

Protéomique analytique et fonctionnelle

Chapitre III

Protéomique analytique

I. Electrophorèse 2D et spectrométrie de masse

I.1. Electrophorèse 2D

I.1.1. Utilité de l'analyse protéomique

I.1.2. L'isoélectrofocalisation (IEF)

I.1.3. Séparation sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

I.2. Spectrométrie de masse

I.2.1. Aperçu général

I.2.2. Sources d'ions et analyseurs

a. Sources

b. Analyseurs

I.2.3. Spectrométrie de masse tandem MS/MS

a. Spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF

b. Spectromètre de masse ESI- QqQ

II. Références bibliographiques

I. Electrophorèse 2D et spectrométrie de masse

I.1. Electrophorèse 2D

C'est une méthode de séparation de protéines ou de plusieurs milliers de polypeptides d'un mélange complexe en fonction de deux propriétés :

- La charge électrique (1^{ère} dimension).
- Le poids moléculaire (2^{ème} dimension), (**figure 1**).

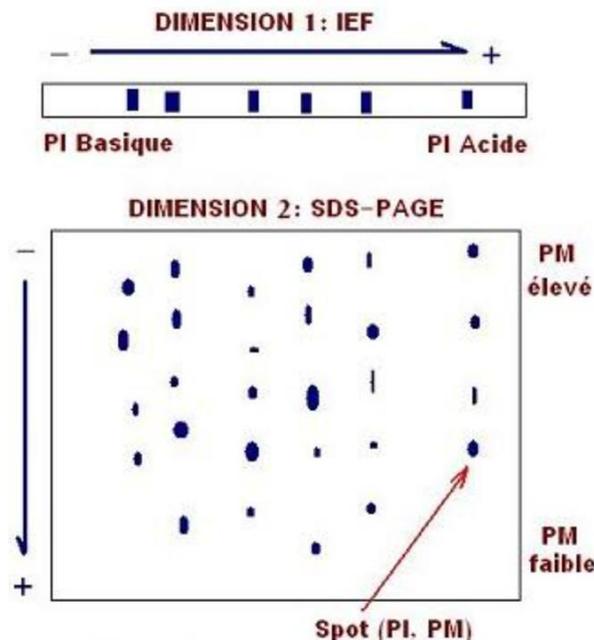


Figure 1 : Les deux modes de séparation des protéines dans l'électrophorèse 2D (IEF et SDS-PAGE).

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), les protéines migrent dans le gel suivant leurs points isoélectriques, c'est-à-dire, qu'elles migrent jusqu'à une position où la valeur du pH est égale à celle de leur pHi (charge globale nulle).

Dans la deuxième dimension :

Les protéines sont séparées par la technique du SDS-PAGE. La résolution s'effectue sur un gel réticulé constitué de polyacrylamide en présence d'un agent dénaturant, le sodium-dodécyl sulfate (SDS). 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 la deuxième dimension est grand, plus la résolution (et donc le nombre de spots séparés) augmente. Cette méthode très sensible, permet de détecter les protéines au niveau de la femtomole (10^{-15} mole/L).

I.1.1 Utilité de l'analyse protéomique

L'analyse protéomique a pour but l'identification et la caractérisation de l'ensemble des protéines exprimées ou protéome dans une cellule, un tissu ou un organisme vivant dans un environnement et un moment donnés ainsi que les interactions protéine-protéine au sein de cet organisme. Elle repose sur une méthodologie couplant l'électrophorèse bidimensionnelle (2D) et la spectrométrie de masse.

Ex : Mise en évidence d'une éventuelle différence dans l'expression génique d'un organisme cellulaire. La **figure 2** illustre une expérience qui consiste à cultiver deux cultures cellulaires dans deux conditions différentes. L'analyse 2D des spots dans les deux gels révélera si les cellules ont ou non le même profil d'expression protéique dans les deux conditions. Si des différences existent, on procède à l'identification de ces protéines par spectrométrie de masse.

