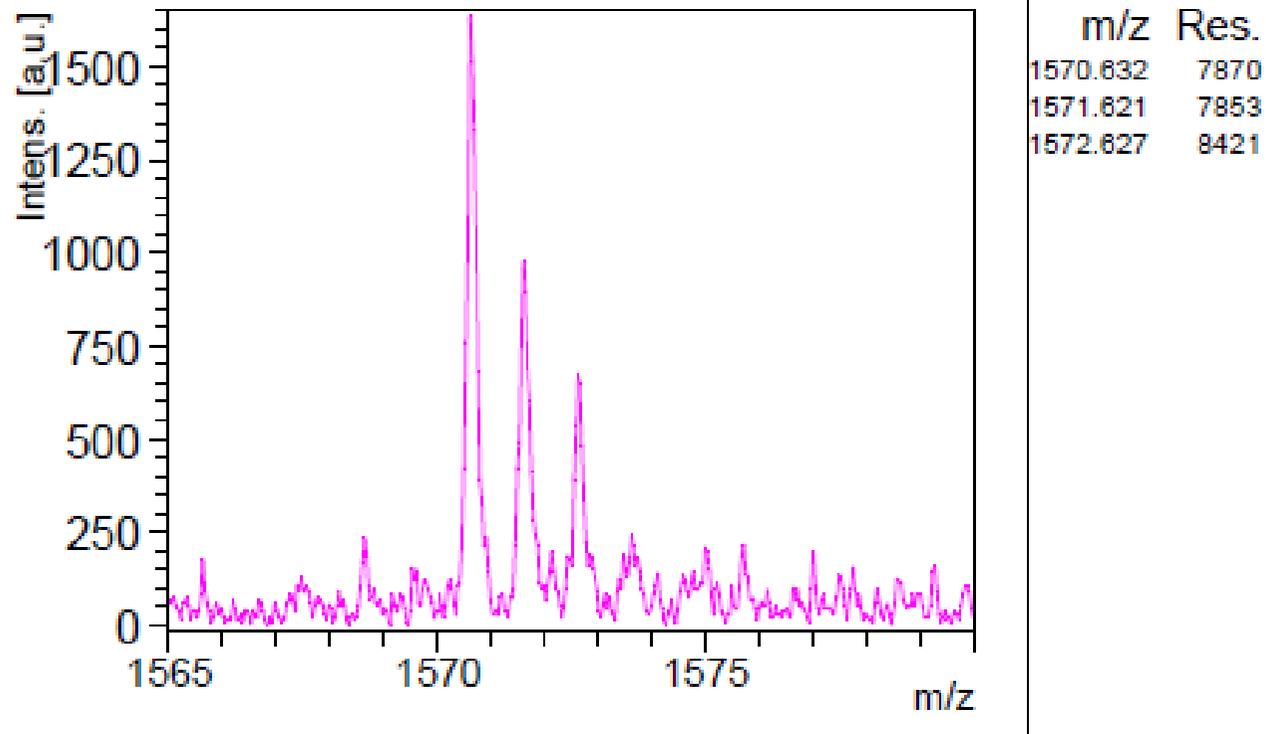
500



1.4. l'analyse MS

Exemple d'un Spectre MS simple par MALDI-TOF d'un peptide de 1570,632 ua

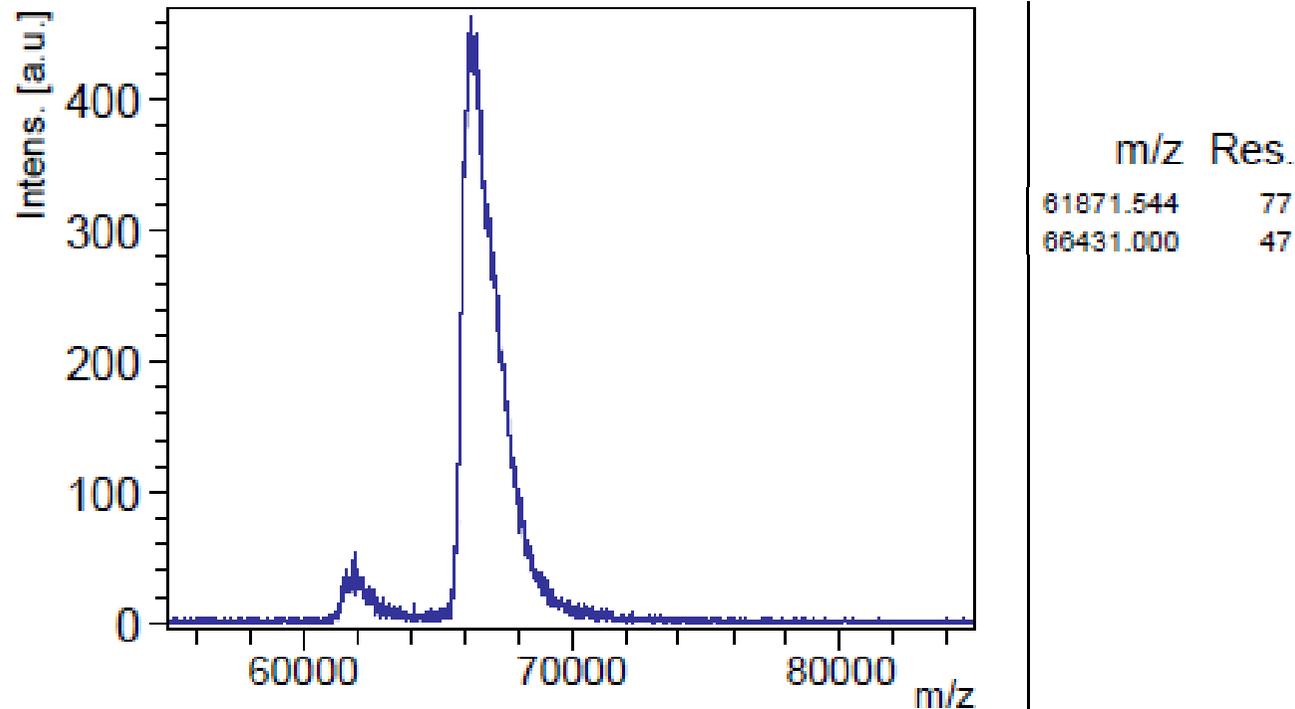
Analyse d'1fmol de Glu-Fib purifié
En mode Réflectron



1.4. l'analyse MS

Exemple d'un Spectre MS simple par MALDI-TOF d'une protéine de 66,5 kDa

Analyse de 500fmol de BSA
En mode Linéaire



1.4. l'analyse MS-MS

Fragmentation

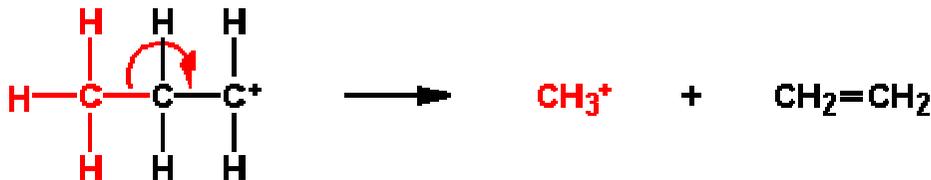
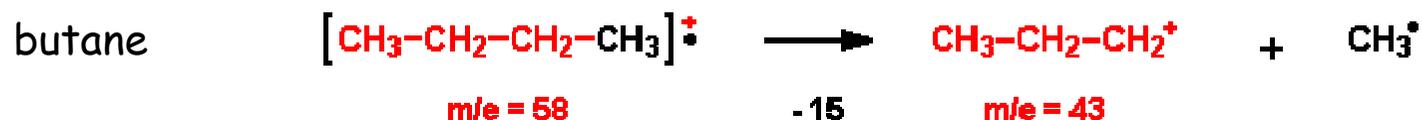
Consiste à sélectionner un ion (**MS**-MS), en provoquer la fragmentation, puis analyser la masse des fragments obtenus (MS-**MS**).

L'ion sélectionné est conduit dans une cellule de collision remplie d'un gaz inerte (argon par exemple).

Lorsque l'ion sélectionné rentre en **collision avec ce gaz**, son énergie cinétique est convertie en **énergie interne**.

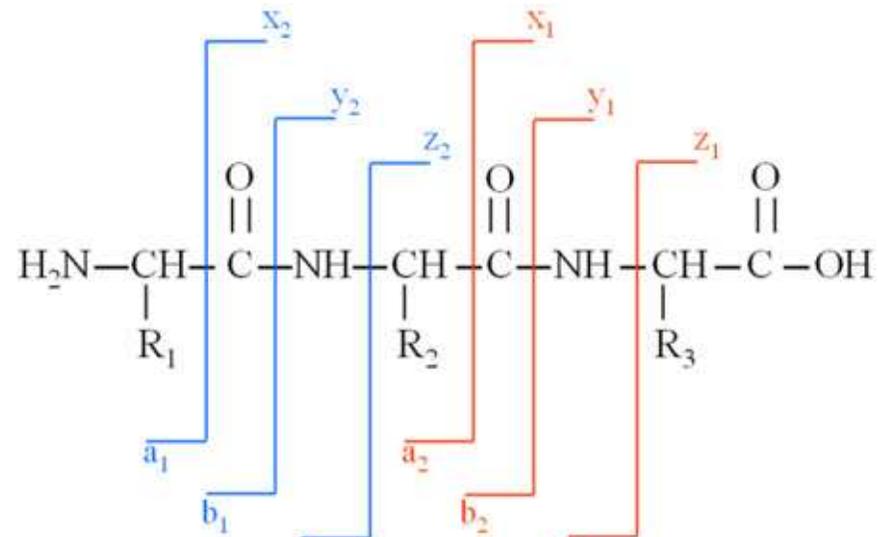
La dissociation de l'ion se réalisera lorsque son énergie interne sera devenue supérieure à l'énergie d'activation nécessaire à la **fragmentation**.

L'analyse de la masse des fragments obtenus renseigne sur la **structure** de la molécule analysée.

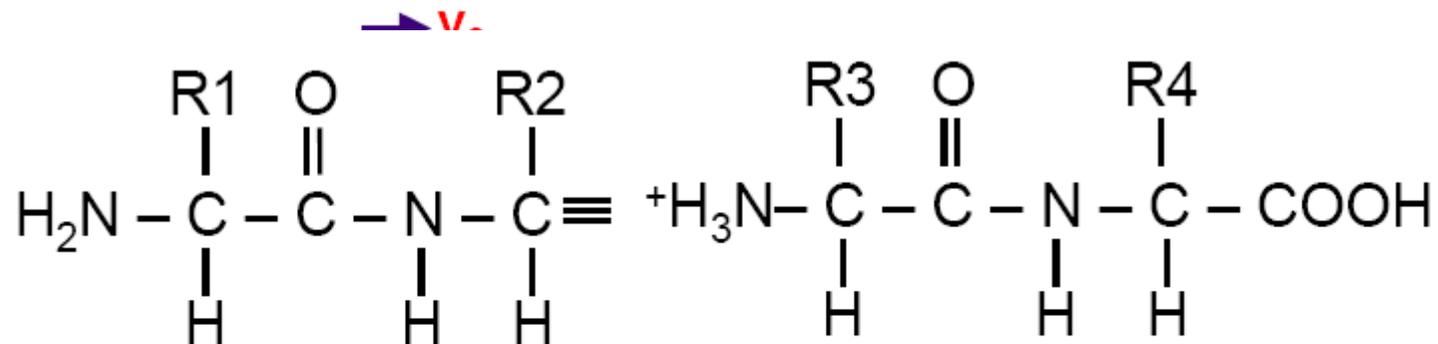


Par exemple, dans les alcanes linéaires, la fragmentation se manifeste par la perte d'un méthyle ce qui donne des fragments de $m/z = (\text{masse} - 15)$.

