

Filippo Rusconi

Manuel de spectrométrie de masse à l'usage des biochimistes



Logiciel **massXpert**
de simulation et d'analyse
de données de spectrométrie
de masse



Editions
TEC
& **DOC**

Lavoisier

Manuel de
spectrométrie de masse
à l'usage des biochimistes

Manuel de spectrométrie de masse à l'usage des biochimistes

Fourni sur CDROM : logiciel *massXpert* de simulation
et d'analyse de données de spectrométrie de masse
pour GNU/Linux, Apple Mac OS X et MS-Windows

Filippo RUSCONI, Ph.D.
Chercheur au CNRS
Université Paris-Sud — Orsay



11, rue Lavoisier
75008 Paris

Ce livre a été entièrement préparé par l'auteur, en faisant exclusivement usage de logiciels libres¹, sur un système informatique compatible PC entièrement libre. Les logiciels suivants ont été employés :

- * Système d'exploitation *GNU/Linux*
⇒ <http://www.gnu.org> et <http://www.linux.org>
avec la distribution Debian GNU/Linux
⇒ <http://www.debian.org>;
- * Environnement de bureau *KDE*
⇒ <http://www.kde.org>;
- * Système d'édition de texte *GNU emacs*
⇒ <http://www.emacs.org>;
- * Logiciel de dessin vectoriel *Inkscape*
⇒ <http://www.inkscape.org>;
- * Logiciel de retouche d'image *The Gimp*
⇒ <http://www.gimp.org>;
- * Système de mise en page *T_EX* et *L^AT_EX* avec moteur de rendu *pdfL^AT_EX* produisant un fichier PDF prêt pour l'impression ;
- * Logiciel de visualisation de fichiers PDF *Okular*
⇒ <http://www.kde.org>.

¹ Voir le site <http://www.fsf.org> pour une explication du concept de liberté en informatique et le chapitre 8 de la partie sur le logiciel *massXpert* à la page 521.



© LAVOISIER, 2011
ISBN : 978-2-7430-1341-7

Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent ouvrage, faite sans l'autorisation de l'éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (20, rue des Grands Augustins, 75006 Paris), est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et, d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (Loi du 1^{er} juillet 1992 — art. L 122-4 et L 122-5 et Code pénal art. 425).

Table des matières

Avant-propos	xxiii
--------------	-------

Abréviations — Glossaire	xxv
--------------------------	-----

Première partie : Spectrométrie de masse

1	Fondamentaux	3
1.1	Définitions	3
1.2	Spectrométrie de masse des biopolymères	9
1.3	Dissection de pics de masse résolus	15
1.4	Dissection de pics de masse non résolus	18
1.5	Interprétation de spectre	20
1.5.1	Déconvolution de spectre à pics de masse résolus	20
1.5.2	Déconvolution de spectre à pics de masse non résolus	23
1.6	Le pouvoir résolutif d'un instrument	27
1.7	Architecture d'un spectromètre de masse	29
2	Sources d'ions	33
2.1	Source d'ions MALDI	34
2.1.1	Fonctionnement d'une source MALDI	34
2.1.2	Préparation de l'échantillon	38
2.1.3	Caractéristiques des ions générés	40
2.2	Source d'ions ESI	42
2.2.1	Fonctionnement d'une source ESI	42
2.2.2	Préparation de l'échantillon	44
2.2.3	Caractéristiques des ions générés	45
2.2.4	Cas particulier de la source nanoESI	46
2.3	Conclusions	48
3	Analyseurs	51
3.1	Analyseurs temps-de-vol	51
3.1.1	Analyseur linéaire	52

3.1.2	Analyseur réflectron	57
3.2	Analyseur quadropôle	60
3.3	Analyseurs pièges à ions	65
3.3.1	Analyseur piège à ions quadrupolaire	65
3.3.2	Analyseur piège à ions linéaire	67
3.3.3	Conclusions	68
3.4	Analyseur résonance ionique cyclotronique	69
3.5	Analyseur piège à ions orbital	79
3.6	Combinaisons d'analyseurs	84
3.6.1	Spectromètre de masse à triple quadropôle QqQ	84
3.6.2	Spectromètre de masse hybride Qq-TOF	84

Deuxième partie : Chimie des biopolymères

4	Méthodes de purification	93
4.1	Généralités	93
4.2	Méthodes chromatographiques	94
4.2.1	Chromatographie d'exclusion	95
4.2.2	Chromatographie par échange d'ions	97
4.2.3	Chromatographie d'interactions hydrophiles	98
4.2.4	Chromatographie d'interactions hydrophobes	99
4.2.5	Chromatographie sur résine de phase inversée	100
4.2.6	Chromatographie par paire d'ions sur résine de phase inversée	101
4.2.7	Chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés	103
4.2.8	Chromatographie d'affinité	105
4.3	Méthodes en gel	106
4.3.1	Électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide	107
4.3.2	Électrophorèse en gel de poly- acrylamide à deux dimensions	108
4.3.3	Électrophorèse non dénaturante en gel de polyacrylamide	112
5	Les protéines	115
5.1	Généralités	115
5.2	Structure	117