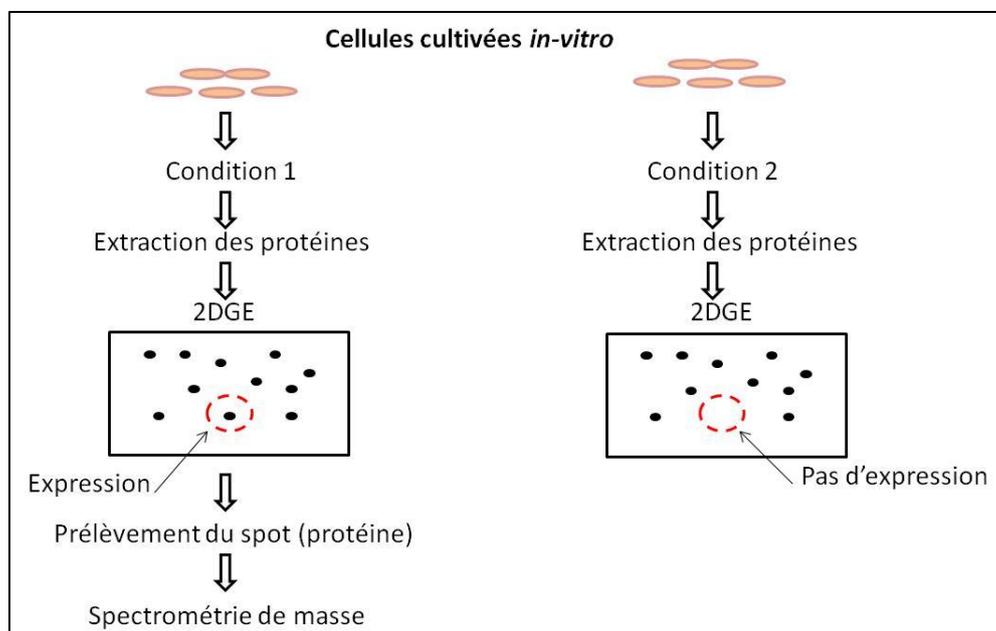
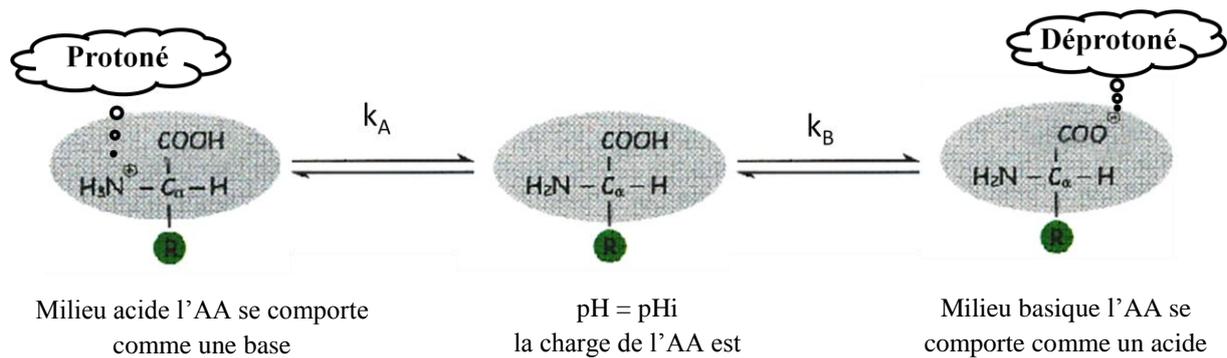


Figure 2 : But de l'électrophorèse 2D.

I.1.2. L'isoélectrofocalisation (IEF)

Rappels des propriétés amphotères des acides aminés

Une substance amphotère est une substance qui peut se comporter à la fois comme un acide et comme une base en fonction du pH du milieu dans lequel elle se trouve. Les acides aminés ont des propriétés amphotères.



Après extraction, les protéines sont déposées sur la zone de dépôt du gel IEF gradué en pH (**figure 3**). En fonction de leur pH_i , les protéines vont se charger positivement ou négativement puis migrer vers leur électrode respective. La migration s'arrête quand la protéine atteint un point de pH égal à son pH_i car sa charge devient nulle, donc insensible au champ électrique.

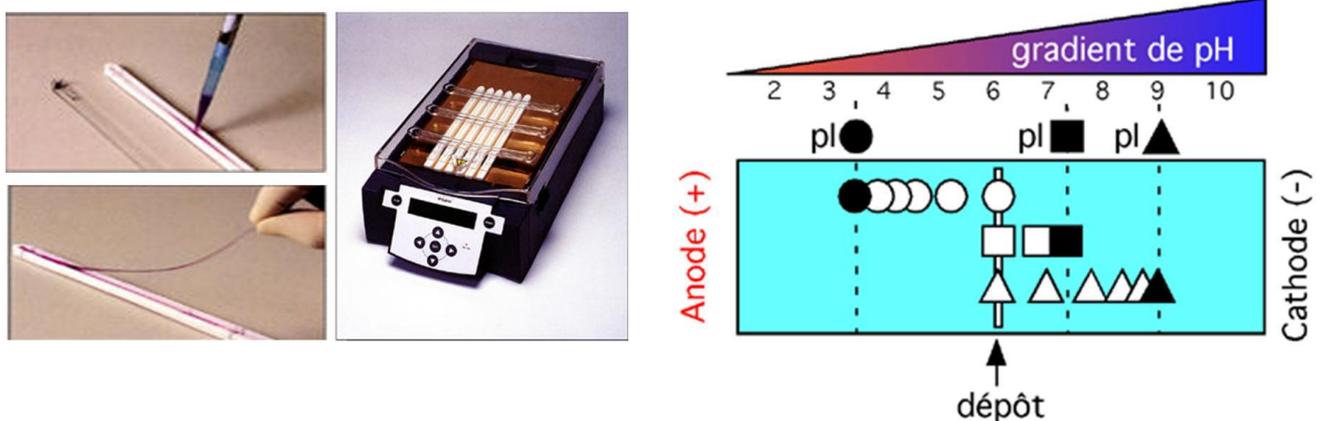


Figure 3 : Dépôt des protéines sur le gel IEF et principe de migration.

