



L'ISBG et l'IBS à la pointe de la biologie structurale

L'Integrated Structural Biology Grenoble est une unité mixte de services pour la recherche en biologie structurale. Elle met à disposition instruments, expertises et services de pointe pour la caractérisation de macromolécules biologiques et de leurs interactions. Zoom sur la plateforme de spectrométrie de masse hébergée par l'Institut de Biologie Structurale.

Une plateforme clé pour l'analyse des biomolécules

Placée sous la tutelle du CNRS, du CEA, de l'UGA et partenaire de l'EMBL, l'Integrated Structural Biology Grenoble (ISBG) est une unité mixte de services qui fédère les plateformes technologiques de l'Institut de Biologie Structurale (IBS), dont une est dédiée à la spectrométrie de masse pour les analyses biomoléculaires.

Ce type de plateforme joue un rôle essentiel en biologie structurale. Elle permet d'étudier les protéines intactes et complexes macromoléculaires, se démarquant de la protéomique classique par une approche sans digestion, pour répondre à des enjeux clés :

- **Contrôle qualité protéique** : vérification de l'identité et de l'intégrité des protéines recombinantes et purifiées, pour sécuriser les projets en amont et éviter les pertes de temps et de ressources.
- **Evaluation de la pureté et de la stabilité** : analyse de l'homogénéité des échantillons et détection des formes dégradées ou tronquées sous différentes conditions, des informations clés pour les études structurales comme la cristallisation.
- **Caractérisation structurale** : identification des ponts disulfures et détermination de l'état oligomérique des protéines (monomères, dimères, trimères), facteurs essentiels à la compréhension de leur fonction.
- **Validation des marquages** : contrôle des degrés de marquage, notamment pour les études de RMN ou de deutérations.
- **Analyse des modifications post-traductionnelles** : détection et caractérisation de modifications telles que la phosphorylation, afin d'évaluer l'activité enzymatique.
- **Analyse des macromolécules biologiques dans leur état natif** : préservation des interactions covalentes et non covalentes pour analyser les conformations et interactions.

Des technologies complémentaires

La plateforme de spectrométrie de masse de l'ISBG s'appuie sur un ensemble d'équipements de haute résolution pour la réalisation d'analyses de biomolécules intacts en conditions dénaturantes, et en conditions natives où les liaisons covalentes sont conservées.

→ HPLC-ESI-Q-TOF MS

L'instrument principal utilisé est un spectromètre de masse Q-TOF (Quadrupole Time-of-Flight) couplé à une HPLC (chromatographie liquide haute performance). Équipé d'une colonne en phase inverse de type PLRP-S, le système permet la séparation des échantillons en amont de l'analyse. Le TOF repose ensuite sur la relation entre la masse des ions, leur charge et leur temps de vol sur environ

4 mètres, assurant une mesure de masse d'une grande justesse.

Cette méthode standardisée est particulièrement adaptée à la majorité des protéines solubles (pas pour les protéines membranaires). Celles-ci sont tout d'abord diluées en conditions acides, puis séparées et éluées sur la colonne avec une concentration d'acétonitrile comprise entre 50 et 70%, pour un temps d'analyse d'environ 10 minutes par échantillon. Certaines limites peuvent toutefois apparaître, notamment lorsque les protéines présentent une faible affinité pour la colonne ou si leurs modifications entraînent des difficultés d'ionisation.

Avant passage sur la colonne, la plateforme peut proposer différents traitements des échantillons à analyser, telles que la réduction de ponts disulfure à l'aide d'agents réducteurs, la déglycosylation pour évaluer l'impact de la glycosylation sur la masse des anticorps, ou encore le clivage enzymatique afin d'étudier l'efficacité d'enzymes spécifiques.

→ MALDI TOF/TOF MS

Pour les échantillons plus complexes ou récalcitrants à cette première méthode, un second instrument basé sur une ionisation laser est utilisé en complément. L'échantillon en solution est mélangé à une matrice organique capable d'absorber l'énergie UV puis séché sous vide. Un laser est ensuite appliqué sur des « spots » contenant l'échantillon et la matrice, permettant l'ionisation puis la mesure de la masse. Cette technique présente un avantage majeur, notamment pour les protéines glycosylées ou membranaires, susceptibles de précipiter dès lors qu'elles perdent leur environnement détergent. Le MALDI se distingue par sa tolérance aux détergents non ioniques et aux réactifs chimiques qui interfèrent avec d'autres techniques de SM. Il est particulièrement utile pour l'analyse d'échantillons nécessitant des conditions de tampon spéciales. Dans le cas de protéines pures, il permet le séquençage N- et C-terminal.

→ High-Mass nano-ESI-Q-TOF MS

L'instrument ESI Natif permet l'analyse de complexes protéine-ligand non covalents et d'assemblages macromoléculaires intacts. Il requiert l'utilisation d'un tampon adapté à la conservation des interactions non-covalentes dans la phase gazeuse et une instrumentation modifiée pour une ionisation dite « nano-ESI » ainsi qu'une détection de grands signaux masses sur charge.