fragmentation MS-MS sur une protéine



Nomenclature des fragmentations peptidiques

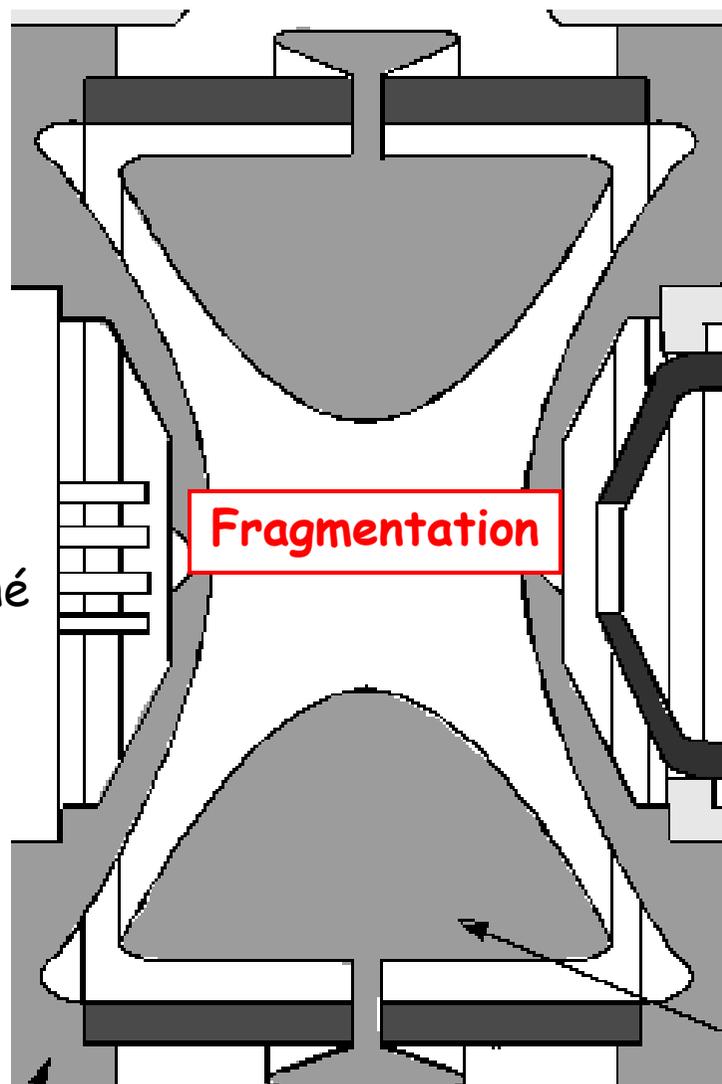


b_2

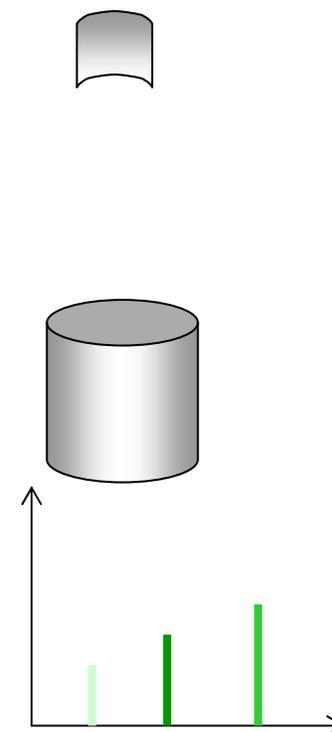
y_2

La fragmentation dans une Trappe à ions

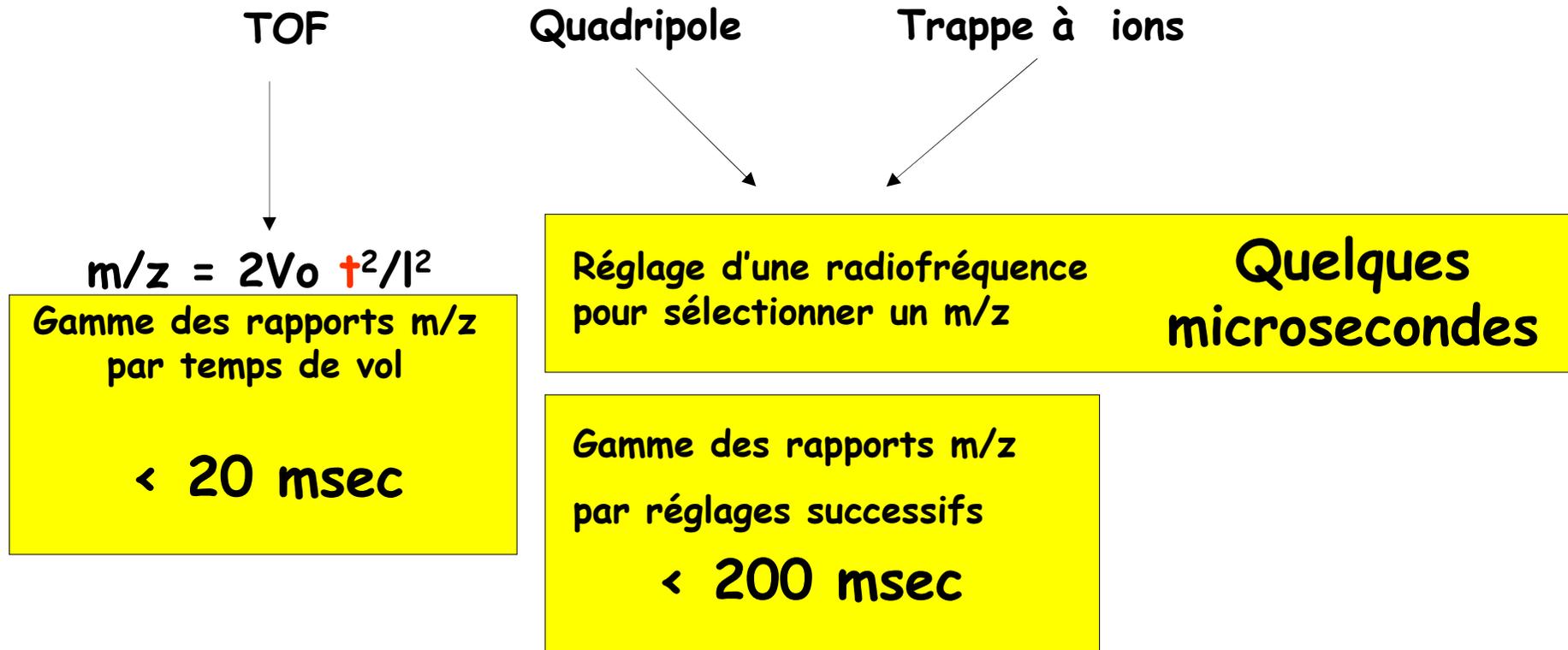
Collision avec He et irradiation à faible amplitude à la fréquence propre de l'ion sélectionné



Spectre MS/MS

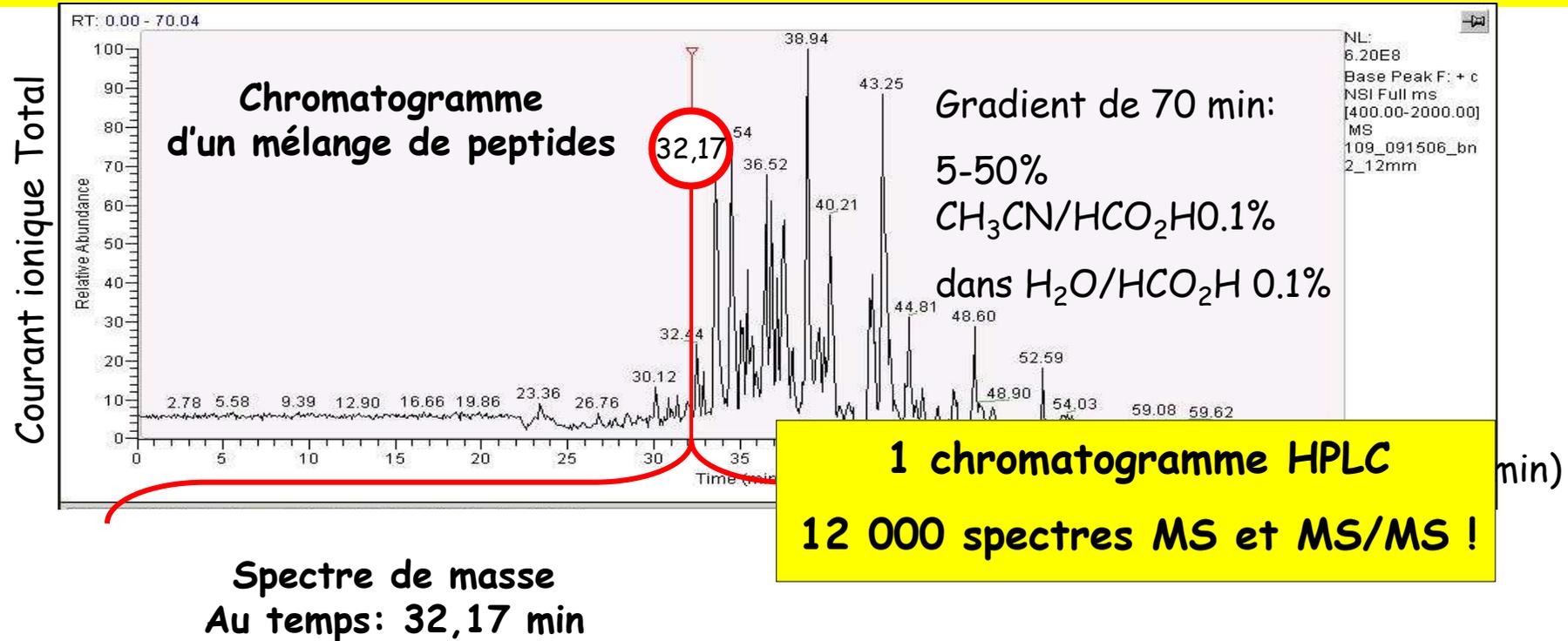


Temps d'acquisition en spectrométrie de masse

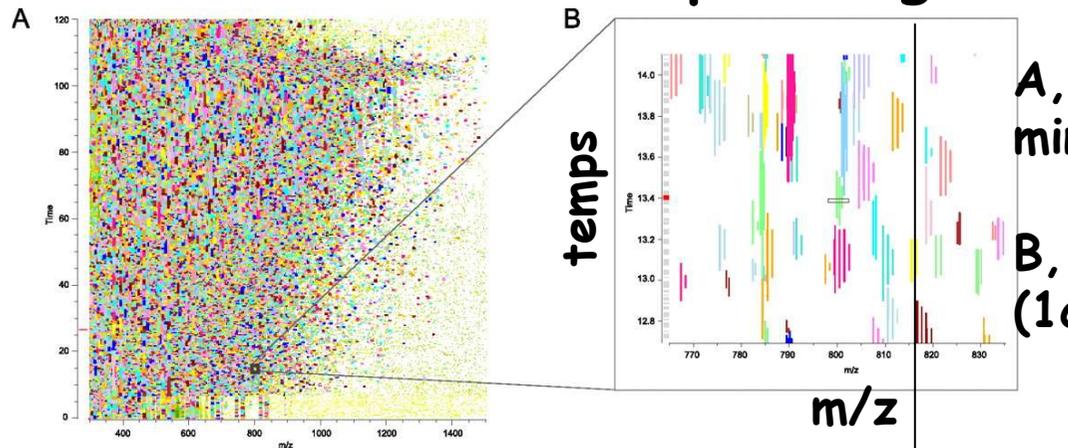


1.5. Couplage Chromatographie - Spectromètre de masse

rapidité d'acquisition des spectres : gamme de masses m/z balayée en 200msec
compatibilité avec la chromatographie liquide (h)



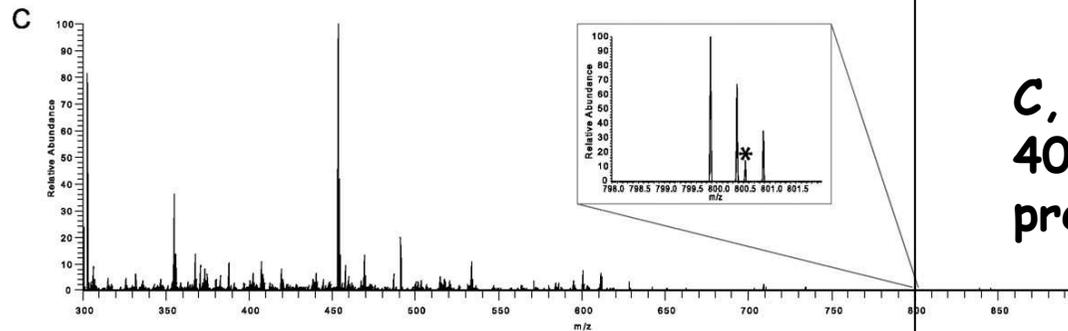
Mélange complexe de peptides issus d'un lysat HeLa après digestion trypsique



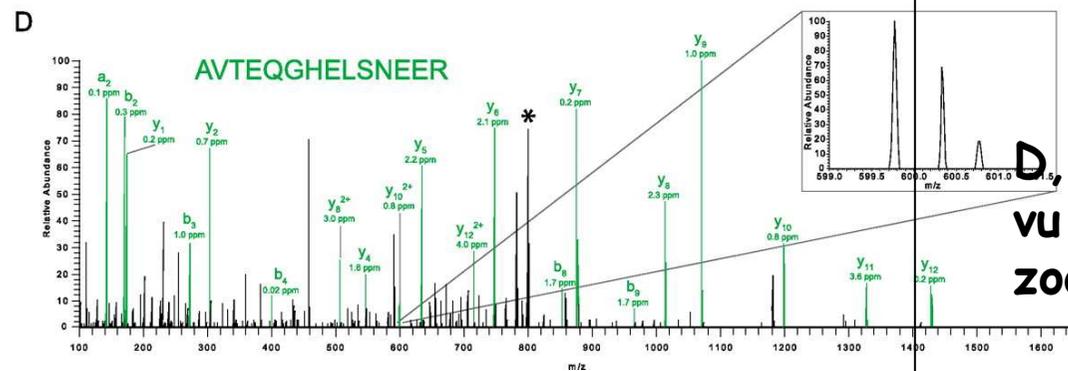
A, « Heat map » 1 run LC MS/MS 90 min sur Q Exactive (2011).

B, Zoom scans MS et MS/MS (1 cycle = 1MS + 10 MS/MS = 1s).

40 000 spectres !



C, Spectre MS de R=50,000 (à m/z 400) et massif isotopique d'un ion précurseur 3+.



D, Spectre MS/MS de l'ion précurseur vu en C, de R=12,500 (à m/z 400) et zoom sur un ion fragment 2+.