Préparation du gel IEF :

La solution d'électrofocalisation est préparée dans un bécher dans lequel on place verticalement un capillaire en veillant à laisser un vide entre le bout du capillaire et le fond du bécher. La solution contient un mélange d'ampholytes qui vont créer le gradient de pH dans le gel. L'ensemble bécher + capillaire est immergé dans d'eau (**figure 4**). La solution d'électrofocalisation monte dans le capillaire sous l'effet du poids de l'eau se trouvant au dessus d'elle. Les ampholytes se distribuent entre l'anode et la cathode en maintenant entre elles un gradient de pH.

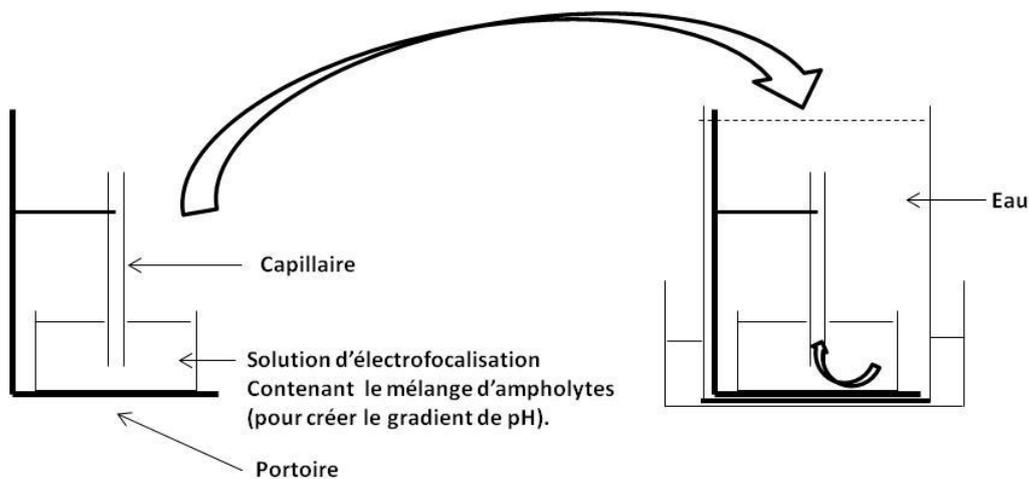


Figure 4 : Préparation du gel IEF.

I.1.3. Séparation sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Une fois l'IEF terminée, le gel est déposé horizontalement au dessus du gel de séparation (**figure 5**). Les protéines préalablement séparées en fonction de leurs pH_i vont maintenant migrer dans le gel de séparation en fonction de leur poids moléculaire (principe du tamis moléculaire).

Lorsque la migration s'achève, le gel de séparation est coloré avec les nitrates d'argent pour voir les spots des protéines.

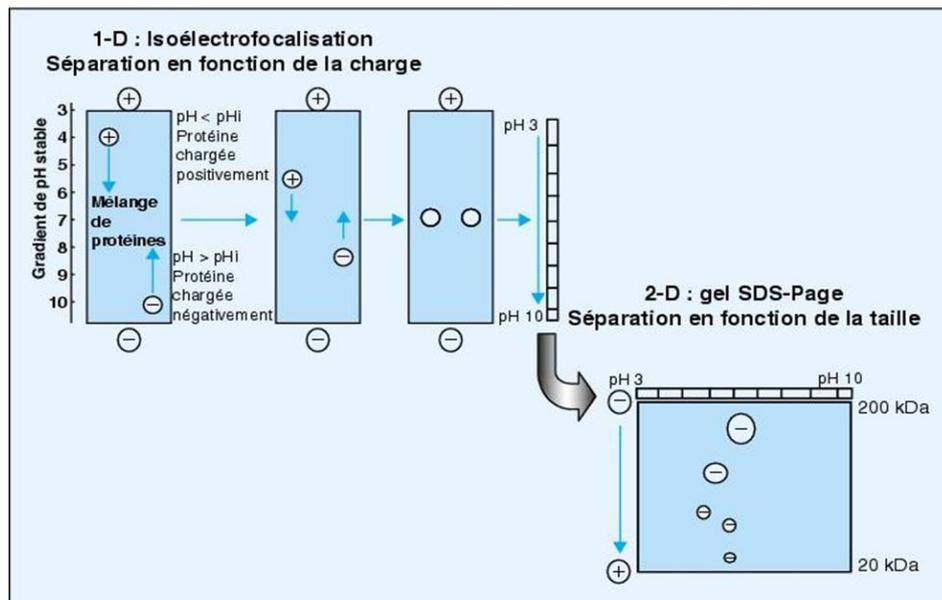


Figure 5 : Dépôt du gel IEF sur le gel de séparation.