Les expériences de SM native nécessitent la détermination préalable des masses des sous-unités individuelles et sont donc généralement combinées à une expérience HPLC-ESI-MS.

Un support scientifique et technique de A à Z

L'ISBG propose un accompagnement complet et personnalisé à ses utilisateurs, issus à 80% du monde académique – notamment de l'IBS, de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), de l'ILL (Institut Laue-Langevin) et de l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory) – et à 20% du secteur industriel, incluant les grands groupes pharmaceutiques, les PME et les startups.

En amont des analyses, les clients fournissent des informations clés sur leur projet (solubilité des protéines, glycosylation, système d'expression...). Ces éléments sont complétés par des



La rigueur scientifique et le dévouement à la science contribuent à maintenir un niveau élevé de motivation chez le personnel du laboratoire - © Diane Corjon

échanges approfondis avec l'équipe, afin de cerner les enjeux scientifiques, évaluer la faisabilité et orienter la préparation des échantillons vers la méthode la plus adaptée, avec la possibilité de réaliser des tests exploratoires si nécessaire.

Lorsque les besoins dépassent son périmètre d'expertise, la plateforme s'appuie sur son environnement scientifique pour rediriger les projets vers des structures spécialisées, en interne ou auprès de partenaires externes. Cette capacité d'orientation constitue un véritable atout, au sein d'un écosystème tel que le campus EPN de Grenoble particulièrement riche pour la biologie structurale.

À l'issue des analyses, un rapport détaillé est fourni, incluant les spectres bruts et traités, les masses déterminées ainsi qu'une interprétation approfondie en lien avec la problématique initiale. L'équipe reste disponible pour échanger sur les résultats et accompagner les suites du projet.

Études de cas

À titre d'exemple, en collaboration avec l'ILL, la plateforme de spectrométrie de masse native de l'ISBG a contribué à l'étude de tétramères d'une protéine impliquée dans l'amyloïdogenèse. Les travaux ont porté sur l'impact de mutations spécifiques dites protectives et pathogéniques et sur l'effet d'une petite molécule thérapeutique capable de stabiliser le tétramère dans une forme non-amyloïdogenique, apportant des éclairages sur la formation des fibrilles et la dynamique des changements d'états oligomériques.

En matière de modifications post-traductionnelles (MPT, tel que la phosphorylation et la glycosylation), la plateforme a également participé à l'analyse d'une protéine conservant une structure hexamérique, indépendamment de la présence de phosphorylation. Elle a ainsi contribué de manière déterminante à la caractérisation d'une MPT (phosphohistidine) et à la validation d'une prédiction structurale par spectrométrie de masse native.

Enfin, la plateforme a pris part à des travaux innovants sur le « DNA origami », des structures d'ADN conçues pour former des architectures tridimensionnelles modulables. Ses instruments ont permis d'en déterminer la masse et d'apporter des informations précieuses sur leur organisation structurale.

Une démarche qualité rigoureuse

L'ISBG fait de la qualité des prestations de ses plateformes une priorité, soutenue par

une démarche rigoureuse certifiée ISO 9001 et NF X50-900.

En spectrométrie de masse, la fiabilité des mesures est assurée grâce à l'utilisation de standards de référence, notamment la myoglobine (16 kDa) et l'albumine bovine (66 kDa), qui permettent de vérifier le bon fonctionnement des instruments, de suivre leur performance dans le temps et d'évaluer les marges d'erreur. Des logiciels de déconvolution sont ensuite utilisés pour déterminer avec grande justesse la masse des protéines analysées à partir des profils de charge. La traçabilité des expériences est de plus garantie grâce à des logiciels internes dédiés. Par ailleurs, des audits internes et externes sont menés régulièrement, afin de garantir la conformité et l'amélioration continue des process.

Au-delà des protéines

L'intelligence artificielle constitue un axe d'évolution stratégique pour la plateforme de spectrométrie de masse. Si certains outils d'analyse existent déjà, leur déploiement reste limité par le manque de bases de données structurées spécifiques à la spectrométrie de masse sur biomolécules intacts. Dans ce contexte, la plateforme pourra s'appuyer sur l'accord du CNRS avec une solution d'IA générative, ouvrant des perspectives pour la synthèse documentaire, la traduction ou encore la génération de rapports d'analyse automatisée afin d'optimiser les missions de la plateforme et d'accueillir davantage d'échantillons. En revanche, son utilisation directe pour l'interprétation des données demeure, à ce stade, un objectif à plus long terme.

Dans cette dynamique d'innovation, la plateforme de l'ISBG, dont le cœur d'activité reste les protéines, s'ouvre progressivement à d'autres classes de biomolécules. Des collaborations ont ainsi déjà été engagées avec l'ILL autour de l'étude des lipides, notamment ceux présents dans les membranes bactériennes, afin d'évaluer les phénomènes de deutération. Cette diversification s'accompagne d'un important travail de développement méthodologique et de R&D au sein de la plateforme. A suivre...

Pour en savoir plus :

ISBG et IBS

Elisabetta Boeri Erba et Chloe Ymen
ibs-plateforme-ms.contact@ibs.fr
www.isbg.fr/
www.ibs.fr/