Résumé des caractéristiques de la spectrométrie de masse

- très sensible : qq attomoles sont détectées
- haute résolution permet de distinguer les isotopes naturels d'un élément
- analyse rapide (qq msec) et compatible avec des mélanges séparés par chromatographie liquide en ligne
- génère de nombreuses données : spectres MS, MS/MS qui renseignent sur la structure de biomolécules
- compatible avec l'étude de mélanges hautement complexes comme un protéome entier.

Chapitre II : Applications de la spectrométrie de masse à l'étude des peptides, des protéines et des protéomes

Chapitre II: Applications aux peptides, aux protéines et au protéome**2.1. Caractérisation physico-chimique par la masse globale**

- 2.1.1. contrôle de l'intégrité de protéine**
- 2.1.2. interactions protéine-ligand**
- 2.1.3. modifications post-traductionnelles**
- 2.1.4. interactions protéine-protéine:
oligomérisation /stoechiométrie**

2.2. Identification de protéines : Protéomique Descriptive

- 2.2.1. quelques définitions**
- 2.2.2. principe et ex de «peptide mass fingerprint »**
- 2.2.3. exploitation de la fragmentation MS/MS**
- 2.2.4. de la protéine au Protéome**

2.3. Quantification de protéines : Protéomique Quantitative

- 2.3.1. quantification relative après marquage**
- 2.3.2. quantification absolue**
- 2.3.3. quantification « label free »**

2.1. Caractérisation physico-chimique par la masse globale

2.1.1. contrôle de l'intégrité d'une protéine

TorA (95 kDa) est une protéine périplasmique d'*Escherichia coli*.
TorD (22 kDa) est la chaperone stricte de TorA.

Les 39 acides-aminés N-terminaux de TorA constituent une séquence signal indispensable à la translocation de TorA vers le périplasme.

On mesure la masse de TorA produite par deux souches de bactéries *E. Coli*

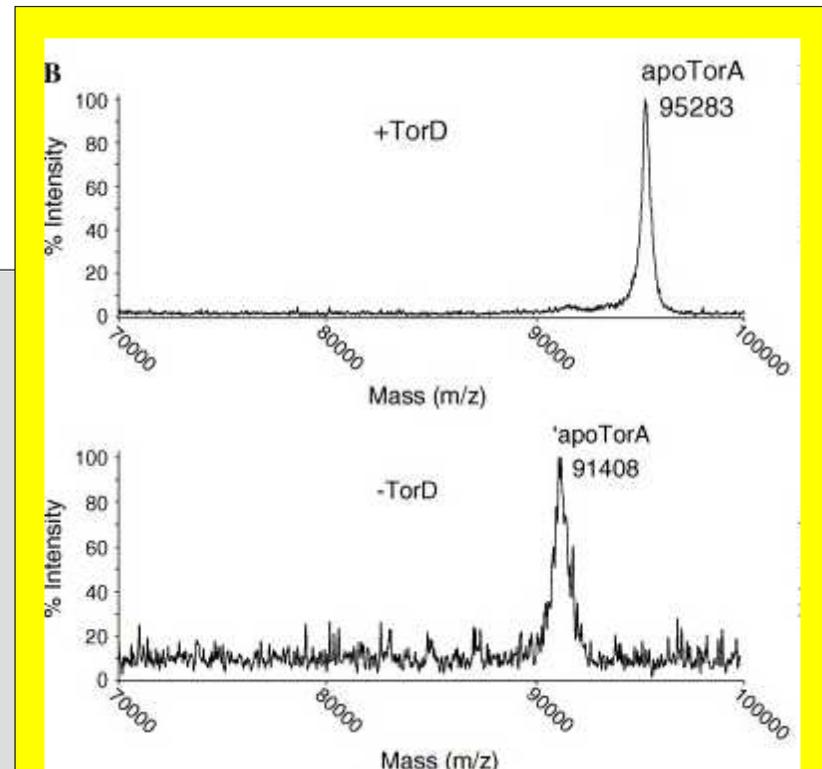


TorD ⁺



TorD ⁻

Extraction de protéines
Spectrométrie de masse MALDI-TOF



En l'absence de sa protéine chaperone,
TorA subit une dégradation
Perte de 2875 Da
(par séquençage d'Edman :
-35 AA N-terminaux)

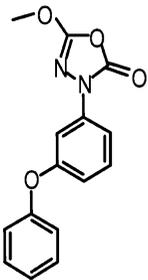
2.1. Caractérisation physico-chimique par la masse globale

2.1.2. interactions protéine-ligand

AFEST

Carboxylester hydrolase
de l'archéobactérie hyperthermophile
Archaeoglobus fulgidus

Le composé 7600 est un puissant inhibiteur de
plusieurs sérine carboxylester hydrolases.



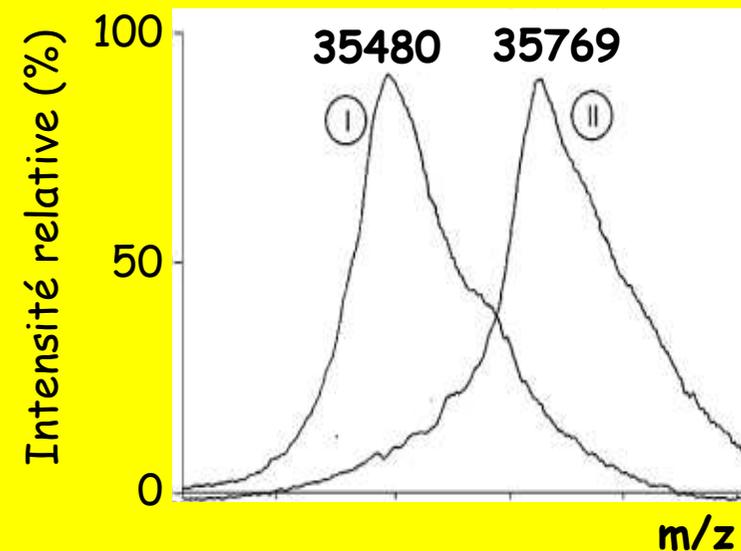
Composé 7600

Masse moléculaire : 284 Da

Spectre MALDI-TOF

AFEST

- Ⓘ Enzyme seule
- Ⓜ Enzyme + composé 7600



$$\Delta m = 289$$

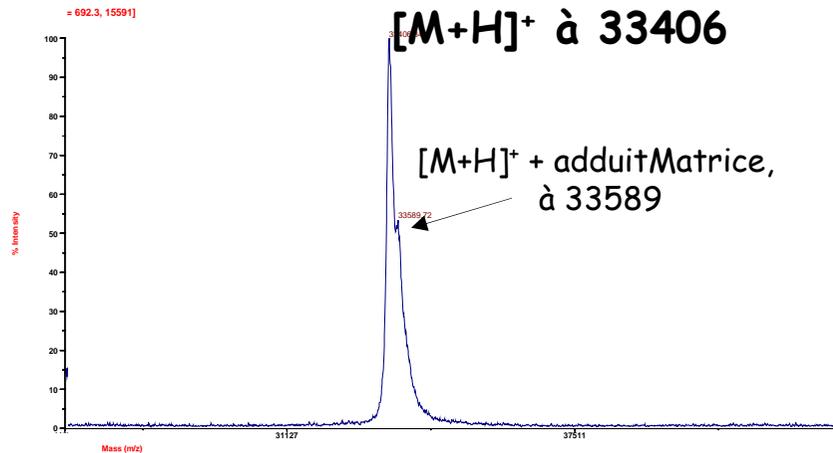
2.1. Caractérisation physico-chimique par la masse globale

2.1.3. Modifications post-traductionnelles

N-Glycosylation

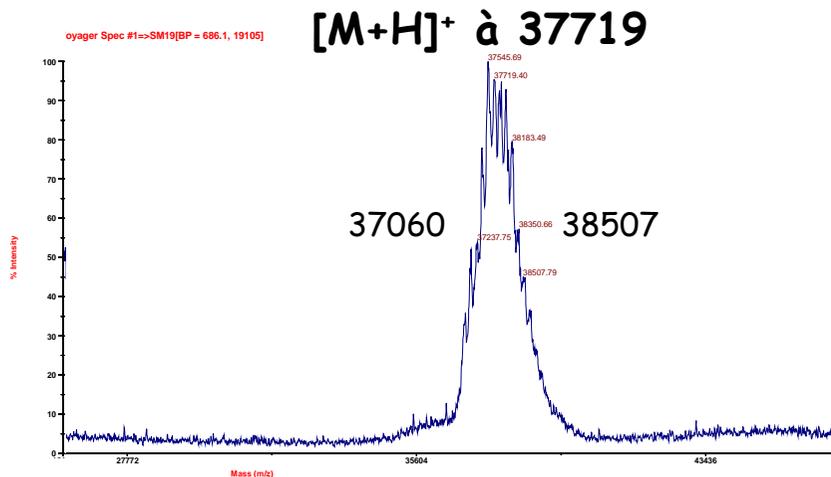
Isoformes glycosylées d'une protéine
produite chez *Pichia Pastoris*

MALDI-ToF



Protéine mutée sur les
2 Asn par 2 Gln

~~Glycosylation~~



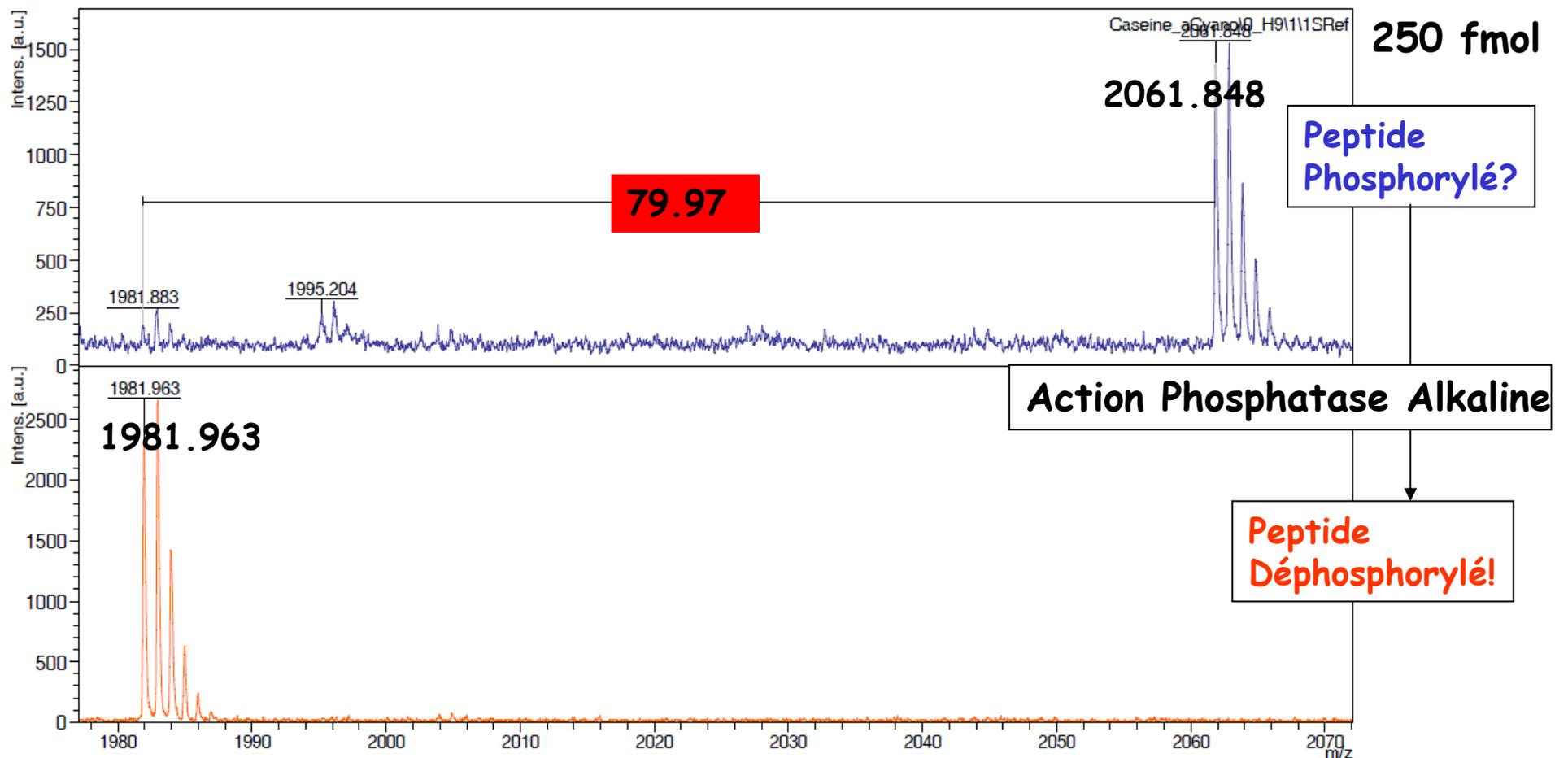
Protéine non mutée

Glycosylation

+4500Da
sucres

Phosphorylation

Mise en évidence d'une phosphorylation
sur la beta-caséine,
par MALDI-ToF



2.1.3. 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.