I.2. Spectrométrie de masse

I.2.1. Aperçu général

- ⇒ Après coloration et décoloration (révélation) des protéines, le traitement des images captées par un scanner de gel est effectué par un logiciel d'analyse d'images. Ce logiciel permet de comparer la carte de protéines obtenue (électrophorégramme) avec celle des bases données.
- ⇒ Il est fourni des informations comme les masses moléculaires des protéines et leurs point-Isoélectriques.
- ⇒ Les spots correspondant aux protéines d'intérêt sont excisés (découpés) du gel puis digérés à l'aide d'une protéase, la trypsine, pour donner des peptides (**figure 6**).
- ⇒ Les peptides de tailles variables issus de la digestion sont analysés par spectrométrie de masse.
- ⇒ Cette analyse fournit le nom des protéines présentes dans le fragment de gel de départ, ainsi que certaines des modifications post-traductionnelles portées par cette forme protéique.

Qu'est ce que la spectrométrie de masse ?

- ⇒ La spectrométrie de masse des protéines consiste à produire des ions à partir de fragments peptidiques, à les séparer en fonction de leur rapport masse-sur-charge (m/z) et à les détecter.
- ⇒ Un histogramme spécifique de la protéine étudiée montrant les abondances relatives des ions dans la gamme de masse examinée est obtenu. La masse (m) est donné en Dalton (Da) et le rapport m/z en Thomson (Th).
- ⇒ L'identification se fait par une analyse informatique de chaque spectre en comparant le profil des masses peptidiques obtenu à des spectres de masses théoriques dans des banques de données.
- ⇒ Le programme produit ensuite une série de confrontations entre les protéines de la base de données et la protéine en cour d'analyse.
- ⇒ Les correspondances sont répertoriées de la plus forte à la plus faible.
- ⇒ Une parfaite correspondance identifie une protéine sans ambiguïté.

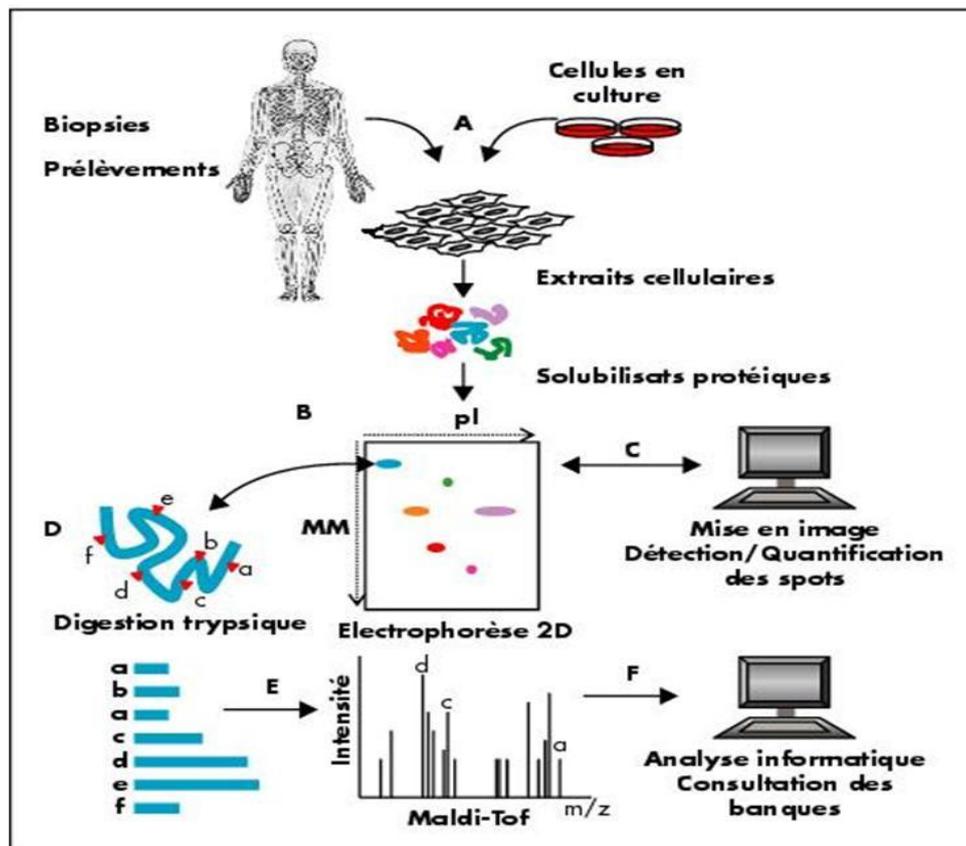


Figure 6 : Le principe de la spectrométrie de masse.

La **figure 7** résume toutes les étapes de l'analyse protéomique :

- 1- Extraction des protéines,
- 2- Isoélectrofocalisation (IEF),
- 3- SDS-PAGE,
- 4- Coloration des spots protéiques,
- 5- Piquage des spots et digestion trypsique,
- 6- Spectrométrie de masse.

