

Mise en évidence de molécules de bas poids moléculaire par spectrométrie de masse FTICR : application sur les nucléosides

Paulo Marcelo¹, Gersende Lepere², Sandra Duharcourt², Eric Meyer², Jean Rossier¹ & Joëlle Vinh¹

¹ UMR 7637 CNRS/ESPCI - Unité de Neurobiologie & Diversité Cellulaire - 10 rue Vauquelin, 75231 Paris cedex 05

² UMR 8541 - Régulation de l'expression génétique, ENS - 46, rue d'Ulm - 75005 Paris

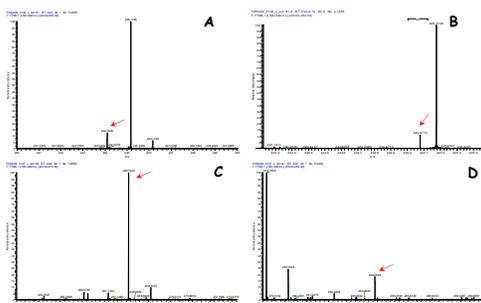
INTRODUCTION

La compréhension des mécanismes moléculaires régissant le fonctionnement des cellules constitue un enjeu majeur dans le domaine de la biologie. Dans ce but, de nombreux efforts ont été réalisés en vue du séquençage des génomes aussi bien pour les organismes eucaryotes que procaryotes. Il a été montré que les molécules d'acides nucléiques tels que les ARN peuvent subir des modifications dans certains systèmes cellulaires pouvant jouer un rôle important dans différents processus tels que la signalisation cellulaire et la régulation de la transcription. L'arrivée de techniques appropriées a permis à la spectrométrie de masse de devenir l'un des outils de choix aussi bien pour l'analyse des protéines que des acides nucléiques. L'utilisation d'une approche par MALDI-TOF MS a notamment permis le séquençage de courts fragments d'ADN ainsi que le génotypage de polymorphisme sur un seul nucléoside (SNP) [1, 2]. Bien que ce type d'approche permette une mesure précise de la masse moléculaire de petites séquences d'ADN, elle ne permet pas de déterminer, sans ambiguïté, la présence et la nature d'un seul nucléoside et de ses éventuelles modifications.

A ce titre, la Spectrométrie de Masse de Résonance Cyclotronique Ionique par Transformée de Fourier (FTICR-MS) est un outil très puissant pour répondre à cette demande. Cet appareil offre une haute sensibilité, une gamme dynamique étendue [3] et une très bonne précision de masse permettant une caractérisation fine des protéines [4] et peptides [5] et de leurs modifications post-traductionnelles. Ces propriétés peuvent également être utilisées avec d'autres types de molécules telles que les nucléosides. La mesure de masse exacte avec un appareil de type FTICR-MS sur ces molécules de faible masse moléculaire est tellement discriminante qu'elle permet de remonter à la formule chimique brute de la molécule avec précision et sans ambiguïté et d'en déduire la présence ou l'absence d'un type de nucléoside ainsi que le type de modifications éventuellement présente.

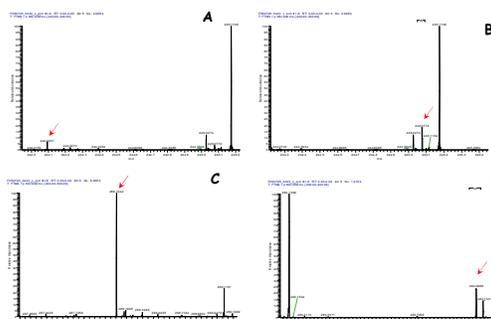
RESULTATS

1- MISE EN EVIDENCE ET DETERMINATION DE LA MASSE EXACTE DES NUCLEOSIDES « STANDARDS »



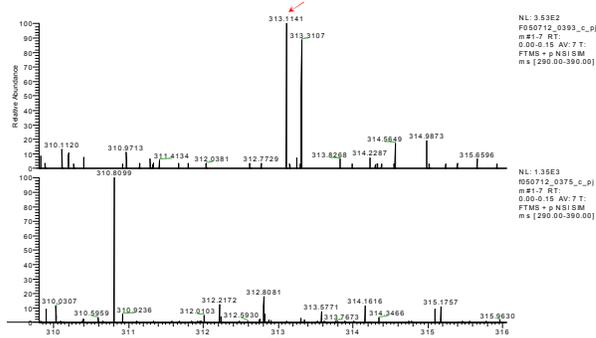
Spectres FTMS en mode SIM de la Cytidine (A), de l'Uridine (B), de l'Adénosine (C) et de la Guanosine (D) sur les nucléosides commerciaux (1) et sur des échantillons d'ARN digérés (2). Les flèches rouges indiquent les masses correspondant aux différents nucléosides.

2- MISE EN EVIDENCE ET DETERMINATION DE LA MASSE EXACTE DES NUCLEOSIDES SUR DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES



Les masses exactes des différents nucléosides « standards » et issus de la digestion des échantillons d'ARN digérés ont été obtenus par spectrométrie de masse FTICR en mode SIM. Ces différents spectres montrent qu'il est possible d'identifier les différents nucléosides isolés (1) ou en mélange (2). Les différences entre les masses théoriques et expérimentales varient entre 1 à 4 ppm. Il est donc possible de conclure sans ambiguïté à la présence des différents nucléosides en ne tenant compte que de la mesure de masse exacte.

3- UN EXEMPLE DE MISE EN EVIDENCE DE MODIFICATIONS GRACE A LA DETERMINATION DE LA MASSE EXACTE SUR DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES



La caractérisation des modifications des molécules nécessite une bonne résolution et une bonne précision de mesure de masse pour déterminer la nature de ces modifications. La comparaison entre les masses expérimentales obtenues pour le témoin négatif et l'échantillon d'ARN digéré a permis de mettre en évidence une espèce qui a un rapport m/z est égal à 313,1141.

L'utilisation du logiciel Molecular Weight Calculator (version 6.37), (<http://jjorg.chem.unc.edu/personal/monroe>) permet, à partir de la masse exacte, de déterminer la ou les formules chimiques brutes possibles. La tolérance de masse autorisée est de 5 ppm au maximum.

Il a été ainsi possible de déterminer que cette espèce peut correspondre à une modification des deux fonctions alcool du résidu ribose de l'adénosine en fonction carboxamide. La différence de masse entre la masse expérimentale et la masse théorique est de 2 ppm.

CONCLUSION

Le spectromètre de masse FTICR permet d'atteindre une haute résolution et une très bonne précision de masse ainsi qu'une bonne sensibilité. Il fait partie de la dernière génération de spectromètres de masse accessibles aux massistes non spécialistes en FTICR MS, pour les applications protéomiques mais également pour la détermination de masse exacte de protéines et des petites molécules comme le montre l'exemple cité ici. La précision de mesure de la masse de ce type d'appareil est si discriminante qu'elle permet de mettre en évidence une ou des modifications sur des petites molécules telles que les nucléosides ce qui ouvre des perspectives dans la compréhension des mécanismes de régulation de ce type de molécules.

Références

- Abdi F. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 2001, 29 : 61.
- Griffin T.J. *et al.*, *Trends Biotech.* 2000, 18 : 77-84.
- Page J.S. *et al.*, *Curr Opin. Biotech.* 2004, 15 : 3-11.
- Vouglis S. *et al.*, *J Biol Chem.* 2004, 279 (29) : 30210-8
- Bruce J.E. *et al.*, *Anal Chem.* 1999, 71 : 2595-2599.