5.2.1	Structures de base	117
5.2.2	Édifices plus complexes: les oligopeptides	124
5.3	Production de peptides d'une protéine	126
5.4	Séparation et purification	128
5.4.1	Généralités	128
5.4.2	Purification de protéines et de peptides	132
5.5	Spectrométrie de masse des protéines	142
5.5.1	Calculs élémentaires de masse	144
5.5.2	Spectrométrie de masse MALDI	148
5.5.3	Spectrométrie de masse ESI	163
5.6	Spectrométrie de masse des peptides	181
5.6.1	Empreinte peptidique	183
5.6.2	Fragmentations en phase gazeuse	198
5.6.3	Méthode de calcul de masse des fragments	240
5.6.4	Applications de la spectrométrie de masse des peptides	243
5.6.5	Quantification de protéines	297
6	Les acides nucléiques	329
6.1	Généralités	329
6.2	Structure	330
6.2.1	Structures de base	330
6.2.2	Édifices plus complexes: les oligonucléotides	332
6.3	Séparation et purification	336
6.3.1	Généralités	336
6.3.2	Purification d'acides nucléiques	337
6.3.3	Exemples d'applications	342
6.4	Spectrométrie de masse de l'ADN	349
6.4.1	Calculs élémentaires de masse	350
6.4.2	Fragmentations en phase gazeuse	355
6.4.3	Spectrométrie de masse MALDI	384
6.4.4	Spectrométrie de masse ESI	392
6.4.5	Analyse de spectre	393
6.5	Spectrométrie de masse de l'ARN	408
6.5.1	Calculs élémentaires de masse	408
6.5.2	Fragmentations en phase gazeuse	411
6.5.3	Analyse de spectre	419

7 Les glucides	429
7.1 Généralités	429
7.2 Structure	430
7.2.1 Structures de base	430
7.2.2 Édifices plus complexes: oligosaccharides et polysaccharides	440
7.2.3 La glycosylation des protéines	440
7.3 Séparation et purification	445
7.3.1 Généralités	446
7.3.2 Purification de protéines ou de peptides glycosylés	449
7.3.3 Libération des glycannes	456
7.3.4 Purification de glycannes	462
7.4 Spectrométrie de masse des glycannes	464
7.4.1 Calculs élémentaires de masse	465
7.4.2 Fragmentations en phase gazeuse	475
7.4.3 Spectrométrie de masse MALDI	484
7.4.4 Spectrométrie de masse ESI	500
7.5 Spectrométrie de masse des glycopeptides	501

Troisième partie : Simulation et analyse de données

Le logiciel *massXpert*

8 <i>massXpert</i>: Généralités	521
9 <i>XpertDef</i>	525
9.1 Entités singulières	527
9.2 Entités plurielles	527
9.2.1 Les atomes	528
9.2.2 Les monomères	529
9.2.3 Les modifications	531
9.2.4 Les agents pontants	532
9.2.5 Les clivages	534
9.2.6 Les fragmentations	535
9.3 Enregistrer la définition	544
10 <i>XpertCalc</i>	545
10.1 Une mise en œuvre facile	545
10.2 Une calculatrice enregistreuse	547
10.3 Une calculatrice programmable	548
10.4 Le calculateur de ratios m/z	554
10.5 Le calculateur de massifs isotopiques	557

11	<i>XpertEdit</i>	561
11.1	La fenêtre principale	563
11.2	Édition de séquences	564
11.2.1	Codes multi-caractères	565
11.3	Sélections de séquences	566
11.4	Les menus du module <i>XpertEdit</i>	568
11.4.1	Le menu <i>Fichier</i>	570
11.4.2	Le menu <i>Éditer</i>	572
11.4.3	Le menu <i>Chimie</i>	572
11.5	Calculs de rapports m/z	587
11.6	Compositions	587
11.7	Options générales	588
11.7.1	Décimales	588
12	<i>XpertMiner</i>	591
12.0.2	Création de listes de paires $(m/z, z)$	593
12.1	Calculs sur liste unique	594
12.2	Calculs sur deux listes	595
12.2.1	Processus de comparaison	595
12.2.2	Exploitation des résultats	596
13	Personnaliser ses données	599
13.1	Le système de fichiers de <i>massXpert</i>	599
13.1.1	Les fichiers de la distribution	600
13.1.2	Les fichiers de l'utilisateur	606
13.2	Personnaliser ses données	607
13.2.1	Édition du fichier <code>ldna.xml</code> dans le module <i>XpertDef</i>	609
14	Annexes	613
	GNU General Public License Text	613
	Index	627

Table des figures

1.1	Profils de massifs isotopiques de peptides différemment chargés	16
1.2	Pic de masse sans la résolution isotopique.	19
1.3	Massifs isotopiques d'un analyte chargé 1+ ou 5+	21
1.4	Famille de charges dans un spectre de masse de protéine .	24
1.5	Spectre de masse de protéine à famille de charges après attribution de la charge à chaque pic	26
1.6	Pouvoir résolutif d'un spectromètre de masse	28
1.7	Architectures de spectromètres de masse	30
2.1	Principe de l'ionisation MALDI	35
2.2	Matrices de MALDI	37
2.3	Principe de l'ionisation MALDI	43
3.1	Analyseur à temps-de-vol	52
3.2	Principe de l'analyseur à temps-de-vol linéaire	53
3.3	Spectres obtenus avec un analyseur TOF en modes linéaire et rélectron	58
3.4	Principe d'un analyseur temps-de-vol à rélectron	59
3.5	Analyseur quadrupôle	61
3.6	Principe de l'analyseur à quadrupôle	62
3.7	Analyseur piège ionique quadrupolaire	65
3.8	Principe de l'analyseur piège à ions quadrupolaire	66
3.9	Analyseur piège ionique linéaire	68
3.10	Analyseur à résonance ionique cyclotronique	70
3.11	Principe l'analyseur à résonance ionique cyclotronique . .	72
3.12	Traitement du signal conduisant d'un spectre de courants image à un spectre de masse	76
3.13	Analyseur piège à ion orbital	80
3.14	Principe d'un analyseur piège à ions orbital	81
3.15	Architecture d'un spectromètre de masse hybride Qq-TOF	85
4.1	Principe de la chromatographie d'exclusion	96