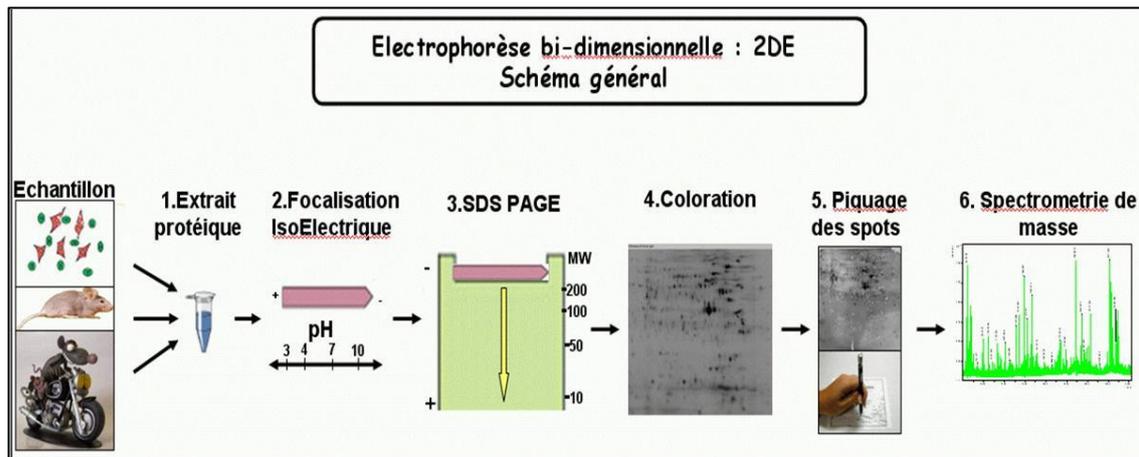


Figure 7 : Les étapes de l'analyse protéomique.

Parmi ces étapes, trois sont essentielles (**figure 8**) :

- 1- Ionisation de l'échantillon,
- 2- Analyse des ions formés
- 3- Détection du signal.

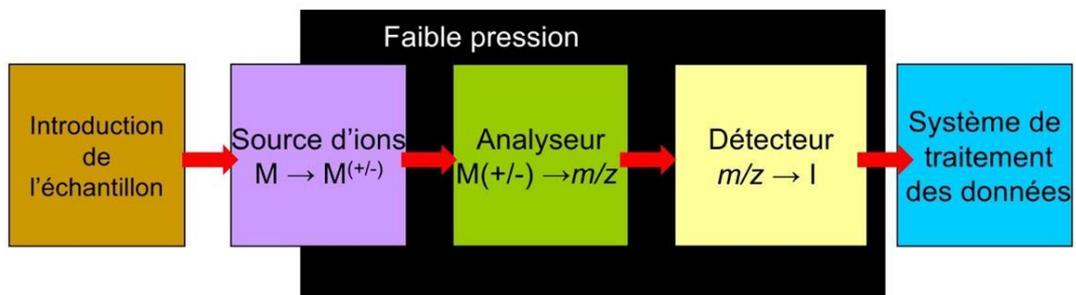


Figure 8 : Les étapes essentielles de l'analyse protéomique.

I.2.2 Sources d'ions et analyseurs

Les principales sources d'ions sont :

- ⇒ *Désorption -Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)*
- ⇒ *ElectroSpray Ionisation (ESI)*.

Ces sources peuvent être couplées à un système chromatographique en phase liquide en amont. De même qu'il existe différentes sources pour volatiliser et ioniser les fragments peptiques.

Il existe différents analyseurs pour séparer les divers ions produits.

- ⇒ *Analyseur à temps- de- vol ou TOF (" Time Of Flight")*
- ⇒ *Quadripôle (Q)*.

a. Sources d'ions

a.1. Désorption -Ionisation par Laser Assistée par Matrice ou Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI):

Elle consiste à mélanger les peptides du digestat de la protéine soumise l'analyse à une solution matrice; molécule de faible masse moléculaire ayant une forte absorption à la longueur d'onde (λ) du laser (**figure 9**). La matrice protège les peptides de la dégradation par le faisceau direct et facilite la vaporisation et l'ionisation. La solution est déposée dans un spot de la plaque MALDI (habituellement en métal). Après vaporisation du solvant, la matrice et les peptides co-cristallisés (**SOLIDE**) restent dans le spot. L'irradiation du mélange composé de la matrice et des peptides par le laser provoque le dépôt d'une importante quantité d'énergie dans les cristaux de matrice par excitation électronique. Il en résulte une désorption par sublimation du mélange matrice/peptide. Le processus ne libère que des ions monochargés. **Le mode d'ionisation est positif.** Les ions $(M+H)^+$ sont formés par transfert de protons entre la matrice photo-excitée et les peptides.