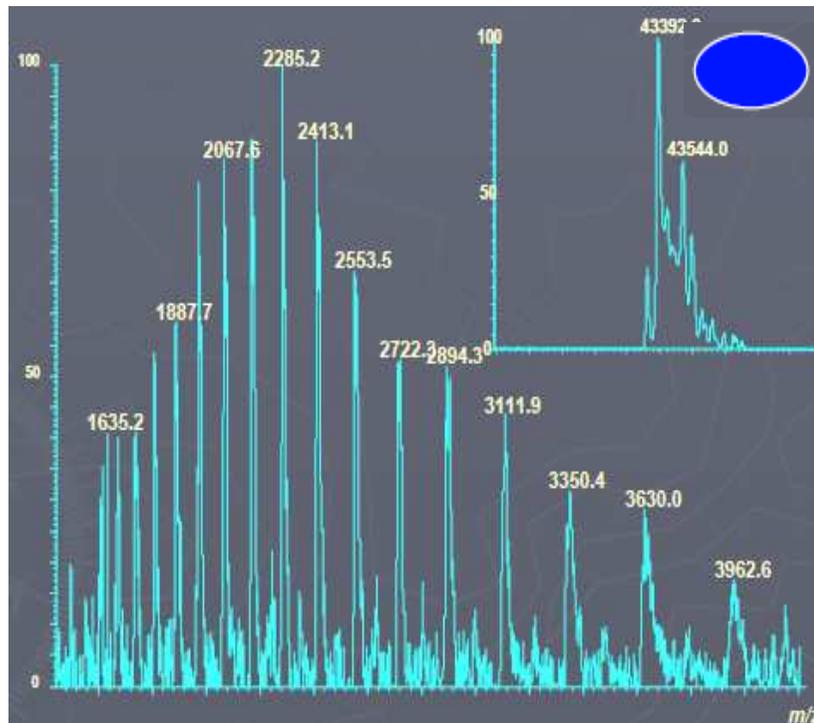
Sera d'autant plus notable sur des peptides où les m/z sont bien résolus.

2.1. Caractérisation physico-chimique par la masse globale

2.1.3. interactions protéine-protéine

Spectres ESI de la Ribonucléotide réductase *E. coli*

en conditions dénaturantes
(H₂O/MeOH/AcAcétique) :



Monomère inactif

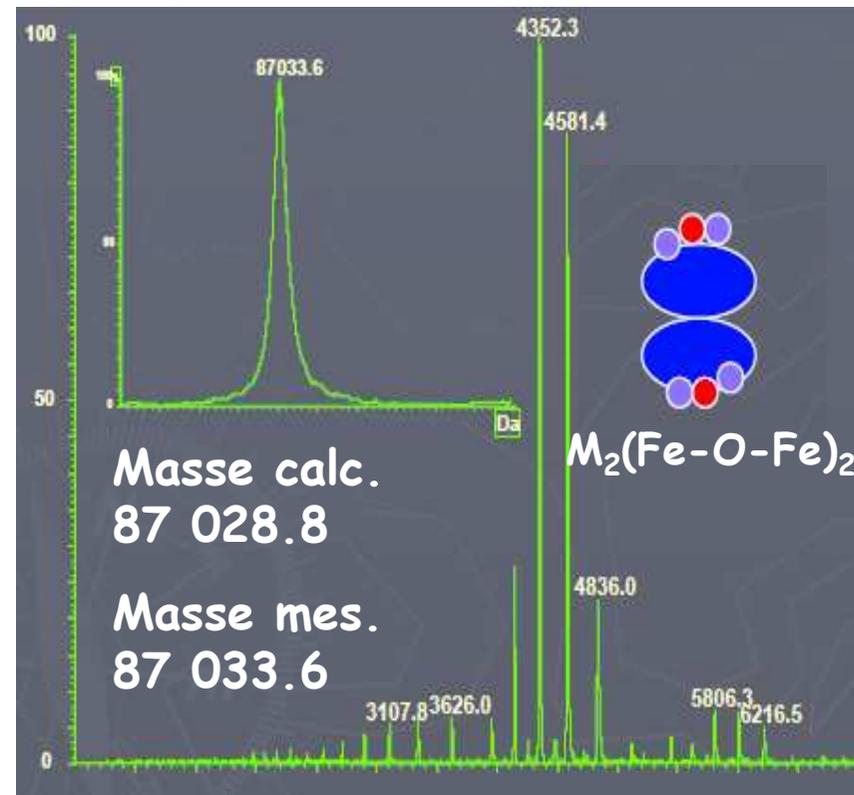
Masse calc.

43 386

Masse mes.

43 392

en conditions non dénaturantes
(tampon bicarbonate d'ammonium) :

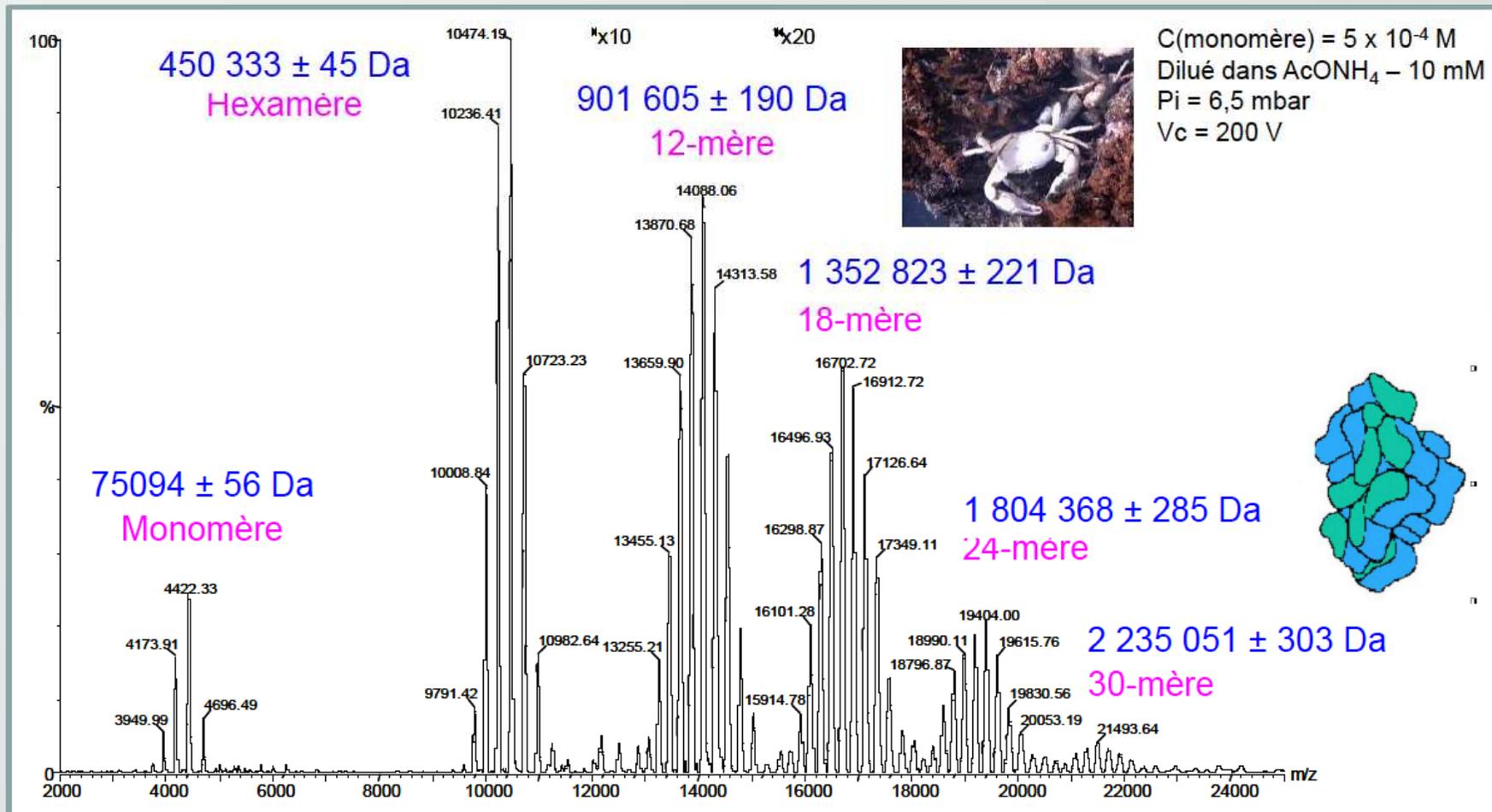


Dimère actif avec cluster « Fe-O-Fe » non covalent sur chaque monomère

Y a-t-il une limite en masse ?

Exemple des hémocyanines de crabe

→ MM allant jusqu'à 2 235 kDa pour le 30-mère !!!



2.2. Identification de protéines : Protéomique Descriptive

2.2.1. quelques définitions

Protéome : ensemble des protéines exprimées par le génome ou par un type cellulaire ou une cellule (Wilkins, 1996)

Protéomique descriptive : identification et caractérisation des protéines d'une cellule dans un environnement donné

L'analyse « rapide » et à grande échelle des protéomes est devenue possible grâce à:

- * la connaissance des Génomes et donc des cadres ouverts de lectures (ORF)
 - * méthodes de séparation des protéines
 - * la spectrométrie de masse
 - * la Bioinformatique

2.2. Identification de protéines : Protéomique Descriptive

2.2.2. Principe du «peptide mass fingerprint »

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

Bien qu'il existe des méthodes physicochimiques de séquençage de protéines, ces méthodes sont peu sensibles et limitées (N-term bloqué, AA modifié...).

En revanche, il est plus facile de séquencer des acides nucléiques et d'en déduire la séquence en acides aminés des protéines encodées (ORF).

On dispose à l'heure actuelle de banques de séquences (databases) regroupant les séquences de plusieurs millions protéines de différentes espèces.

Expérimentation

Mesures de masses
d'une protéine à identifier

Banques de séquences

Calculs « *in silico* »

Comparaison

2.2. Identification de protéines : Protéomique Descriptive

2.2.2. Principe du «peptide mass fingerprint »

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

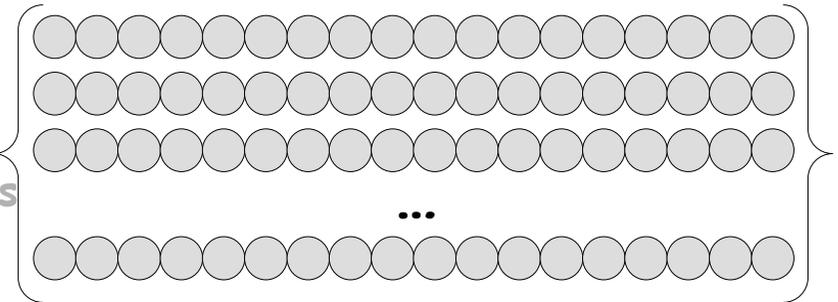
Calculs « *in silico* »

Comparaison



m/z

m/z
différents

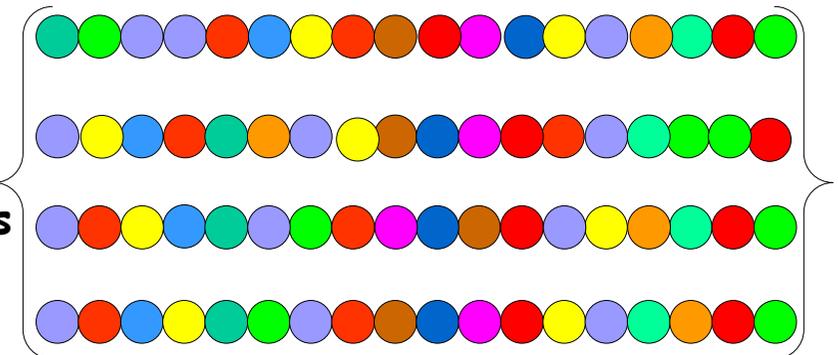


Résultat : masses identiques mais
séquences différentes :

m/z de protéine peu précis

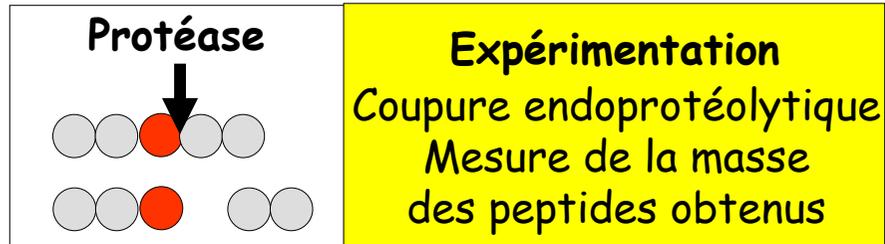
Identification de protéine impossible

m/z
identiques



2.2. Identification de protéines : Protéomique Descriptive

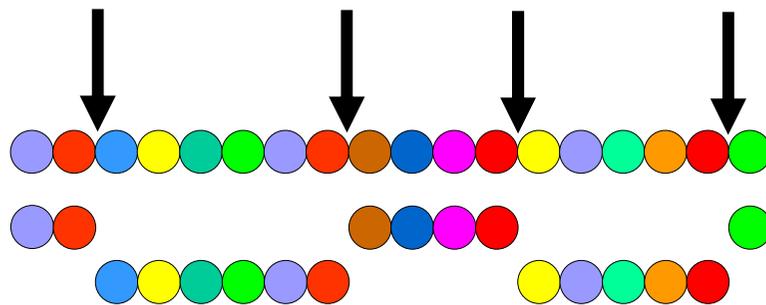
2.2.2. Principe du «peptide mass fingerprint »



Banques de données

Calculs « *in silico* »