4.2	Principe de la chromatographie haute performance par paire d'ions sur résine de phase inversée	102
4.3	Mécanisme d'interaction des résidus histidine d'une protéine avec une résine à ions métalliques immobilisés	104
4.4	Électrophorèse en gel de polyacrylamide	109
4.5	Électrophorèse en gel de polyacrylamide à deux dimensions	111
4.6	Électrophorèse non dénaturante en gel de polyacrylamide	113
5.1	Séries L et D des amino-acides	118
5.2	Structure des vingt amino-acides canoniques	120
5.3	Domaines d'ionisation des différents groupements chimiques des amino-acides en fonction du pH	121
5.4	Quelques modifications chimiques des amino-acides	123
5.5	Structure de l'oligopeptide IKLDR	125
5.6	Principales situations analytiques en protéomique	131
5.7	Stratégie de purification par affinité en tandem avec double étiquette	140
5.8	Purification par affinité spécifique de protéines interagissant avec l'ADN	143
5.9	Synthèse d'une liaison peptidique	145
5.10	Exemple de calcul de masse pour un oligopeptide	147
5.11	Artéfacts rencontrés en spectrométrie de masse MALDI des protéines	149
5.12	Diversité moléculaire d'une protéine purifiée observée par spectrométrie de masse MALDI-TOF	154
5.13	Diversité moléculaire dans une fraction protéique de chromatographie d'échange d'anions	156
5.14	Détermination de la stœchiométrie d'un oligomère protéique toxique : l'aerolysine	159
5.15	Pontage covalent des deux partenaires d'un complexe binaire non covalent	161
5.16	Pontage covalent de la protéine prion et de son anticorps .	162
5.17	Déconvolution d'un spectre masse obtenu par spectrométrie de masse à électronébulisation d'une protéine	164
5.18	Oxydation d'une protéine exposée à des rayonnements ionisants	169
5.19	Effet de la pression dans la source sur la désolvatation d'un complexe protéique non covalent	174
5.20	Structure de la sous-unité cœur 20S du protéasome	175
5.21	Spectre de masse d'interactions non covalentes de la sous-unité α du protéasome	176
5.22	Spectre de masse d'interactions non covalentes de la sous-unité cœur 20S du protéasome	178

5.23	Spectres de masse des interactions non covalentes d'enveloppes virales du virus de l'hépatite B	180
5.24	Les bases de données de protéines, de peptides et de fragments	185
5.25	Processus d'identification d'une protéine par empreinte peptidique	188
5.26	Interface de recherche de protéine à partir d'une empreinte peptidique	190
5.27	Page de résultats d'une recherche de protéine par empreinte peptidique	193
5.28	Page de détails sur une identité putative de protéine . . .	195
5.29	Fragmentations observées sur des protéines	200
5.30	Principe du séquençage de peptides par fragmentation en phase gazeuse	202
5.31	Comparaison de la fragmentation SID de différents peptides à différentes énergies	211
5.32	Comparaison de la fragmentation SID de deux peptides de même séquence, mais différant l'un de l'autre par la charge électrique	212
5.33	Formation des fragments b et y selon la voie de protonation de l'atome d'azote de la liaison amide	216
5.34	Formation des fragments b et y selon la voie de protonation de l'atome d'oxygène de la liaison amide	218
5.35	Formation des fragments y par cassure au niveau de la deuxième liaison amide du peptide	220
5.36	Formation des fragments y par cassure au-delà de la deuxième liaison amide du peptide	221
5.37	Formation de deux fragments b_1 par fragmentation d'un dipeptide cyclique	223
5.38	Formation des fragments a_1 et y par cassure autour du groupement carbonyle de la première liaison amide du peptide	224
5.39	Formation des fragments a_1 et y par formation d'un cycle aziridinone et décomposition du $C\equiv O$	225
5.40	Formation de fragments b non conventionnels par implication de l'amine ϵNH_2 d'un résidu lysine	227
5.41	Formation de fragments b non conventionnels par implication de la fonction guanidine d'un résidu arginine	229
5.42	Formation de fragments b non conventionnels par implication de la fonction carboxyle d'un résidu acide ; cas du glutamate	230
5.43	Fragmentation interne produisant les ions immonium . . .	231