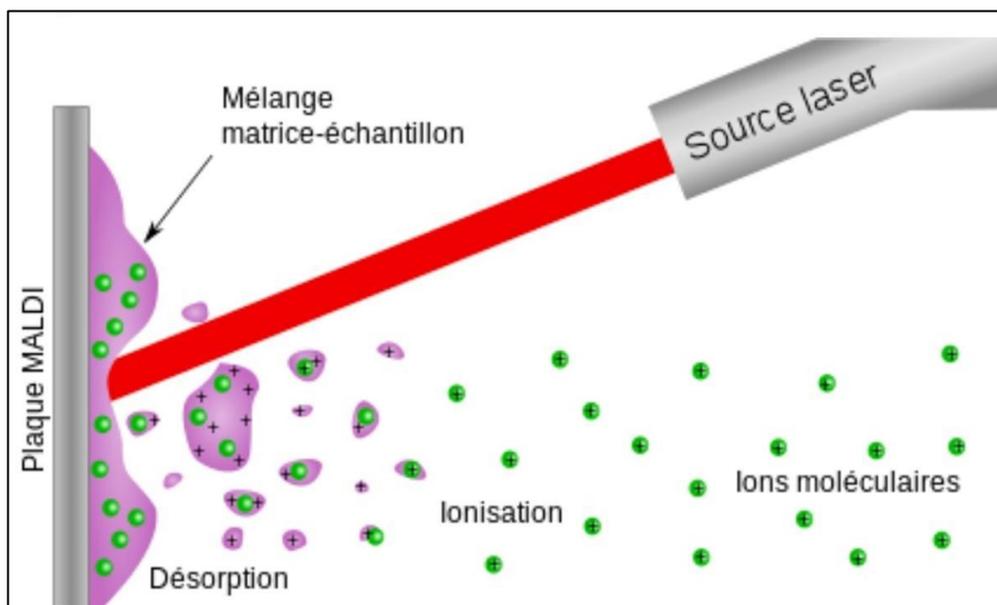


Figure 9 : Désorption -Ionisation par Laser Assistée par Matrice (MALDI).

a.2. *Electronébulisation (ElectroSpray Ionisation) (ESI)*

L'ionisation se fait à partir d'une phase liquide (**figure 10**). Les peptides issus de la digestion trypsique sont en solution aqueuse volatile (mélange méthanol-eau 1:1). Cette solution est introduite dans la source. L'ionisation des peptides a lieu à pression atmosphérique et à température ambiante. Sous l'effet d'un gaz nébuliseur (N₂) et d'un champ électrique, la fragmentation de la goutte (fission coulombique) conduit à l'émission d'un nuage de micro-gouttelettes chargées (électrospray). Le mode d'ionisation est positif. Le processus libère souvent des ions mutichargés comme $(M+2H)^+$.

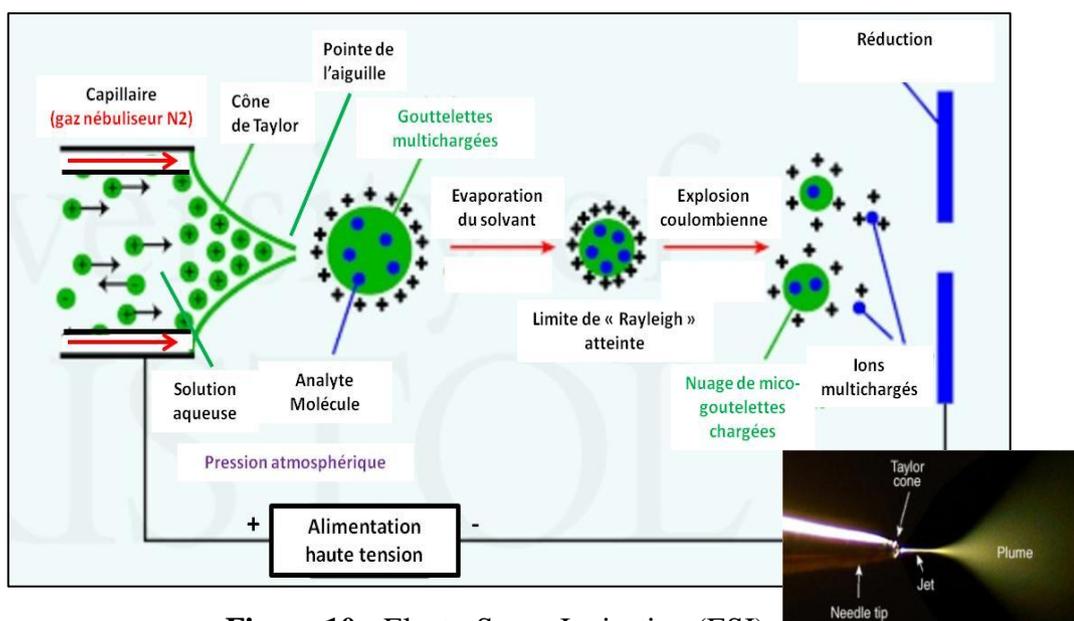


Figure 10 : ElectroSpray Ionisation (ESI).

b. Analyseurs

b.1. Analyseurs temps de vol ou TOF (Time Of Flight)

L'ionisation des peptides est obtenue sous forme brève et non de façon continue. Les ions sont envoyés par paquets à intervalles périodiques dans le tube de vol (tube rectiligne) (**figure 11**). Les ions sont accélérés dans un champ électrique sous une différence de potentiel de 20 Kv. Possédant tous la même énergie cinétique en sortie de source, ils se séparent au cours de leur trajet en fonction de leur vitesse propre qui est elle-même inversement proportionnelle au rapport m/z. Lorsqu'ils arrivent au niveau du détecteur, le rapport m/z est déterminé d'après le temps de vol (Time Of Flight).