Comparaison



Plusieurs m/z

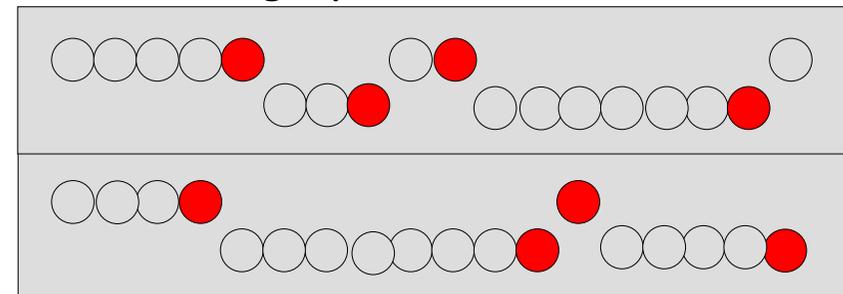
« **Fingerprint = empreinte** »

Résultat : peptides : m/z précis

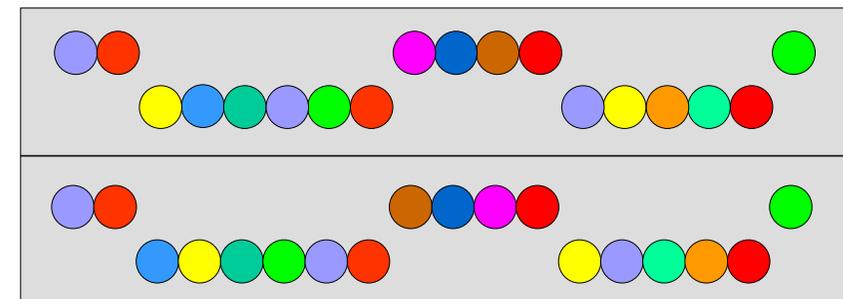
empreinte de clivage
spécifique

Identification de la Protéine fiable

« **Fingerprint** » différents



« **Fingerprint** » identiques



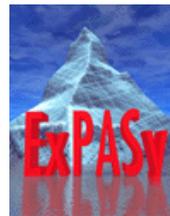
2.2. Identification de protéines : Protéomique Descriptive

2.2.2. Principe du «peptide mass fingerprint »

Basée sur «peptide mass fingerprint »

881.222849
943.514963
1068.5416
1116.57621
1132.58301
1212.7018
1244.65546
1322.70695
1340.71526
1355.71383
1357.72379
1384.74483
1395.7146
1402.74508
1516.82758
1544.81102
1583.82601
1632.80477
1638.75448
1654.8601
1660.72389
1671.84132
1765.71535
1801.90896
1814.97855
1828.95938
1842.99485
1872.97703
1942.01866
1999.04159
2030.06445
2102.09055
2131.14332
2208.05736
2236.06617
2391.09731
2675.38176
2692.26245
2757.36469
2870.37948
3062.43458

Compare
± Tolérance de Masse



MATRIX
SCIENCE

Moteurs informatiques de recherche :
Algorithmes de calculs de scores basés
sur des probabilités

641.376731				641.376731	
842.5	641.376731			641.376731	151
901.4	842.	641.376731		641.376731	151
930.	901.	842.5	641.376731	546151	951
945.5	930.	901.4	842.546151	467951	2676
1008.	945.	930.	901.467951	52676	104
1215.	1008.	945.5	930.52676	509104	3078
1282.	1215.	1008.	945.509104	53078	101
1316.	1282.	1215.	1008.53078	63101	1242
1349.	1316.	1282.	1215.63101	64242	316
1366.	1349.	1316.	1282.64242	68316	305
1410.	1366.	1349.	1316.68316	84305	1962
1538.	1410.	1366.	1349.84305	64962	1917
1635.	1538.	1410.	1366.64962	74917	737
1643.	1635.	1538.	1410.74917	79737	584
1685.	1643.	1635.	1538.79737	73584	992
1807.	1685.	1643.	1635.73584	77992	188
1870.	1807.	1685.	1643.77992	71188	137
2246.	1870.	1807.	1685.71188	80137	978
2374.	2246.	1870.	1807.80137	81978	553
2470.	2374.	2246.	1870.81978	03553	711
2889	2470.	2374.	2246.03553	16711	424
3312.	2889	2470.	2374.16711	15424	535
	3312.	2889	2470.15424	9.3535	829
				2889.3535	33829
				3312.33829	

Masses Expérimentales

Masses Théoriques

2.2. Identification de protéines : Protéomique Descriptive

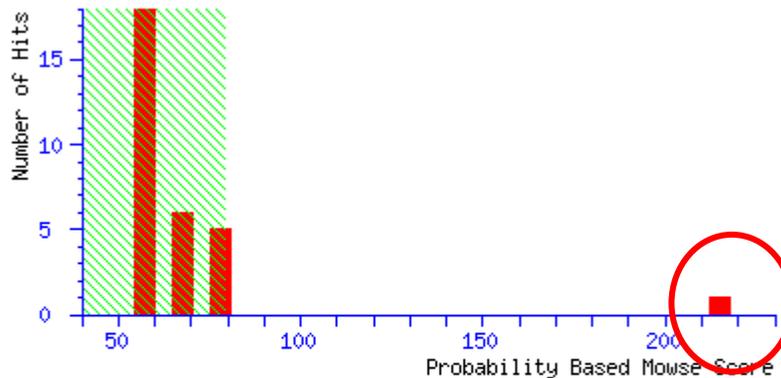
2.2.2. Exemple de «peptide mass fingerprint »

Exemple : Protéine adhésive CupB5 de *Pseudomonas aeruginosa*

Probability Based Mowse Score

«peptide mass fingerprint »

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 79 are significant ($p < 0.05$).



Probabilité très faible que cette identification soit due uniquement au hasard (10^{-15})

Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)

Significance threshold $p <$ Max. number of hits

Nombre de peptides identifiés

1. [gi|15599277](#) **Mass:** 100544 **Score:** 215 **Expect:** $1.3e-15$ **Queries matched:** 24
adhesive protein CupB5 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]

2.2. Identification de protéines Protéomique Descriptive

2.2.2. Exemple de «peptide mass fingerprint »

Exemple : Protéine adhésive CupB5 de *Pseudomonas aeruginosa*
avec **24 peptides identifiés** expérimentalement :
29% de couverture de la séquence théorique