5.44	Décomposition avec perte d'eau par implication d'un groupement carboxyle d'un résidu glutamate N-terminal . . .	233
5.45	Décomposition avec perte d'eau par implication d'un résidu sérine interne	234
5.46	Décomposition avec perte d'eau par implication d'un groupement carboxyle C-terminal	235
5.47	Décomposition avec perte d'ammoniac par implication d'un résidu lysine interne	236
5.48	Décomposition avec perte d'ammoniac par implication d'un résidu lysine N-terminal	236
5.49	Décomposition avec perte d'ammoniac par implication d'un résidu glutamine N-terminal	237
5.50	Décomposition avec perte d'acide sulfénique par implication d'un résidu méthionine oxydé	238
5.51	Formation des paires de fragments <i>c/z</i> et <i>a/y</i> par capture/transfert d'électron	240
5.52	Formation des fragments <i>d</i> et <i>w</i> par fragmentation ECD de la chaîne latérale des résidus Leu et Ile	241
5.53	Calcul de masse des fragments peptidiques	242
5.54	Identification de protéines à haut débit (« <i>shotgun proteomics</i> »)	249
5.55	Réaction de dérivation chimique d'un peptide avec l'acétyl-TMPP	255
5.56	Fragmentations d'un peptide dérivé avec l'acétyl-TMPP	257
5.57	Fragmentation de peptides trypsiques près dérivation N-terminale et digestion C-terminale	259
5.58	Spectre de fragmentation ECD d'une petite protéine : l'ubiquitine	260
5.59	Réduction de charge par capture d'électrons de la part d'un ion octaprotone	262
5.60	Simplification de spectre de fragmentation ETD de l'ubiquitine par des transferts de proton répétés	265
5.61	Mécanisme de perte de neutre H_3PO_4 par fragmentation CID d'un peptide phosphorylé au niveau d'un résidu sérine/thréonine	270
5.62	Détection par spectrométrie de masse d'un peptide phosphorylé et localisation de la modification	271
5.63	Phosphoprotéomique des protéines nucléaires de la lignée cellulaire HeLa	274
5.64	Identification et localisation de l'acétylation et de la triméthylation de deux résidus lysine par spectrométrie de masse MS/MS	280

5.65	Identification et localisation de l'acétylation et de la triméthylation de deux résidus lysine par spectrométrie de masse MS/MS (suite)	282
5.66	Structures de résidus lysine diméthylé, formylé ou acétylé	284
5.67	Caractérisation des diméthylations symétrique et asymétrique des résidus arginine	286
5.68	Fragmentations par CID et ETD de peptides méthylés sur des résidus arginine	289
5.69	Fragmentations par CID et ETD de peptides méthylés sur des résidus arginine (suite)	292
5.70	Chromatographie des hydrolysats de centrine 2	296
5.71	Séquençage par fragmentation des peptides C-terminaux de la centrine 2	298
5.72	Principe du marquage de peptides avec l'étiquette ICAT .	300
5.73	Protocole du marquage de peptides avec l'étiquette ICAT	302
5.74	SILAC : détection et quantification relative d'ions peptidiques par marquage isotopique différentiel à l'arginine [¹³ C] ₆	306
5.75	Principe du marquage multiplex de peptides avec quatre étiquettes isobares iTRAQ	309
5.76	Protocole de quantification iTRAQ de peptides par spectrométrie de masse	311
6.1	Structure des bases azotées de l'ADN et de l'ARN	331
6.2	Quelques modifications chimiques des nucléobases	333
6.3	Modifications de la guanine par des génotoxiques	334
6.4	Structure d'un oligonucléotide	335
6.5	Principales situations en analyse des acides nucléiques . .	338
6.6	Génotypage d'un individu sur la base du STR HUMTH01 .	344
6.7	Génotypage d'individus sains et malades au niveau du gène <i>c-K-ras</i>	346
6.8	Caractérisation de la méthylation de l'ADN chez un sujet	347
6.9	Synthèse d'une liaison phosphodiester	351
6.10	Principaux monomères rencontrés dans l'ADN	353
6.11	Exemple de calcul de masse pour un oligonucléotide ADN	354
6.12	Fragmentations observées sur des acides nucléiques	356
6.13	Formation des fragments [a-B] et w	359
6.14	Formation des fragments [a-B] et w (suite)	360
6.15	Décomposition préférentielle de la base en 5'	363
6.16	Principe de l'échange isotopique H/D	366
6.17	Formation du fragment w ₃ pour l'oligonucléotide GTTT .	368
6.18	Formation des fragments [a-B] et w en fonction de la localisation de la charge sur un tétranucléotide.	370

6.19	Formation des ions [a–B] et w pour deux hexanucléotides isomères	373
6.20	Formation des fragments a et [a–B]	375
6.21	Formation des fragments b ₁ et x ₃ pour l’oligonucléotide GTTT	376
6.22	Formation des fragments d et z	377
6.23	Comparaison de la fragmentation d’oligonucléotides sur différents spectromètres	380
6.24	Structures des extrémités libérées lors de la fragmentation d’oligonucléotides en mode négatif	381
6.25	Calcul de masse de fragments oligonucléotidiques en mode négatif	382
6.26	Calcul de masse de fragments oligonucléotidiques en mode négatif (suite)	383
6.27	Structures des extrémités libérées lors de la fragmentation d’oligonucléotides en mode positif	385
6.28	Calcul de masse de fragments oligonucléotidiques en mode positif	386
6.29	Calcul de masse de fragments oligonucléotidiques en mode positif (suite)	387
6.30	Détection de polymorphisme génétique par spectrométrie de masse	391
6.31	Analyse d’adduits d’alkyle à la guanine	395
6.32	Quantification de la méthylation de l’ADN à l’échelle du génome	397
6.33	Spectre de masse de la m ⁵ dC	398
6.34	Chromatogrammes correspondant à dix transitions <i>m/z</i> par spectrométrie de masse ESI-MS/MS d’un mélange complexe de nucléosides	400
6.35	Détection de mutations par spectrométrie de masse	403
6.36	Automatisation de l’analyse de séquences mutées	406
6.37	Analyse par spectrométrie de masse de séquences répétées	407
6.38	Principaux monomères rencontrés dans l’ARN	409
6.39	Exemple de calcul de masse pour un oligonucléotide ARN	410
6.40	Fragmentation d’un oligonucléotide ARN	412
6.41	Effet de l’énergie de collision sur la formation des ions-produit d’un oligonucléotide ARN	413
6.42	Sites de fragmentation dans des oligonucléotides mixtes ADN-ARN	416
6.43	Voies de fragmentation hypothétiques pour la formation des fragments c et y de l’ARN	417
6.44	Détection et localisation d’événements de pseudouridylation	420