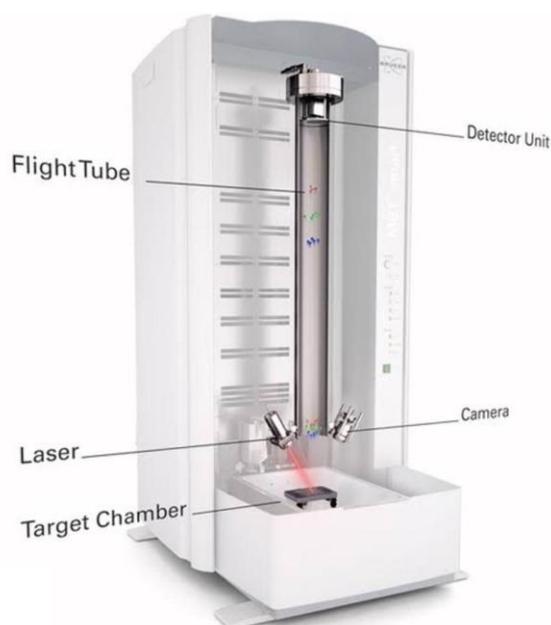


Figure 11 : Analyseurs temps de vol ou TOF (Time Of Flight).

b.2. Analyseurs Quadripolaires

L'analyseur Quadripolaire est constitué de quatre barres conductrices, d'une dizaine de centimètres de longueur, parallèles au faisceau d'ions (**figure 12**). Ces barres qui délimitent la lumière de l'analyseur dans laquelle les ions forment une trajectoire oscillante sont reliés à un générateur de radiofréquence RF (tension $V \cos \omega t$). Les barres sont reliées entre elles et aux générateurs de telle sorte que deux barres opposées sont à potentiel de même signe électrique: soit $\varphi_0 = (U - V \cos \omega t)$, soit $-\varphi_0 = - (U - V \cos \omega t)$. Seuls les ions qui possèdent le rapport m/z convenable (en fonction des valeurs U et V appliquées) décrivent des trajectoires stables et sont en mesure d'atteindre le détecteur. U et V sont les amplitudes des composantes respectivement continue et alternative (Radiofréquence RF de l'ordre MHz) du potentiel φ_0

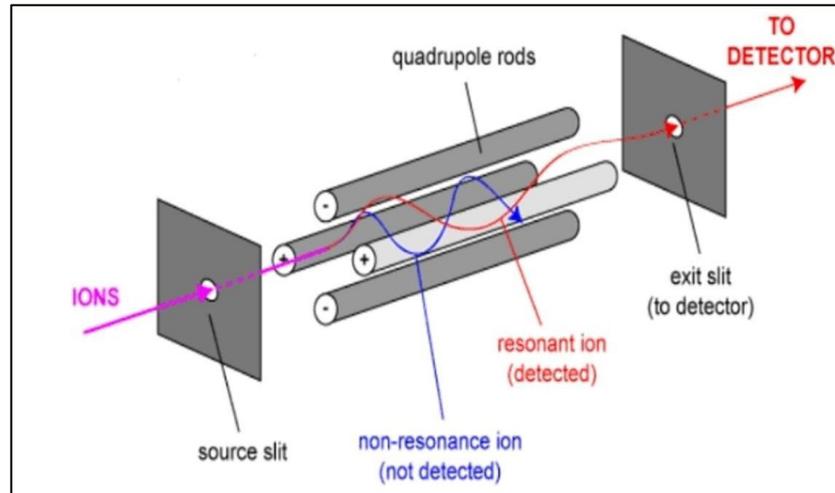


Figure 12 : Analyseurs Quadripolaires.

II.2.3. Spectrométrie de masse tandem MS/MS

Des informations sur la séquence des peptides sont obtenues grâce à une spectrométrie de masse en tandem MS/MS.

a. Spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF

Le spectromètre MALDI-TOF va séparer les peptides selon leur rapport (masse/charge) (m/z) et donne un spectre de masse. Dans ce système il est introduit une cellule de collision entre deux analyseurs TOF. Cette technique est extrêmement performante et donne d'excellents résultats, ce qui lui permet de faire jeu égal avec les techniques de spectrométrie de masse basés sur les sources ESI. Les divers ions produits obtenus à partir des peptides du digestat de la protéine soumise à l'analyse sont séparés en fonction du temps de vol (TOF) et sélectionnés individuellement sur la base du rapport m/z . Après coupure des liaisons peptidiques du peptide ionisé et sélectionné par collision avec des molécules d'hélium ou d'argon dans la cellule de collision, les acides aminés sous forme d'ions libérés sont séparés en fonction du temps de vol.

Le spectre de masse est un graphe en deux dimensions qui indique les valeurs d'intensité en fonction des valeurs de m/z (**figure 13**).