Sequence Coverage: 29%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

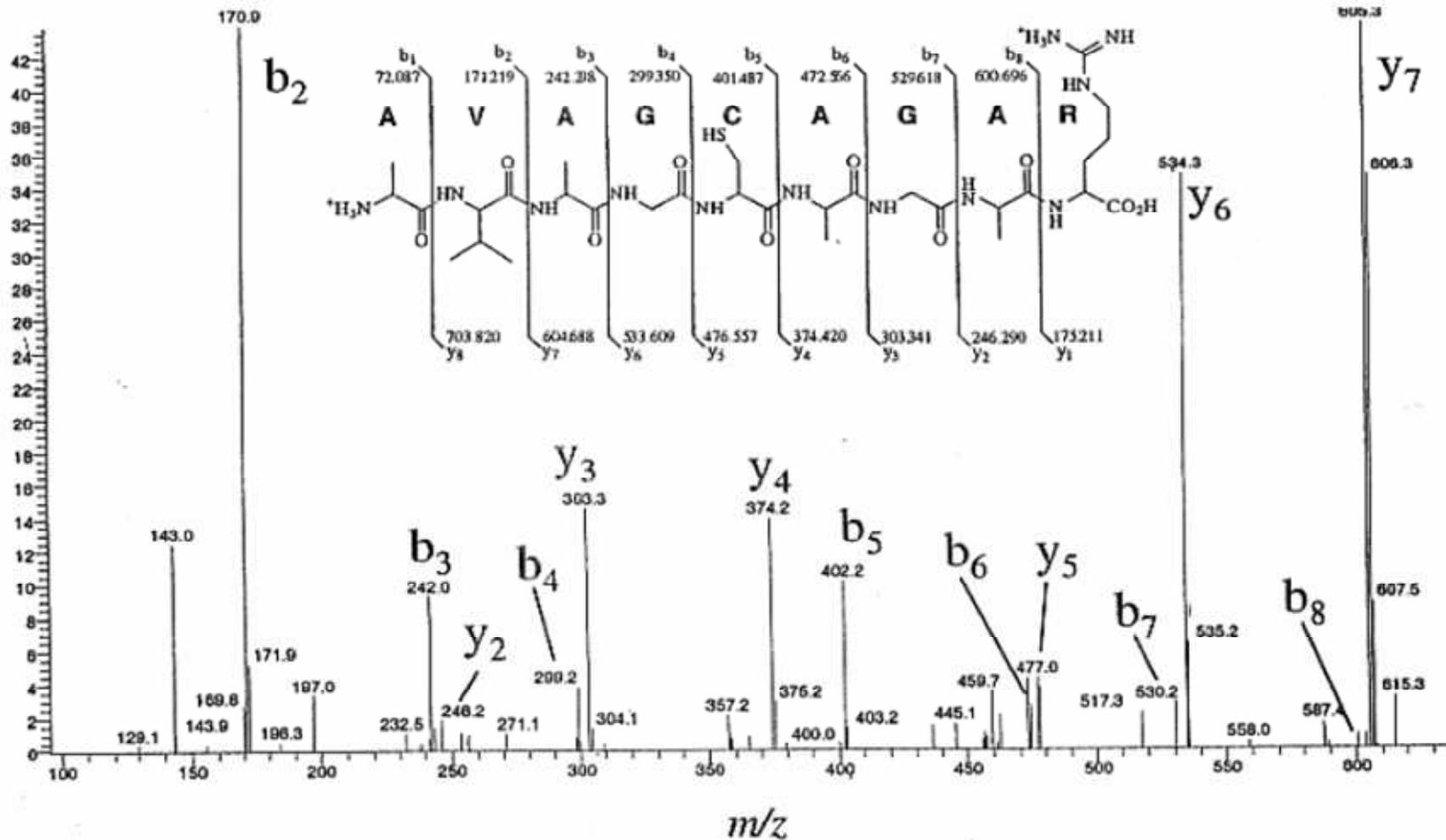
1 MNKCYALVWN VSQGCWNVVS EGSRRRGKPA GAKAAIASVL ALLGATALAP
51 AYALPSGGTV VGGSSANGEIH LSGGNSLSVN QKVDKLIANW DSFSVAAGER
101 VIFNQPSSSS IALNRVIGTK ASDIQGRIDA NGQVFLVNPV GVLFGRGAQV
151 NVGGLVASTL DITDAEFNGH SSRYRFTGPS TNGVLNHGGA ITAAEGGSIA
201 LLGAQVDNRG TVLAQMGGVG LGAGSDLTLN FDGNKLLDIR VDAGVANALA
251 SNGGLLKADG GRVLMAARTA NALLNTVVNS QGAIEARSLR GKNGRIVLDG
301 GPDGKVMVGG ALSANALNGP GHGGTVEVRG QAVEVALGTQ VNTLASNGLN
351 GTWKIAADKI DVRPSAVSDG VTVHADTLR NLASTNIELV STKGDLDLDG
401 SVNWASGNRL GLGSAADLTL NGRLNASGAK AGLELKAEGA IDINDKIVLG
451 GAGSALAMDA GEGHRVNGTA SVSLAGANAT YVSGGYYYTV VQNLAQLQAI
501 NKNLDGLYVL GGNILGGSYY CTALQSIGGP AGVFSGTLDG LGNSIGNLSI
551 SNTGPNVGLF ARSSGTLSNL KLNNLRVSDN TYGSGPSSLG ALVGINSGRI
601 ANVSASGVSV VGSRLRSNAL GGLVGRNISG QIANASVSGG VTGYAASTAV
651 GGLVGENFTT AWGPEAVIEN AHSNVHVAQA STERNSLGGV GGLVGLNAKG
701 MIRASGSQK VETYRPGLNV GGLVGYNMFV HVSDSSASGQ VEAGGAGNTG
751 GLVGLSSGGE IFRSQASGSV YSKGGLATGG LIGKAEGNGM LGNLKASGSV
801 TDQGGADLGG LVGNNSQSAI ETAEATGKVS GGSNSRVGGI IGHNLGGSVA
851 HAISRGDVSG GFNSLVGGLV GHNGGELVNV DASGRVSAAA SASVGGLVGS
901 NAGSILSARS SSTVNGSGRS RIGGLVGENQ IQGRIVSSMS EGTVSGDYV
951 SMGGLAGLNL GSIEYSGVSG KIDFKPQSHY GQIYGAQVGE NHGVLGGNYV
1001 IGEAALLPPA GIDYGNIV

```

2.2. Identification de protéines : Protéomique Descriptive

2.2.3. Exploitation de la fragmentation MS-MS

La MS/MS donne une information structurale



renseigne sur l'enchaînement séquentiel d'acides aminés

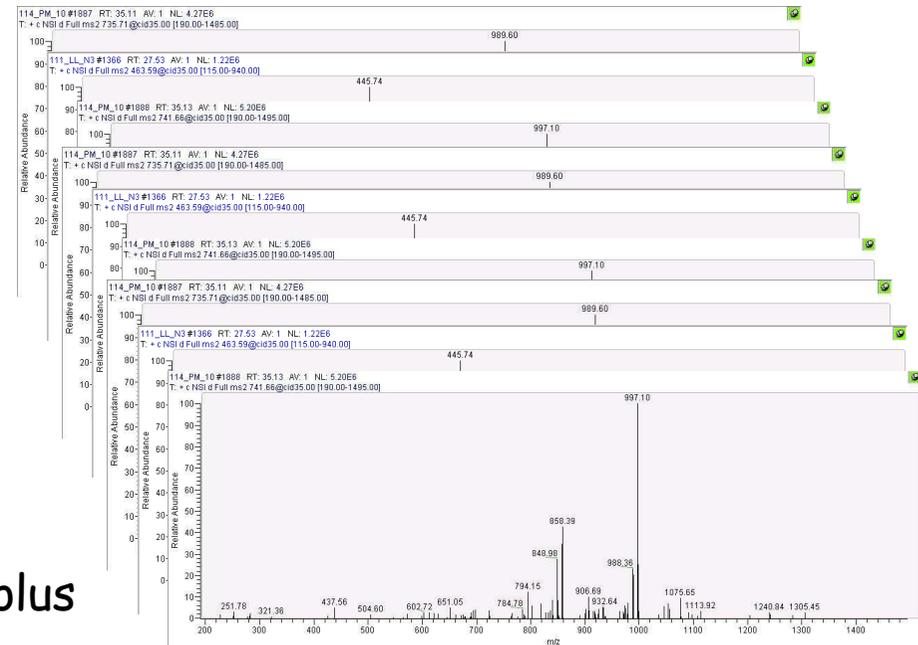
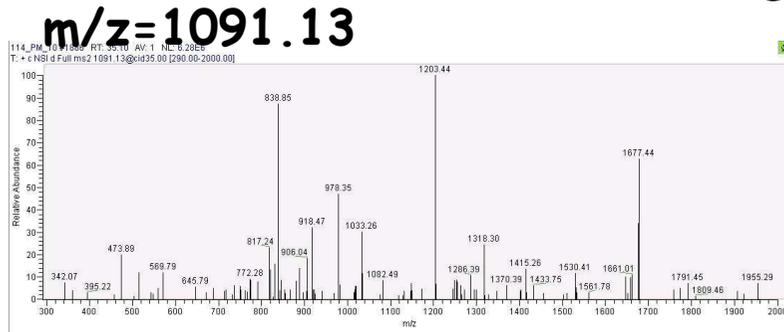
Expérimentation

Mesures de MS et MS/MS
de peptides
Pour identifier une protéine

Banques de données

Calculs « *in silico* »

Comparaison



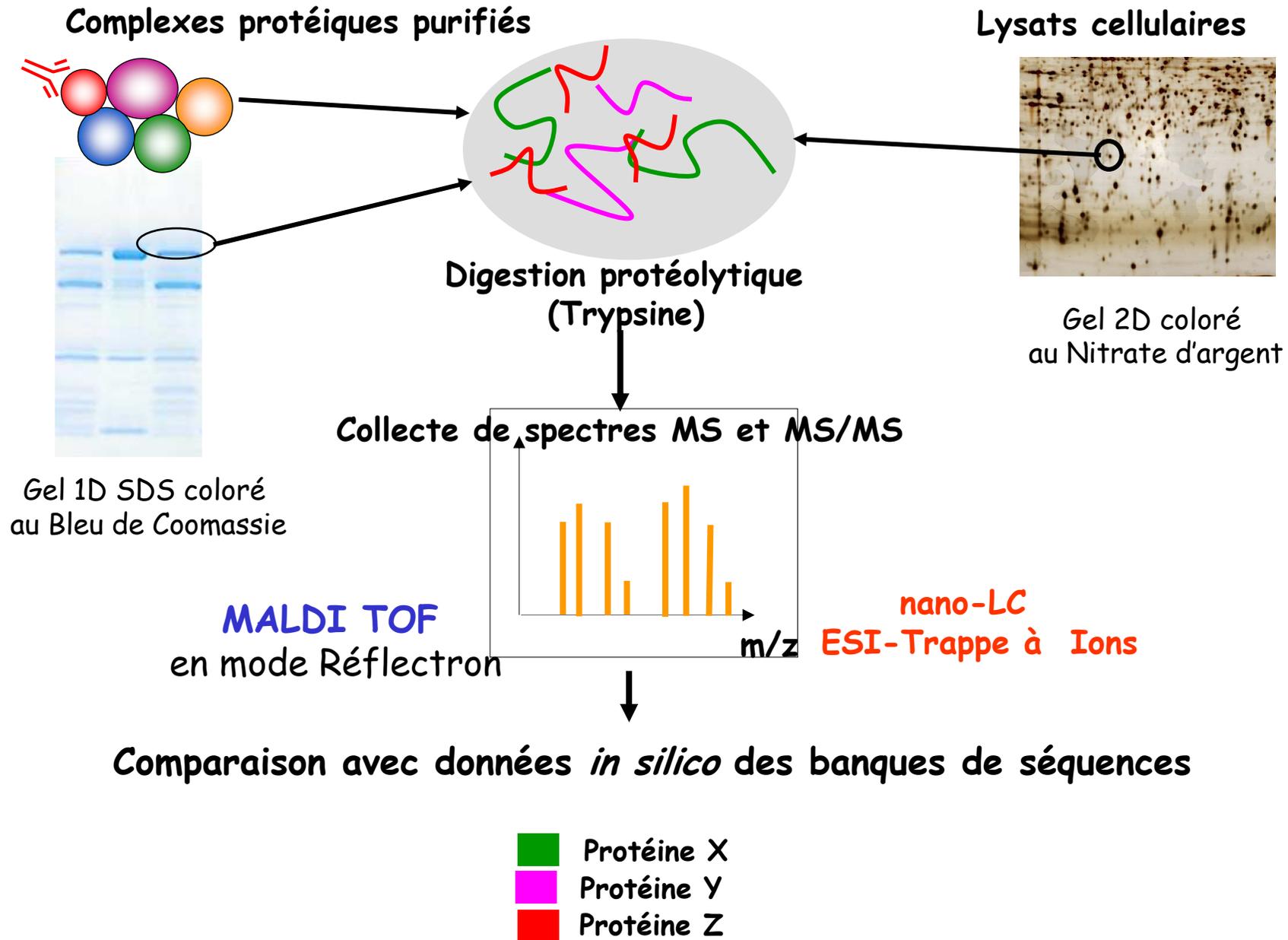
1 Masse Expérimentale MS 1 Spectre Expérimental MS/MS

1. Choix dans la banque des 500 m/z les plus proches du m/z expérimental (MS)
2. Comparaison des 500 spectres MS/MS théoriques associés au spectre expérimental
3. Classe 10 spectres MS/MS en fonction de leur score
4. Classe les peptides par protéine

Masse Théorique MS
Spectres Théoriques MS/MS

2.2. Identification de protéines : Protéomique Descriptive

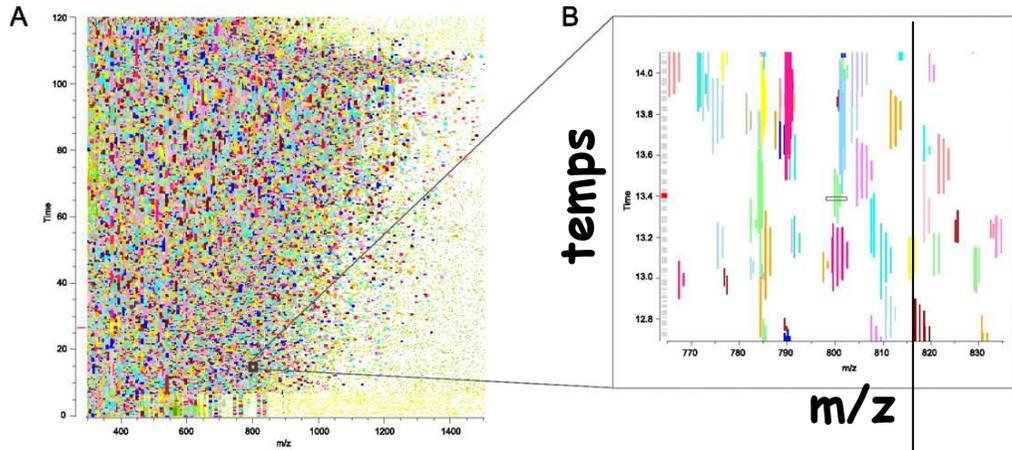
2.2.4. de la protéine au protéome



Identification des constituants d'un complexe protéique chez une bactérie extrémophile par spectrométries de masse MALDI-TOF et ESI-IT

Protéines identifiées	gène	N° d'accession	% de recouvrement	Peptides pour l'identification	Poids moléculaire théorique kDa
Cyc2	<i>cyc2</i>	3282057	12 - 19	5-6	49,7
CoxA (sub-unit I aa ₃ cytochrome oxydase)	<i>coxA</i>	3282061	9	3	69,1
CoxB (sub-unit II aa ₃ cytochrome oxydase)	<i>coxB</i>	3282060	32 - 40	5 - 7	28,4
CoxD (sub-unit IV aa ₃ cytochrome oxydase)	<i>coxD</i>	24475576	14	1	7,2
ORF1	<i>orf1</i>	15209320	21 - 45	4 - 6	16,7
Rusticyanine	<i>rus</i>	3282064	13	2	16,5
Cytochrome CYC 41	<i>cyc1</i>	3282058	14 - 8	4 - 2	20
Cytochrome CYC 42	<i>cycA</i>	14251201	29 - 9	6 - 2	23,7
Cytochrome c₁	<i>petC</i>	8547221	32 - 12	9 - 2	25,2
Cytochrome b	<i>petB</i>	8547220	11	4	45,5
Rieske	<i>petA1</i>	15028607	8	2	16,7
OmpA-like Outer Membrane Protein	<i>fopA</i>	29467513	19 -15	4 - 2	20,2
Major Outer Membrane Protein 40 Omp40	<i>omp40</i>	4138616	29 - 30	10 - 14	40
CsoS1A	<i>csos1A</i>	4836667	39 - 28	3 - 2	10,2
CsoS1B	<i>csos1B</i>	4836668	58	6	11,5