6.45	Détection spécifique des résidus pseudouridine de l'ARN _t	422
6.46	Localisation d'une pseudouridinylation par fragmentation du dérivé cyanoéthylé en phase gazeuse	423
7.1	Stéréoisomères du glycéraldéhyde	430
7.2	Série des aldoses	432
7.3	Exemples de cétooses	433
7.4	Formation d'un hémiacétal ou d'un hémicétal	434
7.5	Cyclisation des aldoses et des cétooses	435
7.6	Structures des dimères lactose et saccharose	436
7.7	Représentation de Haworth et formule conformationnelle en chaise	437
7.8	Quelques monoses modifiés	438
7.9	N-glycosylation	442
7.10	O-glycosylation	444
7.11	Principales situations analytiques en glycomique ou en glycoprotéomique	448
7.12	Principe de la caractérisation des N-glycannes d'un mélange protéique par SDS-PAGE ou 2D-PAGE	450
7.13	Principe de la purification covalente de protéines N-glycosylées sur une résine hydrazine	453
7.14	Libération des N-glycannes et dérivations chimiques	458
7.15	Libération des N- et O- glycannes	461
7.16	Synthèse d'une liaison glycosidique	467
7.17	N-glycannes: calculs de masse	469
7.18	N-glycannes: calculs de masse	471
7.19	O-glycannes: calculs de masse	472
7.20	Deux exemples de calculs de masse	473
7.21	Isomères structuraux de N-glycannes	475
7.22	Fragmentations les plus courantes	477
7.23	Fragmentations E, F et G en mode positif	479
7.24	Fragmentations B et Y en mode positif	481
7.25	Fragmentations B et Y en mode négatif	482
7.26	Fragmentations C et Z en mode négatif	483
7.27	Calcul de masse de fragments glycaniques	485
7.28	Calcul de masse de fragments glycaniques (suite)	486
7.29	Calcul de masse de fragments glycaniques (suite)	487
7.30	Calcul de masse de fragments glycaniques (suite)	488
7.31	Spectre MALDI-TOF d'un mélange de N-glycannes	492
7.32	Fragmentation MALDI-PSD	493
7.33	Fragmentation MALDI-PSD	496
7.34	Fragmentation CID à haute énergie d'un glucide dans un spectromètre de masse MALDI-TOF-TOF	498

7.35	Fragmentation MALDI-TOF-TOF, interprétation	499
7.36	Fragmentation ESI-Q-TOF	502
7.37	Interprétation d'un spectre de fragmentation ESI-Q-TOF	503
7.38	Fragmentations CID d'un glycopeptide tryptique en ESI-IT	505
7.39	Fragmentations CID d'un glycopeptide en ESI-FT-ICR et MALDI-TOF-TOF	507
7.40	Interprétation de spectres de fragmentations CID d'un glycopeptide en ESI-FT-ICR et MALDI-TOF-TOF	508
7.41	Spectre de fragmentation ECD ESI-Q/FT-ICR d'un gly- copeptide	511
7.42	Spectre de fragmentation IRMPD ESI-Q/FT-ICR d'un glycopeptide	512
7.43	Spectres de fragmentation PD et PSD d'un glycopeptide .	514
9.1	Sélection d'une définition de chimie de polymère	526
9.2	Fenêtre principale du module <i>XpertDef</i>	526
9.3	Définition des atomes dans le module <i>XpertDef</i>	528
9.4	Définition d'un atome ayant un symbole à trois lettres . .	529
9.5	Définition des monomères dans le module <i>XpertDef</i>	530
9.6	Définition des modifications dans le module <i>XpertDef</i> . .	532
9.7	Définition des agents pontants dans le module <i>XpertDef</i> .	533
9.8	Définition des clivage dans le module <i>XpertDef</i>	534
9.9	Hydrolyse d'une protéine par le bromure de cyanogène. . .	536
9.10	Définition des fragmentations dans le module <i>XpertDef</i> .	537
9.11	Cas complexe de calcul de fragmentation	540
9.12	Définition de fragmentations complexes	541
9.13	Exemples de règles de fragmentation	543
10.1	Fenêtre principale du module <i>XpertCalc</i>	546
10.2	Enregistreur du module <i>XpertCalc</i>	548
10.3	Pavé chimique du module <i>XpertCalc</i>	549
10.4	Calcul de ratios m/z du module <i>XpertCalc</i>	555
10.5	Calcul de rapports m/z du module <i>XpertCalc</i> avec chan- gement d'agent d'ionisation	556
10.6	Calcul de massif isotopique	559
10.7	Graphe de massif isotopique (module <i>XpertCalc</i>)	560
11.1	Sélection d'une séquence dans le module <i>XpertEdit</i>	562
11.2	Fenêtre principale du module <i>XpertEdit</i>	562
11.3	Liste des monomères disponibles au niveau de l'éditeur de séquence	565
11.4	Édition d'une séquence avec des codes multi-caractères (module <i>XpertEdit</i>)	567