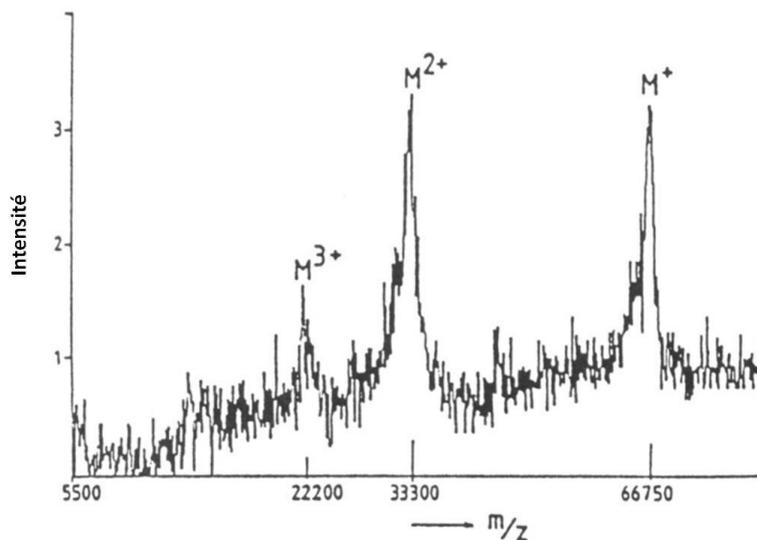


Figure 13 : Exemple d'un spectre de masse MALDI de l'Albumine.

b. Spectromètre de masse ESI- QqQ

Dans un spectromètre de masse avec configuration ESI-QqQ, les peptides ionisés dans la source ESI sont sélectionnés en fonction du rapport m/z dans le premier quadripôle(Q). L'ion sélectionné de masse connue appelé " ion parent " ou ion " précurseur" est orienté vers le deuxième quadripôle (q) qui sert de cellule de collisions où l'énergie appliquée le fragmente. Les " ions fils " produits sont sélectionnés dans le troisième quadripôle (Q) réglé pour balayer la gamme entière de m/z . Il est obtenu des informations sur la masse des fragments générés (figure 14).

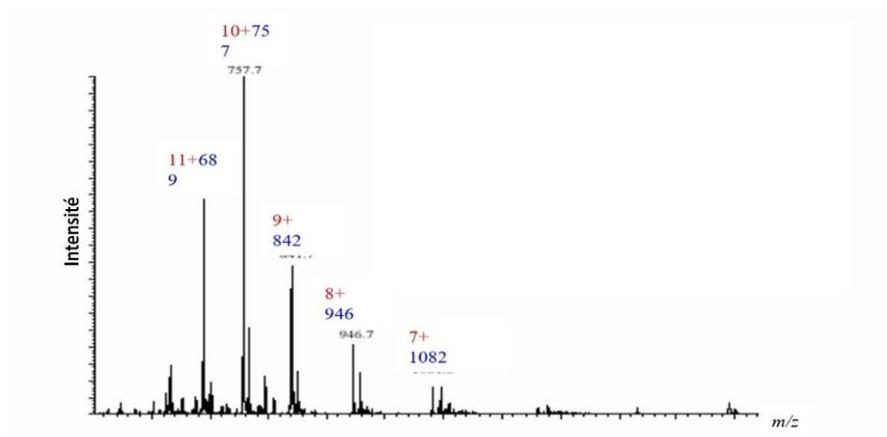


Figure 14 : Exemple d'un spectre de masse ESI.

Références bibliographiques

1. Abou Chakra, OR; Sutra, J.P; Demey Thomas , E; Vinh, J; Lacroix, G; Poncet, P. Proteomic analysis of major and minor allergens from isolated pollen cytoplasmic granules. *J.Proteome.Res* 2012; 11: 1208- 16.
2. Bouakkadia, H; Boutebba, A; Haddad, I; Vinh,J; Guilloux, L; Sutra, J.P; Sénéchal, H; Poncet. Immunoproteomics of non water-soluble allergens from 4legumes flours: peanut, soybean, sesame and lentil. *Ann. Biol. Clin* 2015; 73 (6): 690-704.
3. Marouf, A; Tremblin , G; (2009): *ABREGÉ DE BIOCHIMIE*. Ed. EDP Science.
4. Mouls, L; Subra, G; Aubagnac, J.L; Martinez, J; Enjalbal, C. Tandem Mass Spectrometry of amidated peptides.*J. Mass Spectrom*,2006,41, 1470-1483.
5. Mouls, L; Aubagnac, J.L; Martinez, J; Enjalbal, C. Low energy peptide fragmentation on an ESI-Q-TOF type mass spectrometer.*J. Prot.Res.* 2007, 6, 1378-1391.
6. Rusconi, F; (2009): *Manuel de spectrométrie de massa à l'usage des biochimistes*. Ed. Tech et doc. Lavoisier.
7. Shevchenko , A; Wilm, M; Vorm, O; Mann, M. Spectrometric sequencing of protein silver-stained polyacrylamide gels. *Ann. Chem* 1996; 68: 850-8.