CsoS1C	<i>csos1C</i>	4836666	39	3	9,9
CydA (sub-unit I bd ubiquinol oxidase)	<i>cydA</i>	57157696	8	3	60,8
CsoS2	<i>csos2</i>	4836662	6	4	78,6
ATP synthase B chain	<i>atpF</i>	728929	45	9	17,9

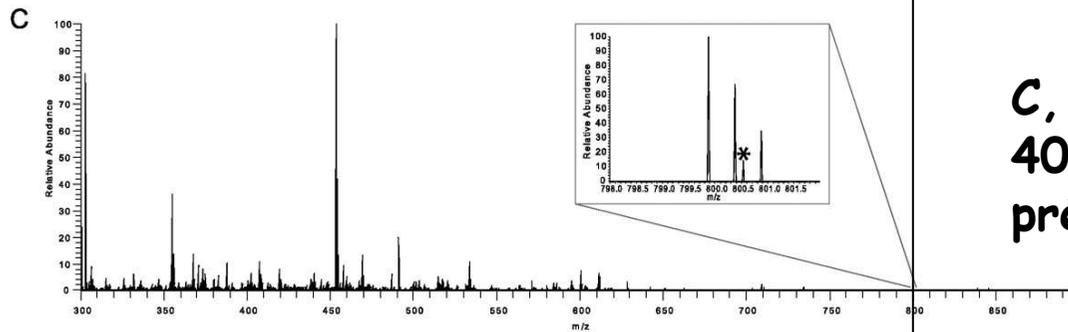
« Shotgun Bottom-Up Proteomics » sur un lysat HeLa



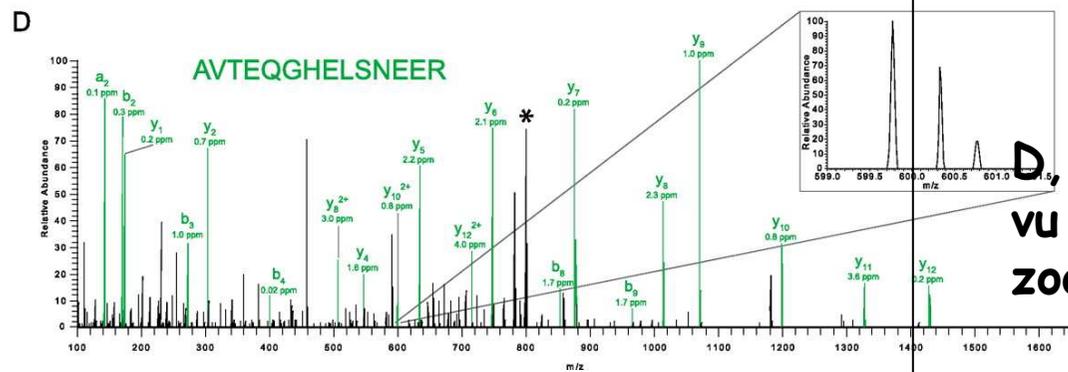
A, « Heat map » 1 run LC MS/MS 90 min sur Q Exactive (2011).

B, Zoom scans MS et MS/MS (1cycle = 1MS + 10 MS/MS = 1s).

40 000 spectres !



C, Spectre MS de R=50,000 (à m/z 400) et massif isotopique d'un ion précurseur 3+.



D, Spectre MS/MS de l'ion précurseur vu en C, de R=12,500 (à m/z 400) et zoom sur un ion fragment 2+.

« Shotgun Bottom-Up Proteomics »
 sur un lysat HeLa : Identification de 2864 protéines

Peptide identification from HeLa lysate triplicate LC-MS analysis
 on a Q Exactive (90 min gradient)

	MS spect.	MSMS spect.	Identif. [%]	Unique peptides	Proteins
HeLa (1)	5427	35203	37.23		12298
	2513				
HeLa (2)	5098	35911	38.35	12830	2601
HeLa (3)	5274	35348	38.23		12560
	2557				
Σ Triplicates			37.94	16255	2864

Michalski A. Mol Cell Proteomics. 2011 September; 10(9): M111.011015.

2.3. Quantification de protéines: Protéomique Quantitative

2.3.1. quantification relative

2.3.2. quantification absolue

2.3.3. quantification « label free »

But: **Comparer** et **Quantifier** des **variations d'expression de protéines** dans des situations biologiques variées : conditions de contrôle vs conditions de stress, pathologiques, avec stimuli chimiques...

Quantification Relative par Spectrométrie de masse après marquage

- marquage métabolique: SILAC
- étiquettes chimiques : ICAT, iTRAQ, ...

Quantification Relative par Electrophorèse 2-DiGE après marquage

Quantification Absolue

marqueur interne ex: Aqua-Peptides, ...

Quantification par Spectrométrie de masse sans marquage : « label free »

2.3. Quantification de protéines : Protéomique Quantitative

2.3.1. quantification relative par Spectrométrie de masse après marquage

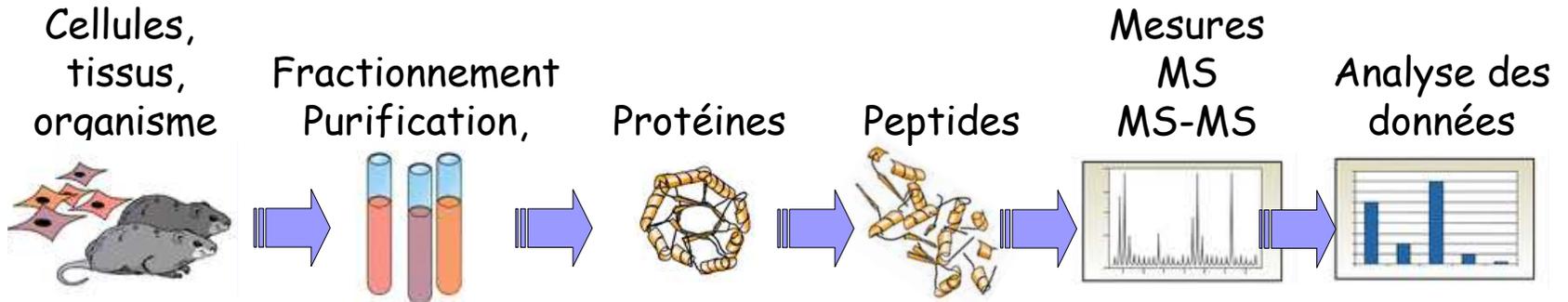
Pour comparer deux situations expérimentales

Introduction d'un marquage des protéines, dans l'une des deux conditions à comparer

Condition 1

Condition 2

Comparaison du protéome

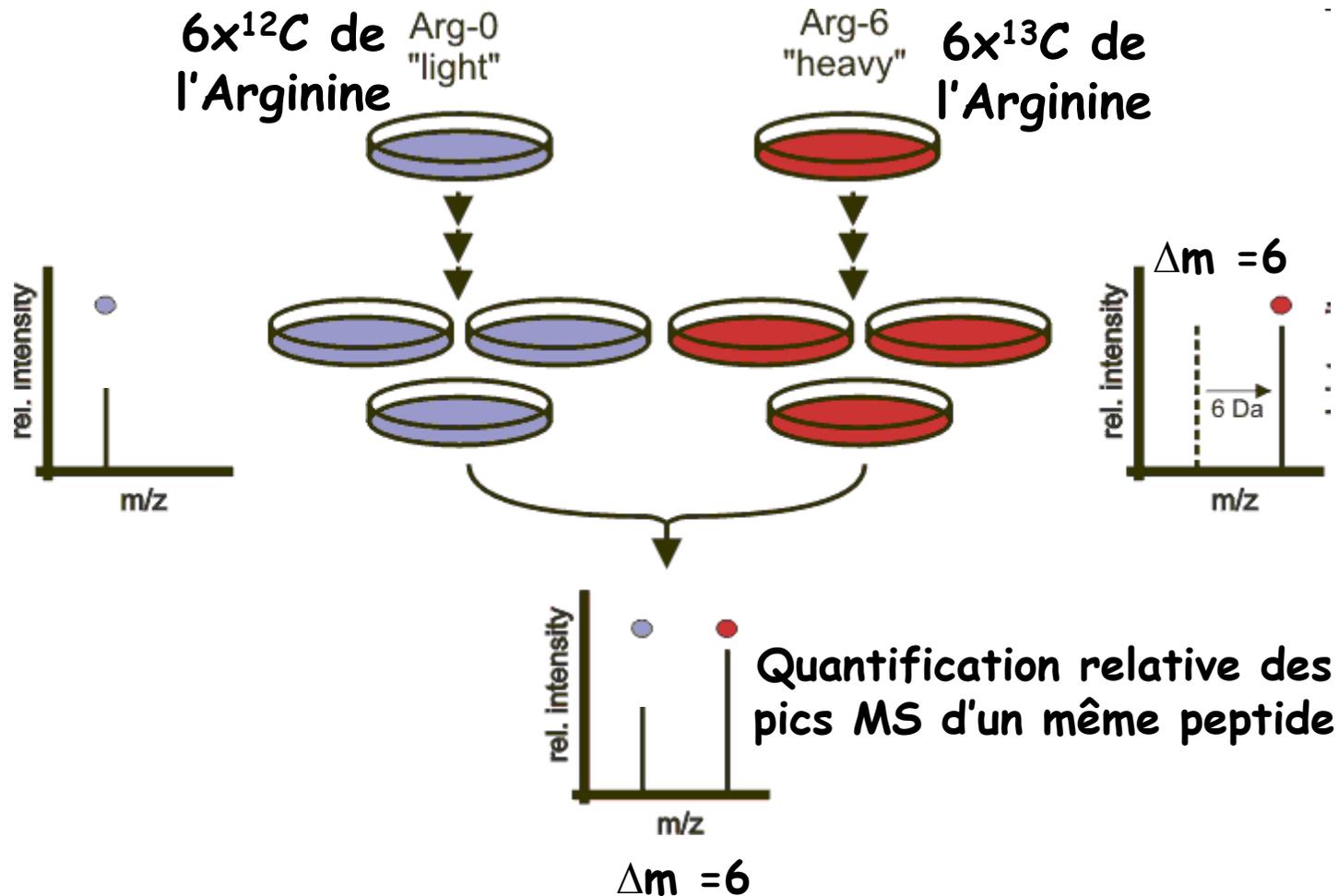


Marquage métabolique	1					
	2	1 et 2				
Marquage chimique	1	1	1		1 et 2	1 et 2
	2	2	2	1 et 2	1 et 2	1 et 2
	1	1	1	1		
	2	2	2	2	1 et 2	1 et 2

2.3. Quantification de protéines : Protéomique Quantitative

2.3.1. quantification relative par Spectrométrie de masse après marquage

*SILAC: Marquage d'acides aminés par incorporation d'isotopes stables lourds (^{13}C ou ^{15}N) en culture de cellules

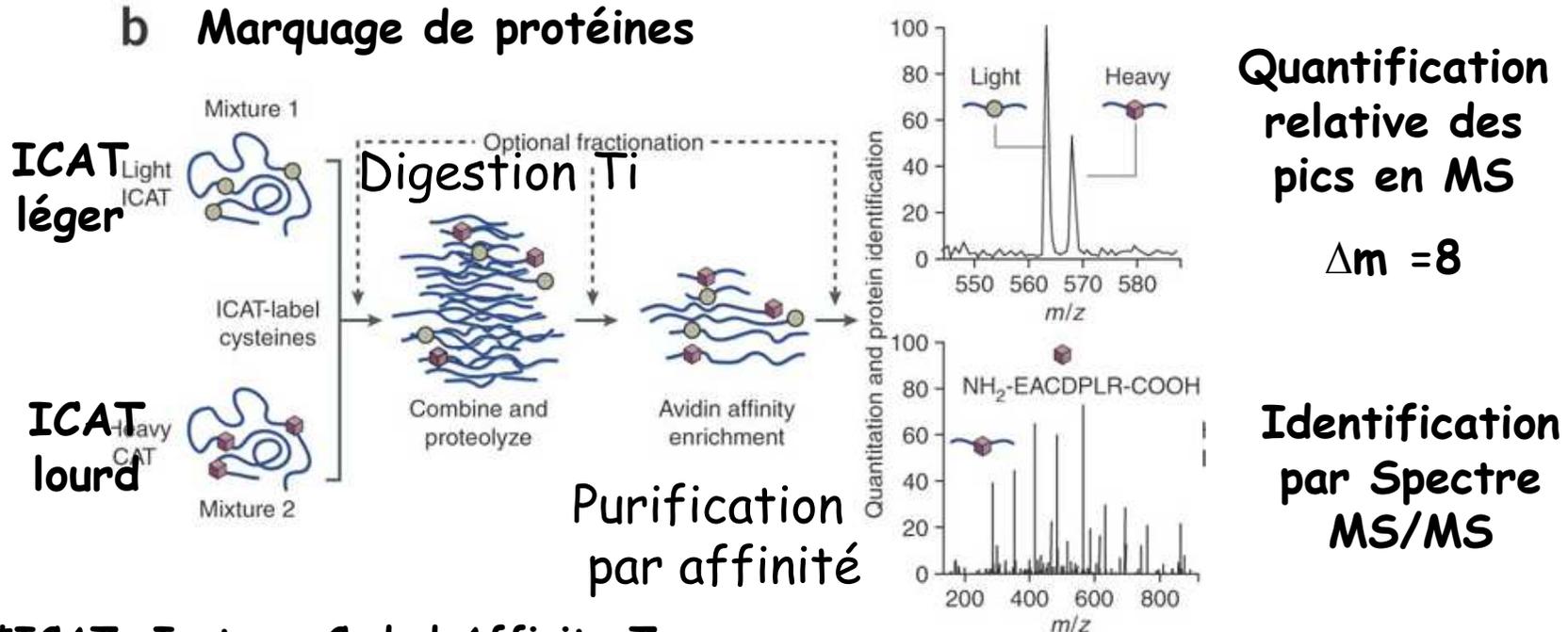
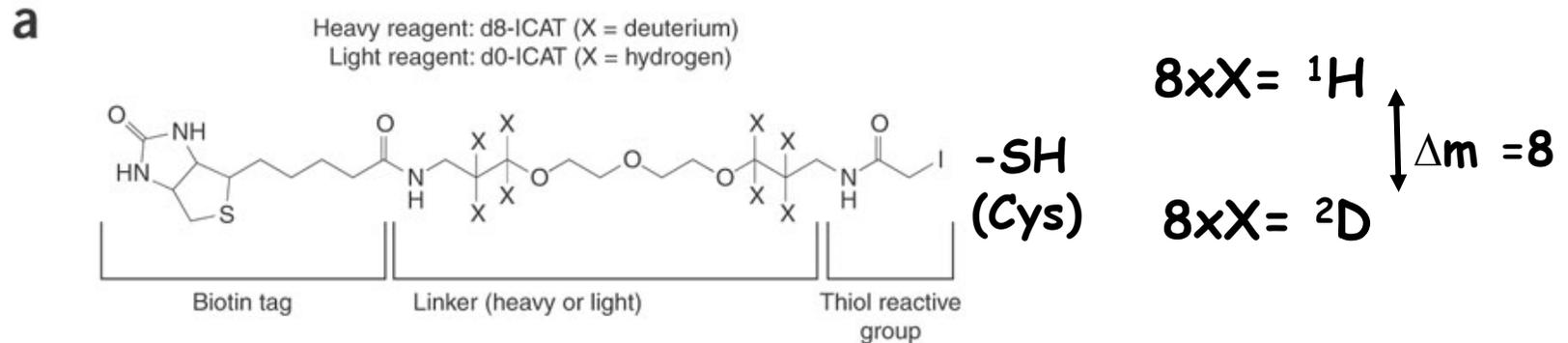


*SILAC: Stable Isotope Labeling by Aminoacids in cell Culture

2.3. Quantification de protéines : Protéomique Quantitative

2.3.1. quantification relative par Spectrométrie de masse après marquage

***ICAT: Etiquettes chimiques d'isotopes stables légers ou lourds greffés sur les Cystéines**

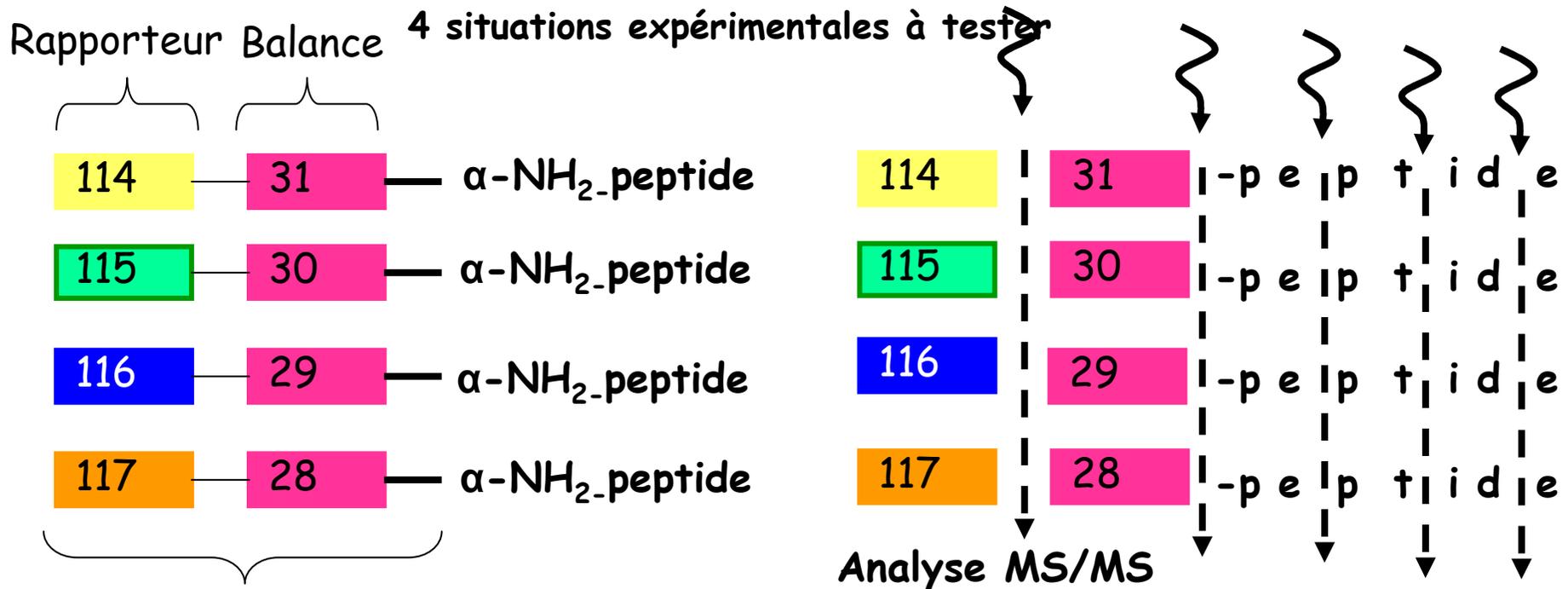


***ICAT: Isotope-Coded Affinity Tag**

2.3. Quantification de protéines : Protéomique Quantitative

2.3.1. quantification relative par Spectrométrie de masse après marquage

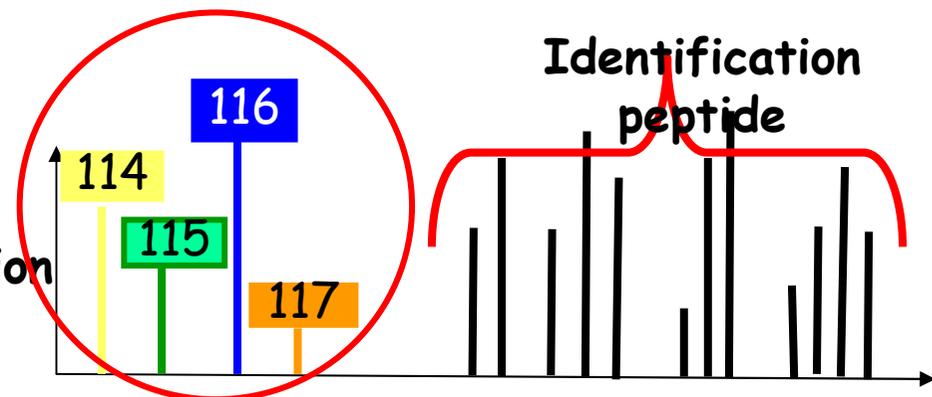
*iTRAQ : Etiquettes isobariques pour la quantification relative