11.5	Différentes sélections dans le module <i>XpertEdit</i>	569
11.6	Les menus du module <i>XpertEdit</i>	570
11.7	Import brut d'une séquence dans le module <i>XpertEdit</i>	571
11.8	Recherche de séquence dans le module <i>XpertEdit</i>	573
11.9	Modification de polymère	574
11.10	Modification de monomère	575
11.11	Erreur de modification de monomère	576
11.12	Affichage d'une modification chimique dans le canevas	578
11.13	Pontage de monomères	579
11.14	Clivage de polymère	580
11.15	Fragmentation d'oligomère	583
11.16	Recherche de masses	585
11.17	Options de filtrage des données d'oligomères	586
11.18	Compositions en monomères et élémentaire	588
11.19	Configuration des options générales	589
12.1	Sélection de la définition de chimie de polymère	591
12.2	Fenêtre principale du module <i>XpertMiner</i>	592
12.3	Résultat de comparaison (module <i>XpertMiner</i>)	596
13.1	Hiérarchie de fichiers de données de la distribution	601
13.2	Fichiers graphiques <i>SVG</i>	603
13.3	Rendu graphique d'une modification	605
13.4	La nouvelle définition de chimie de polymère <i>ldna</i>	609
13.5	Les nouveaux monomères de la définition <i>ldna</i>	610
13.6	Nouvelles vignettes pour la définition <i>ldna</i>	610
13.7	Séquence de polymère de la nouvelle définition de chimie de polymère <i>ldna</i>	612

À mon épouse María Cecilia et à mes deux fillettes Irene et Lia,
pour leurs encouragements, leur patience et leur tendre présence.

Avant-propos

Ce manuel s'adresse à toute personne désireuse de maîtriser en profondeur les concepts fondateurs de la spectrométrie de masse des trois polymères biologiques : les protéines, les acides nucléiques et les glucides. Seules des connaissances de chimie de niveau Bac+2 sont requises pour entamer l'exploration de ce champ disciplinaire vaste et passionnant. Ce livre a été conçu pour un public allant du technicien supérieur au chercheur confirmé, mais novice en spectrométrie de masse.

Ce manuel est un manuel qui prend son temps. Toutes les notions de base sont longuement introduites — sans idée préconçue de ce que sait ou ne sait pas déjà le lecteur — afin de constituer un socle solide sur lequel élaborer des concepts plus avancés. La structure de cet ouvrage témoigne du caractère progressif de l'exposé, avec les trois grandes parties décrites ci-dessous :

- * Partie I : la spectrométrie de masse est décrite en tant que champ disciplinaire en soi. Le lecteur y apprendra tout d'abord ce qu'est un spectre de masse et comment il doit être lu et interprété. Cela requiert en tout premier lieu de bien définir les entités chimiques de base sur lesquelles l'on travaille : les éléments chimiques, les atomes, les isotopes. De là, on peut définir les différents types de masses que l'on peut mesurer en fonction des instruments et des analytes eux-mêmes. Ensuite, les différents types d'instruments disponibles sur le marché sont passés en revue avec des descriptions pédagogiques et détaillées du fonctionnement des deux premiers modules d'un spectromètre de masse : la source d'ions et l'analyseur ;
- * Partie II : La spectrométrie de masse des trois grands polymères biologiques est décrite de manière à introduire progressivement les concepts les plus élaborés. Un premier chapitre s'intéresse aux grandes méthodes de purification et de séparation des polymères biologiques. Les chapitres suivants s'y référeront continuellement, car une analyse par spectrométrie de masse ne peut se révéler utile que si la préparation de l'échantillon est dès le départ incluse dans tout le processus analytique. Chaque biopolymère est traité dans un chapitre différent, dont l'organisation est toujours similaire : d'abord, les éléments de

base du polymère (les « briques moléculaires ») sont décrits en insistant sur les particularités structurales et physico-chimiques qui distinguent chaque polymère des deux autres. Une section sur la séparation et la purification des analytes détaille les techniques et les méthodes les plus appropriées dans le contexte d'une analyse par spectrométrie de masse. Enfin, la section sur la spectrométrie de masse décrit dans le détail la chimie en phase gazeuse de chaque polymère. Les fragmentations en phase gazeuse sont décrites avec un soin particulier, car aucune analyse par spectrométrie de masse sérieuse ne peut être menée sans sonder la structure de l'analyte par fragmentation. Des tableaux synoptiques permettent de rapidement calculer la masse des différents fragments attendus pour chaque polymère biologique étudié. Enfin, des cas pratiques d'analyse de biopolymères tirés de la littérature sont disséqués afin d'illustrer l'apport de la spectrométrie de masse comme outil de biologie structurale. Le lecteur est accompagné pas à pas dans le calcul de la masse des espèces moléculaires étudiées dans les articles analysés ;

