

Approche analytique systématique pour la détermination des métallocomplexes et des métalloprotéines dans des matrices complexes par l'association des techniques de spectrométrie de masse atomique (ICP-MS) et de spectrométrie de masse moléculaire à haute résolution (ESI-LTQ Orbitrap MS)

Laurent Ouerdane • Sandra Mounicou • Ryszard Lobinski

De nombreux métaux et métalloïdes, généralement associés à des molécules organiques, jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des êtres vivants. Pourtant, du fait des caractéristiques chimiques particulières de chacune de ces espèces métallées, de leur diversité et de leur faible niveau de concentration, leur analyse peut s'avérer complexe et fastidieuse. Afin de remédier à ce problème, une approche associant la spectrométrie de masse atomique (ICP-MS) et la spectrométrie de masse moléculaire à haute résolution (LTQ Orbitrap MS) a été mise en place. Lors de couplages LC MS, la recherche par Orbitrap MS des empreintes isotopiques et des défauts de masse caractéristiques aux éléments métalliques recherchés et le croisement de ces données avec celles obtenues par ICP MS a permis l'observation systématique de ces espèces et l'identification par fragmentation de nouveaux composés métallés. Leur découverte s'est avérée ainsi être essentielle pour la compréhension des mécanismes de métabolisation de ces éléments et, surtout, pour la détermination du rôle biologique de ces métallocomposés.

Plusieurs types d'échantillons furent caractérisés à l'aide de cette méthode. Dans un premier temps, cette technique a permis d'identifier des subisoformes inattendues de métallothionéines (MTs) lors de l'analyse de lignées cellulaires de rein de porc soumis à un stress métallique provoqué par des nanoparticules de CdS. Les MTs sont des protéines de faibles poids moléculaires (5500-7000 Da) riches en cystéine et qui ont une forte affinité pour les métaux qu'ils soient essentiels (Zn, Cu) ou toxiques (Cd, Hg, As). Elles participeraient à la fois à la détoxification, au transport et au stockage de ces métaux, d'où leur intérêt. Les approches classiques de la protéomique (électrophorèse sur gel, digestion enzymatique de protéines, identification des peptides etc...) ne sont pas applicables ici car cela provoquerait la perte des ions métalliques lors de la dénaturation de ces protéines mais aussi cela rendrait impossible la distinction entre les subisoformes de MTs. Une approche LC MS "top-down" a donc été utilisée et a permis d'obtenir le séquençage de ces protéines par HCD. De même, les formes métallées de ces MTs ont pu être caractérisées et de nouvelles structures furent observées.

Cette méthodologie a aussi permis d'effectuer la recherche des complexes métalliques des métaux de transition essentiels dans les plantes (Zn, Cu et Fe) dans le petit pois, *Pisum sativum*, ainsi que dans une plante contrôle, *Arabidopsis thaliana*. Connaître la nature des composés organiques responsables de la mobilisation des métaux sous forme de complexes au sein de la plante est primordial pour comprendre leur mécanisme de transport. Ses travaux ont permis la toute première caractérisation d'un ensemble de molécules responsables de la complexation du fer, du cuivre et du zinc dans les fluides de transport de la plante (xylème, post-phloème etc...), ce qui ouvre des perspectives pour la recherche de protéines membranaires impliquées dans le transport et la mobilisation de ces métaux dans les différents organites de la plante.