Total 145 Da

Analyse MS: tous les peptides auront une masse globale MS incrémentée de 145 Da

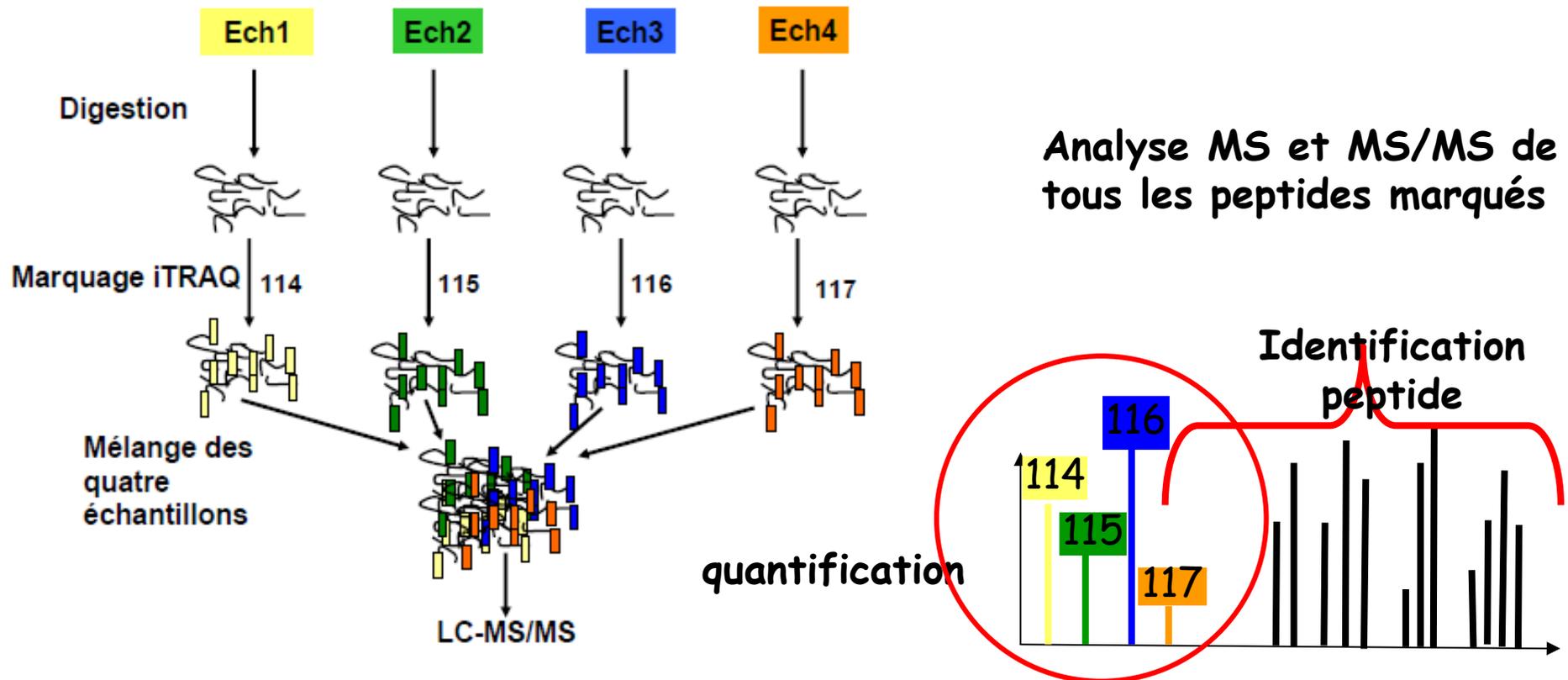
quantification



2.3. Quantification de protéines : Protéomique Quantitative

2.3.1. quantification relative par Spectrométrie de masse après marquage

quantification relative par ITRAQ



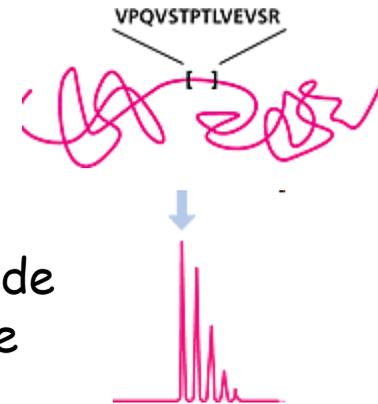
Quantification relative par la mesure de l'intensité des « rapporteurs » spécifiques à chaque situation expérimentale testée, et associé à chaque peptide (quantités moyennées par les différents peptides qui identifient une protéine)

2.3. Quantification de protéines : Protéomique Quantitative

2.3.2. quantification absolue

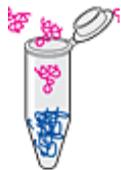
Dosage d'une protéine connue

Synthèse d'un peptide marqué (^{13}C , ^{15}N),
correspondant à une portion de cette protéine

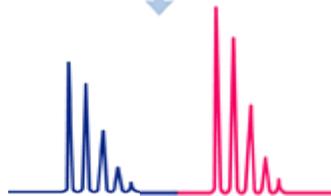


Caractérisation de ce peptide
par spectrométrie de masse

Ajout d'une quantité connue de ce peptide de synthèse
dans l'échantillon biologique



Digestion protéolytique



Analyse en Spectrométrie de Masse
Comparaison des intensités peptide marqué/non marqué
Quantification absolue

2.3. Quantification de protéines : Protéomique Quantitative

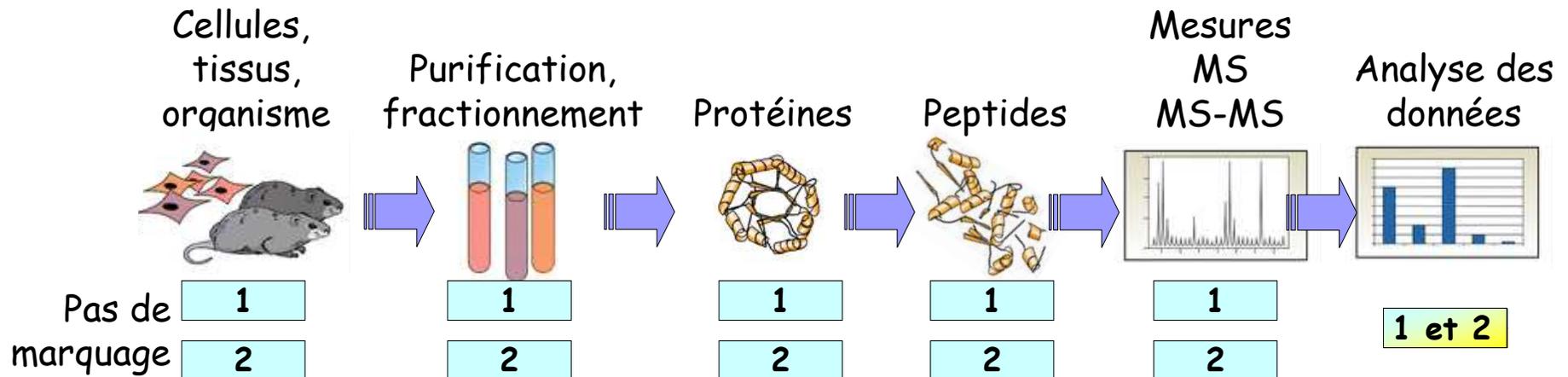
2.3.3. « label free »

Pour comparer deux situations expérimentales
(ou plus!)

Condition 1

Condition 2

Comparaison
du
protéome



Nécessité de répéter chaque situation : expériences biologiques et techniques (n=3 à 10)
et rassembler les données : Go-To !

Et exploitation avec divers outils bioinformatiques ...travail de longue haleine!

La protéomique à la recherche de Biomarqueurs

HUPO : HUMan Proteom Organization
2002 PPP: Plasma Proteome Project

- Le sang humain peut contenir des protéines provenant de différentes parties du corps
- Un répertoire le plus complet des protéines du plasma humain et de leur quantité peut permettre la **découverte de biomarqueurs** de maladies
- Chercheurs du consortium se sont entendus pour multiplier les mesures à partir de différentes préparations et différents spectromètres de masse avec différentes méthodes de quantification
- Par intégration de ces multiples résultats et du développement d'outils bioinformatiques :
Établissement d'un **atlas de peptides (20433) quantifiés** qui réfère à un set non-redondant de 1929 protéines du plasma humain, publiquement accessible.

A High-Confidence Human Plasma Proteome Reference Set with Estimated Concentrations in PeptideAtlas[®]

Terry Farrah^{¶¶}, Eric W. Deutsch[‡], Gilbert S. Omenn^{‡§}, David S. Campbell[‡], Zhi Sun[‡], Julie A. Bletz[‡], Parag Mallick[¶], Jonathan E. Katz[¶], Johan Malmström^{||}, Reto Ossola[|], Julian D. Watts[‡], Biaoyang Lin^{|||‡‡}, Hui Zhang^{§§}, Robert L. Moritz^{‡**},

by laboratories around the world. *Molecular & Cellular Proteomics* 10: 10.1074/mcp.M110.006353, 1–14, 2011.

Fin du cours

JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY, VOL. 33, 1-19 (1998)

***SPECIAL FEATURE:
TUTORIAL***

Mass Spectrometry and the Age of the Proteome

John R. Yates, III*

Department of Molecular Biotechnology, School of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington 98195-7730, USA

Chemical Reviews 2013

Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics

Y. Zhang, B.R. Fonslow, B. Shan, M-C Baek, and J. R. Yates III