- * Partie III : Le manuel de l'utilisateur du logiciel *massXpert* inclus dans cet ouvrage sous forme d'une distribution sur CDROM permet à l'utilisateur d'en apprendre le maniement. Nombre de calculs de masses et de simulations décrits dans cet ouvrage ont été mis en œuvre par usage du logiciel *massXpert*. Il s'agit d'un environnement logiciel graphique hautement sophistiqué dans lequel l'utilisateur peut définir tout type de chimie de polymère afin de s'en servir pour modéliser des réactions de biochimie et des analyses par spectrométrie de masse. *massXpert* s'exécute sur toutes les plateformes informatiques courantes : *GNU/Linux*, *Mac OS X*, *MS-Windows* et bon nombre de systèmes *UNIX*. Ce manuel détaille les nombreuses fonctionnalités du logiciel *massXpert* et décrit les méthodes destinées à en étendre l'emploi à de tout nouveaux types de polymère entièrement définis par l'utilisateur. Le logiciel est livré avec les définitions de chimie de polymère relatives aux protéines, aux glucides et aux acides nucléiques. Un exemple d'extension du logiciel est fourni, où l'on ajoute une définition de chimie de polymère pour une variante synthétique d'acide nucléique : l'ARN 2'-O-méthyl.

Abréviations — Glossaire

- * ACHCA acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique (matrice de MALDI) ;
- * ADN acide désoxyribonucléique ;
- * AMP adénosine monophosphate ;
- * ARN acide ribonucléique ;
- * ATP adénosine triphosphate ;
- * CAD « *collisionally-activated* (ou *dissociation*) »,
fragmentation induite par des collisions avec un gaz (méthode de fragmentation) ;
- * CID « *collisionally-induced* (ou *dissociation*) »,
fragmentation induite par des collisions avec un gaz (méthode de fragmentation) ;
- * CMP cytosine monophosphate ;
- * DALPC « *direct analysis of protein complexes* »
analyse directe de complexes protéiques (préparation d'échantillon) ;
- * ECD « *electron-capture dissociation* »,
fragmentation par capture d'électron (méthode de fragmentation) ;
- * EDD « *electron-detachment dissociation* »,
fragmentation par éjection d'un électron (méthode de fragmentation) ;
- * ESI « *electrospray ionization* »,
ionisation par électronébulisation (méthode de production d'ions) ;
- * ETD « *electron-transfer dissociation* »,
fragmentation par transfert d'électron (méthode de fragmentation) ;
- * FAB « *fast atom bombardment* »,
bombardement par atomes rapides (méthode d'ionisation) ;
- * FT « *Fourier transform* »,
transformée de Fourier ;
- * FWHM « *full width at half maximum* »,
largeur du pic à mi-hauteur ;
- * GMP guanosine monophosphate ;
- * GPI glycosyl-phosphatidyl-inositol ;
- * GPL « *General Public License* »
licence publique générale (informatique) ;

- * GUI « *graphical user interface* »
interface graphique utilisateur (informatique) ;
- * HECD « *hot electron-capture dissociation* »,
fragmentation par capture d'électron hautement énergétique (méthode de fragmentation) ;
- * HIC « *hydrophobic interaction chromatography* »
chromatographie d'interactions hydrophobes (séparation et purification) ;
- * HILIC « *hydrophilic interaction chromatography* »
chromatographie d'interactions hydrophiles (séparation et purification) ;
- * 1-HIQ 1-hydroxy-quinoline (matrice de MALDI) ;
- * 3-HPA acide 3-hydroxy-picolinique (matrice de MALDI) ;
- * HPLC « *high performance liquid chromatography* »
chromatographie liquide haute performance (séparation et purification) ;
- * HTML « *hypertext markup language* » langage de balises hypertexte (format standard de l'internet) ;
- * ICAT « *isotope-coded affinity tag* »,
étiquette d'affinité codée par des isotopes (quantification d'analytes) ;
- * ICR « *ion cyclotron resonance* »,
résonance ionique cyclotronique (analyseur) ;
- * IEF isoélectrofocalisation (séparation et purification) ;
- * IMAC « *immobilized metal ion affinity chromatography* »,
chromatographie par affinité pour des ions métalliques immobilisés (séparation et purification) ;
- * IPG « *immobilized pH gradient* »
gradient de pH immobilisé (séparation et purification) ;
- * IR infrarouge ;
- * IRMPD « *infrared multiphoton dissociation* »,
fragmentation induite par captures multiples de photons dans l'infrarouge (méthode de fragmentation) ;
- * IT « *ion trap* »,
piège à ions (analyseur) ;
- * LC « *liquid chromatography* »
chromatographie liquide (séparation et purification) ;
- * LC-MS « *liquid chromatography-mass spectrometry* »
chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (séparation et analyse) ;
- * LIT « *linear ion trap* »,
piège à ions linéaire (analyseur) ;
- * LNA « *locked nucleic acid* » acide nucléique bloqué ;

- * MALDI « *matrix-assisted laser desorption/ionization* »,
désorption/ionisation au laser assistée par la matrice (méthode de
production d'ions) ;
- * MRM « *multiple-reaction monitoring* » ;
- * MS « *mass spectrometry* »
spectrométrie de masse ;
- * PAGE « *polyacrylamide gel electrophoresis* »
électrophorèse en gel de polyacrylamide (séparation et purifica-
tion) ;
- * PCR « *polymerase chain reaction* »
réaction de polymérisation d'ADN en chaîne (biologie moléculaire) ;
- * PD « *plasma desorption* »
désorption plasma (méthode de production d'ions) ;
- * PDF « *portable document format* »
format de document portable (format de fichier) ;
- * PMF « *peptide mass fingerprint* »
empreinte peptidique massique ;
- * PNG « *portable network graphics* »
format graphique portable pour le réseau (format de fichier) ;
- * PPM « *parts per million* » parties par million ;
- * PS « *postscript* »
format de description de page pour l'impression (format de fichier
ancêtre du format PDF) ;
- * PSD « *post-source decay* »,
fragmentation en aval de la source (méthode de fragmentation dans
l'analyseur temps-de-vol) ;
- * QIT « *quadrupole ion trap* »,
piège à ions quadrupolaire (analyseur) ;
- * Q-TOF « *quadrupole time-of-flight* »
quadrupôle temps-de-vol (analyseur hybride) ;
- * QUAD « *quadrupole* »
quadrupôle (analyseur) ;
- * RF « *radiofrequency* » radiofréquence ;
- * RP « *reversed-phase* »,
phase inversée (séparation et purification) ;
- * SA « *sinapic acid* »
acide sinapinique (matrice de MALDI) ;
- * SCX « *strong cation exchange* »,
échange de cations (séparation et purification) ;
- * SDS « *sodium dodécylsulphate* » (détergent) ;
- * SI système international des unités ;

- * SID *surface-induced dissociation* », fragmentation induite par des collisions contre une surface (méthode de fragmentation) ;
- * SILAC « *stable isotope labeling with amino acids in cell culture* », marquage par isotope stable avec des amino-acides en culture de cellules » (quantification d'analytes) ;
- * SM spectrométrie de masse ;
- * SNP « *single nucleotide polymorphism* » polymorphisme génétique à un seul nucléotide ;
- * SOMA « *short oligonucleotide mass analysis* » analyse de séquence d'ADN sur oligonucléotides courts ;
- * SORI « *sustained off-resonance irradiation* », irradiation continue hors résonance (méthode de fragmentation) ;
- * STR « *short tandem repeat* » courtes répétitions en tandem ;
- * SVG « *scalar vector graphics* » format graphique vectoriel (format de fichier) ;
- * TAP-TAG « *tandem affinity purification-tag* » étiquette de purification par affinité en tandem ;
- * TEV « *tobacco etch virus* » virus de la gravure du tabac ;
- * TFA « *trifluoroacetic acid* » acide trifluoroacétique ;
- * THAP trihydroxy-acétophénone (matrice de MALDI) ;
- * TMPP acétyl-tris-(triméthoxyphényl)phosphonium ;
- * TOF « *time-of-flight* », temps-de-vol (analyseur) ;
- * UVPD « *photodissociation* » fragmentation dans l'ultraviolet (méthode de fragmentation) ;
- * XML « *extended markup language* » langage de balises étendu (héritier du HTML) ;

Docteur de l'université Pierre et Marie Curie, Paris VI, biochimiste, **Filippo Rusconi**, chercheur au CNRS, est spécialiste de la chimie analytique des biopolymères, en particulier des protéines. Ses recherches portent sur l'étude des modifications chimiques des protéines, qui sont étudiées par la mise en œuvre d'une palette complète de méthodes de chimie analytique. Il a participé à la mise en place des laboratoires de biochimie et de spectrométrie de masse de l'Institut européen de chimie et biologie à l'Université Bordeaux I. Il a dirigé la plateforme de spectrométrie de masse du Muséum national d'Histoire naturelle. Il enseigne en troisième cycle.



Logiciel **massXpert** de simulation et d'analyse de données de spectrométrie de masse pour GNU/Linux, Apple Mac OS X et MS-Windows

Manuel de spectrométrie de masse à l'usage des biochimistes

Ce manuel très complet et le logiciel performant qui l'accompagne permettent d'acquérir – pas à pas – la maîtrise de la spectrométrie de masse des 3 grands polymères biologiques : protéines, acides nucléiques et glucides.

La première partie de l'ouvrage décrit les concepts fondamentaux de la spectrométrie de masse et détaille le fonctionnement des sources d'ions et des analyseurs de masse mis en œuvre dans les principaux instruments commerciaux d'aujourd'hui conçus pour l'étude des polymères biologiques.

La deuxième partie expose en détail les différentes méthodologies permettant de séparer, purifier et décontaminer les polymères biologiques en vue de leur analyse par spectrométrie de masse. Chaque polymère fait ensuite l'objet d'une étude approfondie traitant successivement sa structure, la séparation et la purification des molécules d'intérêt et enfin son comportement dans un spectromètre de masse. L'énoncé des principes de la fragmentation en phase gazeuse pour les différents polymères biologiques y est particulièrement mis en lumière.

La dernière partie constitue le manuel d'utilisation du logiciel **massXpert** commercialisé avec l'ouvrage. Ce puissant logiciel, largement répandu dans le monde entier, est utilisé par l'auteur pour ses enseignements. C'est un spectromètre de masse virtuel doublé d'un laboratoire de biochimie qui permettra au lecteur de simuler ses expériences afin de mieux les préparer et de récolter le maximum de données analytiques à haute valeur ajoutée.

Du novice à l'opérateur expérimenté, cet ouvrage est conçu pour les professionnels des organismes de recherche du secteur public et privé, des laboratoires de recherche et d'analyses biochimiques, des centres de formation, des plateaux techniques, des entreprises pharmaceutiques et biotechnologiques. Ce livre s'adresse également aux étudiants en BTS, IUT, licences et masters des universités des sciences chimiques/biologiques.

